

Université de Montréal

**ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT DE LA RÉPONSE HUMORALE  
DIRIGÉE CONTRE LA CAPSULE POLYSACCHARIDIQUE DE  
*STREPTOCOCCUS SUIS* ET *STREPTOCOCCUS* DU GROUPE B**

par

CYNTHIA CALZAS

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.)  
en sciences vétérinaires, option microbiologie

Août 2015

©Cynthia Calzas, 2015

# RÉSUMÉ

*Streptococcus suis* et *Streptococcus* du groupe B (GBS) sont deux bactéries encapsulées qui induisent des pathologies similaires chez l'homme et/ou l'animal, incluant septicémies et méningites. La capsule polysaccharidique (CPS) est un facteur de virulence clé de ces deux pathogènes et les anticorps (Ac) anti-CPS présentent un bon potentiel protecteur. Néanmoins, ces molécules sont faiblement immunogéniques et les mécanismes de la génération de la réponse humorale anti-CPS demeurent méconnus.

L'objectif principal de cette thèse était d'évaluer les caractéristiques et les mécanismes du développement de la réponse Ac dirigée spécifiquement contre les CPS de *S. suis* et GBS, ainsi que l'effet de la biochimie de la CPS dans cette réponse. Nous avons étudié *S. suis* types 2 et 14 et GBS types III et V, dont les CPS présentent plusieurs similarités dans leurs compositions et leurs structures, incluant la présence d'acide sialique, un sucre potentiellement immunosuppresseur, tout en possédant une antigénicité propre.

Nous avons tout d'abord analysé la nature de la réponse Ac anti-CPS sérique face à la bactérie entière. Les souris infectées par *S. suis* développent une réponse très faible (*S. suis* type 2) voire insignifiante (*S. suis* type 14) de profil isotypique restreint à l'IgM et sont incapables de monter une réponse mémoire efficace face à une seconde infection. Un profil similaire est obtenu chez le porc infecté par *S. suis* type 2. On détecte des titres d'IgM anti-CPS significatifs chez les souris infectées par GBS (type III ou V). Toutefois, la magnitude de la réponse reste globalement faible et aucune commutation de classe n'est observée.

Nous avons ensuite examiné l'influence de la biochimie de la CPS sur ces profils de réponse en conduisant des expériences avec la CPS hautement purifiée de ces pathogènes. Tandis que la CPS de GBS type III administrée aux souris conserve des propriétés immunogéniques similaires à celles observées durant l'infection par la bactérie intacte, les CPS de *S. suis* type 2 et GBS type V perdent toute capacité à induire une réponse Ac spécifique. L'analyse de l'interaction *in vitro* des CPS avec les cellules dendritiques (DC) murines, des acteurs clés dans la détection des pathogènes et l'orchestration des réponses immunitaires subséquentes, révèle que ces molécules stimulent la production de niveaux conséquents de chémokines via différents

récepteurs. Néanmoins, les CPS sont inaptes à induire la sécrétion de cytokines et elles interfèrent avec la capacité des DC à exprimer BAFF, une cytokine clé dans la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. L'utilisation de CPS chimiquement désialylés démontre que l'acide sialique ne joue aucun rôle immunosuppresseur majeur dans le développement de la réponse Ac dirigée contre les CPS purifiées de *S. suis* ou GBS, ni sur l'interaction des CPS avec les DC *in vitro*, ni sur profil de la réponse *in vivo*. D'autres propriétés biochimiques intrinsèques à ces CPS seraient responsables de l'inaptitude de l'hôte infecté à monter une réponse Ac adéquate et les identifier constituera un outil précieux pour une meilleure compréhension de l'immunopathogénèse de *S. suis* et GBS ainsi que pour développer des moyens de lutte efficaces contre ces bactéries.

**Mots clé:** *Streptococcus* du groupe B, *Streptococcus suis*, capsule polysaccharidique, réponse anticorps, acide sialique, cellules dendritiques, lymphocytes B, cytokines, chémokines, souris.

# ABSTRACT

*Streptococcus suis* and Group B *Streptococcus* (GBS) are two encapsulated bacteria that induce similar pathologies in humans and/or animals, including septicemia and meningitis. The capsular polysaccharide (CPS) is a major virulence factor for both pathogens and CPS-specific antibodies (Ab) display a good protective potential. However, CPSs are weak immunogenic molecules and the mechanisms of the generation of the CPS-specific humoral response remain poorly known.

Thus, the main objective of this thesis was to evaluate the characteristics and the mechanisms of the development of the Ab response directed against *S. suis* and GBS CPSs, as well as the influence of the biochemistry of the CPS on this response. We worked with *S. suis* types 2 and 14 and GBS types III and V, whose CPSs present several similarities in their compositions and structures, including the presence of sialic acid, a potentially immunosuppressive sugar, while being very distinct antigens.

Initially, we analyzed the features of the CPS-specific serum Ab response to whole bacteria. *S. suis*-infected mice developed a very low (*S. suis* type 2) to undetectable (*S. suis* type 14) response restricted to the IgM isotype, and were unable to mount an efficient memory response after a secondary infection. A similar profile of response was obtained in *S. suis* type 2-infected pigs. We detected significant CPS-specific IgM titers in GBS-infected mice (type III or V). Nonetheless, the magnitude of the response remained globally low and no isotype switching was observed.

Then, we examined the influence of the biochemistry of the CPS on these response profiles by conducting experiments with highly purified CPSs from these pathogens. Whereas the purified GBS type III CPS administered to mice retained similar immunogenic properties as those observed during the infection with the intact bacteria, purified *S. suis* type 2 and GBS type V CPSs were no longer able to induce a specific Ab response. The analysis of the *in vitro* interaction between the CPSs and murine dendritic cells (DCs), crucial actors in the detection of pathogens and the orchestration of subsequent immune responses, revealed that these molecules stimulate the production of significant levels of chemokines through different receptors. Nevertheless, CPSs were unable to induce cytokine secretion and interfered with the ability of DCs to express BAFF, a key cytokine for B lymphocyte differentiation into plasma cells. The use of chemically desialylated CPSs demonstrated that sialic acid

does not play a major immunosuppressive role in the development of the Ab response specific to purified *S. suis* or GBS CPSs, neither on the *in vitro* interaction between CPSs and DCs, nor on the profile of the *in vivo* response. Other biochemical properties intrinsic to these CPSs would be responsible for the inaptitude of the infected host to mount an adequate Ab response, and their identification will be a precious tool for a better understanding of the immunopathogenesis of *S. suis* and GBS, as well as for the development of efficient strategies to fight against these bacteria.

**Key words:** *Streptococcus suis*, group B *Streptococcus*, capsular polysaccharidique, antibody response, sialic acid, dendritic cells, B lymphocytes, cytokines, chemokines, mice.

# TABLE DES MATIÈRES

|   |            |
|---|------------|
| <b>RÉSUMÉ</b> .....   | <b>ii</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>iv</b>  |
| <b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....   | <b>vi</b>  |
| <b>Liste des tableaux</b> .....   | <b>ix</b>  |
| <b>Liste des figures</b> .....  | <b>x</b>   |
| <b>Liste des abréviations</b> .....   | <b>xv</b>  |
| <b>REMERCIEMENTS</b> .....  | <b>xix</b> |
| <b>I – INTRODUCTION</b> .....   | <b>1</b>   |
| <b>II – REVUE DE LA LITTÉRATURE</b> .....   | <b>6</b>   |
| 1. L'immunopathogénèse de l'infection à <i>Streptococcus suis</i> et <i>Streptococcus</i> du groupe B (GBS) ..... | 7          |
| 1.1. Aspects généraux .....   | 7          |
| 1.1.1. Historique et épidémiologie .....  | 7          |
| 1.1.1.1. <i>S. suis</i> .....   | 7          |
| 1.1.1.2. GBS .....  | 8          |
| 1.1.2. Transmission et maladie .....  | 9          |
| 1.1.2.1. <i>S. suis</i> .....   | 9          |
| 1.1.2.2. GBS .....  | 10         |
| 1.1.3. La capsule polysaccharidique (CPS) .....   | 11         |
| 1.1.3.1. La grande diversité des CPS .....  | 12         |
| 1.1.3.2. L'acide sialique .....   | 15         |
| 1.1.3.3. Les récepteurs des CPS .....   | 16         |
| 1.1.3.3.1. Les « Toll-like receptors » (TLR) .....  | 17         |
| 1.1.3.3.2. Les récepteurs lectines .....  | 20         |
| 1.1.3.3.3. Les autres récepteurs .....  | 22         |
| 1.1.3.4. La CPS : un facteur de virulence clé .....   | 23         |
| 1.1.3.5. Les CPS de <i>S. suis</i> et GBS .....   | 24         |
| 1.2. Aspects immunologiques .....   | 28         |
| 1.2.1. La pénétration des barrières mucoales .....  | 28         |
| 1.2.2. La survie et la dissémination systémique .....   | 30         |
| 1.2.2.1. La résistance aux cellules de l'immunité innée .....   | 30         |
| 1.2.2.2. La réponse inflammatoire .....   | 32         |
| 1.2.3. La pénétration du système nerveux central et la méningite .....  | 34         |
| 1.2.4. Les récepteurs impliqués .....   | 35         |
| 1.2.4.1. <i>S. suis</i> .....   | 35         |
| 1.2.4.2. GBS .....  | 37         |
| 1.3. Aspects prophylactiques .....  | 39         |
| 1.3.1. Statut actuel de la recherche et du développement vaccinal .....   | 39         |
| 1.3.1.1. <i>S. suis</i> .....   | 39         |
| 1.3.1.2. GBS .....  | 41         |

|   |    |
|---|----|
| 1.3.2. La CPS comme cible antigénique prometteuse de l'immunité humorale protectrice .....    | 43 |
| 2. Les mécanismes du développement de la réponse humorale dirigée contre la CPS .....         | 46 |
| 2.1. Définitions générales .....  | 46 |
| 2.1.1. Les deux classes d'antigènes (Ag) .....  | 46 |
| 2.1.2. La bactérie : une mosaïque d'Ag thymo-dépendants (TD) et thymo-indépendants (TI) ..... | 49 |
| 2.2. Les acteurs cellulaires de la réponse humorale anti-CPS .....                            | 50 |
| 2.2.1. Les lymphocytes B (LB) .....   | 50 |
| 2.2.1.1. Les sous-types de LB .....   | 50 |
| 2.2.1.2. L'ontogénèse des LB .....  | 52 |
| 2.2.1.3. La réponse humorale TD .....   | 54 |
| 2.2.1.3.1. La réponse humorale TD primaire .....  | 54 |
| 2.2.1.3.2. La réponse humorale TD mémoire .....   | 58 |
| 2.2.1.4. La réponse humorale TI .....   | 59 |
| 2.2.1.4.1. Les sous-types de LB mis en jeu .....  | 59 |
| 2.2.1.4.2. La réponse humorale TI primaire .....  | 61 |
| 2.2.1.4.3. La réponse humorale TI mémoire .....   | 62 |
| 2.2.2. Les cellules auxiliaires .....   | 64 |
| 2.2.2.1. Les cellules dendritiques (DC) .....   | 64 |
| 2.2.2.1.1. Les sous-types de DC .....   | 64 |
| 2.2.2.1.2. L'ontogénèse des DC .....  | 66 |
| 2.2.2.1.3. Les fonctions majeures des DC .....  | 68 |
| 2.2.2.1.4. Le rôle des DC dans les réponses humorales TD .....                                | 69 |
| 2.2.2.1.5. Le rôle des DC dans les réponses humorales TI .....                                | 70 |
| 2.2.2.2. Les lymphocytes T (LT) .....   | 72 |
| 2.2.2.2.1. Le rôle des LT dans les réponses humorales TI face aux Ag solubles .....           | 72 |
| 2.2.2.2.2. Le rôle des LT dans les réponses humorales TI face à la bactérie entière .....     | 74 |
| 2.3. Les acteurs moléculaires de la réponse humorale anti-CPS .....                           | 75 |
| 2.3.1. Le système BAFF/APRIL .....  | 75 |
| 2.3.1.1. Les membres du système BAFF/APRIL .....  | 75 |
| 2.3.1.2. Le rôle du système BAFF/APRIL dans les réponses humorales TI .....                   | 76 |
| 2.3.2. Les TLR et leurs ligands .....   | 77 |
| 2.3.2.1. Le rôle général des TLR et de leurs ligands dans les réponses humorales .....        | 78 |
| 2.3.2.2. Le rôle des TLR et de leurs ligands dans les réponses humorales TI .....             | 79 |
| 2.3.3. Le système du complément .....   | 81 |
| 2.4. Les effets immunomodulateurs des CPS .....   | 82 |
| 2.4.1. La diversité immunogénique des CPS .....   | 82 |
| 2.4.2. Les effets immunosuppresseurs des CPS .....  | 83 |
| 2.4.2.1. Les mécanismes immunosuppresseurs médiés par les CPS .....                           | 84 |
| 2.4.2.2. L'acide sialique : un sucre potentiellement immunosuppresseur .....                  | 85 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>III – MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS.....</b>  | <b>87</b>  |
| <b>ARTICLE I:</b> Group B <i>Streptococcus</i> and <i>Streptococcus suis</i> capsular polysaccharides induce chemokine production by dendritic cells via Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent and -independent pathways ..... | 88         |
| <b>ARTICLE II:</b> Antibody response specific to the capsular polysaccharide is impaired in <i>Streptococcus suis</i> serotype 2-infected animals .....  | 125        |
| <b>ARTICLE III:</b> Terminal sialic acid in Gram-positive bacterial capsular polysaccharides does not exert an immunosuppressive effect on the humoral response .....  | 159        |
| <b>IV – DISCUSSION.....</b>  | <b>197</b> |
| <b>V – CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES.....</b>  | <b>226</b> |
| <b>VI – BIBLIOGRAPHIE .....</b>  | <b>230</b> |
| <b>VII – ANNEXES.....</b>  | <b>xxi</b> |
| <b>ARTICLE IV:</b> Immunology of <i>Streptococcus suis</i> infection: advances and future challenges .....   | xxii       |
| <b>ARTICLE V:</b> <i>Streptococcus suis</i> : a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? .....  | li         |
| <b>ARTICLE VI:</b> Structure determination of <i>Streptococcus suis</i> serotype 14 capsular polysaccharide .....  | lxxxix     |
| <b>ARTICLE VII:</b> The NOD2 receptor does not play a major role in the pathogenesis of Group B <i>Streptococcus</i> in mice.....  | cxxxii     |



# LISTE DES TABLEAUX

## REVUE DE LA LITTÉRATURE

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau I.</b> Récapitulatif des TLR et de leurs ligands .....   | 18 |
| <b>Tableau II.</b> Comparaison des caractéristiques générales des Ag TD et TI .....   | 49 |
| <b>Tableau III.</b> Marqueurs phénotypiques des différents sous-types de LB naïfs et de plasmocytes chez la souris .....        | 52 |
| <b>Tableau IV.</b> Marqueurs phénotypiques et principales fonctions des différents sous types de DC naïves chez la souris ..... | 66 |

## MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

ARTICLE I: Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* capsular polysaccharides induce chemokine production by dendritic cells via Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent and -independent pathways

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau I.</b> Quality control tests of purified <i>S. suis</i> and GBS CPSs..... | 116 |
| <b>Tableau SI.</b> Sequences of murine-specific real-time PCR primers.....           | 119 |

ARTICLE II: Antibody response specific to the capsular polysaccharide is impaired in *Streptococcus suis* serotype 2-infected animals

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau I.</b> Protein- and CPS-specific antibody titers after <i>S. suis</i> serotype 2 infection in mice and pigs and correlation with bacteremia ..... | 152 |
|--|-----|

## ANNEXES

ARTICLE VI: Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 14 capsular polysaccharide

|   |      |
|---|------|
| <b>Tableau I.</b> Size-exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering (SEC–MALS) data for the capsular polysaccharide (CPS) before and after mild acid hydrolysis ..... | Cxiv |
|---|------|

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau II.</b> Nuclear magnetic resonance (NMR) chemical shifts of the desialylated polysaccharide ..... | Cxv |
|--|-----|

|   |      |
|---|------|
| <b>Tableau III.</b> Nuclear magnetic resonance (NMR) chemical shifts of the native capsular polysaccharide (CPS)..... | Cxvi |
|---|------|

|  |         |
|--|---------|
| <b>Tableau SI.</b> Genes in the <i>cps</i> locus of <i>Streptococcus suis</i> serotype 14 encoding enzymes responsible for capsular polysaccharide (CPS) biosynthesis and similarity to genes of other bacteria..... | Cxxviii |
|--|---------|

# LISTE DES FIGURES

## REVUE DE LA LITTÉRATURE

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1.</b> Schéma simplifié des polysaccharides de la surface des bactéries Gram-positives .....   | 12 |
| <b>Figure 2.</b> Structures des CPS de GBS types Ia et Ib, <i>Neisseria meningitidis</i> groupes B et C, <i>E. Coli</i> type K1, et <i>S. pneumoniae</i> types 2, 3, 4, 6B, 14, 19F et 23F ..... | 14 |
| <b>Figure 3.</b> TLR et voies de signalisation .....   | 20 |
| <b>Figure 4.</b> Organisation des gènes du locus <i>cps</i> de <i>S. suis</i> types 2 et 14 et GBS types III et V .....  | 25 |
| <b>Figure 5.</b> Structures des CPS de <i>S. suis</i> types 2 et 14 et GBS types III et V .....  | 27 |
| <b>Figure 6.</b> Modèle des facteurs impliqués dans l'ontogénèse des LB .....  | 54 |
| <b>Figure 7.</b> Représentation schématique des réactions folliculaires et extrafolliculaires de la réponse humorale se déroulant au niveau de la rate .....                                     | 57 |
| <b>Figure 8.</b> Modèle des facteurs impliqués dans l'ontogénèse des DC.....   | 67 |
| <b>Figure 9.</b> Le système BAFF/APRIL .....   | 76 |

## MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

ARTICLE I: Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* capsular polysaccharides induce chemokine production by dendritic cells via Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent and -independent pathways

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 1.</b> Recognition of <i>S. suis</i> and GBS CPSs by dot-ELISA.....  | 107 |
| <b>Figure 2.</b> Recognition of <i>S. suis</i> and GBS CPSs by ELLA .....  | 108 |
| <b>Figure 3.</b> Pro- and anti-inflammatory cytokine production by DCs in response to stimulation by <i>S. suis</i> or GBS CPSs for 24 h ..... | 109 |
| <b>Figure 4.</b> Chemokine production by DCs in response to stimulation by <i>S. suis</i> or GBS CPSs for 24 h.....                            | 110 |
| <b>Figure 5.</b> CCL2 production by DCs in response to stimulation by <i>S. suis</i> type 2 CPS is dose and time dependent.....                | 111 |
| <b>Figure 6.</b> Role of TLR2 in chemokine production by DCs in response to stimulation by <i>S. suis</i> or GBS CPSs for 24 h .....           | 112 |
| <b>Figure 7.</b> Role of MyD88 in chemokine production by DCs in response to stimulation by <i>S. suis</i> or GBS CPSs for 24 h.....           | 113 |

**Figure 8.** Relative expression of BAFF mRNA by DCs in response to stimulation by *S. suis* or GBS CPSs for 24 h..... 114

**Figure 9.** Effect of pre-incubation of DCs with *S. suis* or GBS CPSs on IFN- $\gamma$ -induced expression of BAFF mRNA ..... 115

**Figure S1.** Nuclear magnetic resonance spectra of native and desialylated *S. suis* capsular polysaccharides ..... 117

**Figure S2.** Nuclear magnetic resonance spectra of native and desialylated GBS capsular polysaccharides ..... 118

ARTICLE II: Antibody response specific to the capsular polysaccharide is impaired in *Streptococcus suis* serotype 2-infected animals

**Figure 1.** Survival curve and blood bacteremia of wild-type (WT) and TLR2<sup>-/-</sup> mice after *S. suis* serotype 2 strain P1/7 primary infection ..... 144

**Figure 2.** Titration of protein-specific Abs of wild-type (WT) mice after *S. suis* serotype 2 strain P1/7 primary and secondary infections ..... 145

**Figure 3.** Titration of CPS-specific Abs of wild-type (WT) mice after *S. suis* serotype 2 strain P1/7 primary and secondary infections ..... 146

**Figure 4.** Correlation between protein-specific Ab response and bacteremia of wild-type (WT) mice after *S. suis* serotype 2 strain P1/7 primary infection..... 147

**Figure 5.** Survival curve, blood bacteremia and titration of protein- or CPS-specific Abs of wild-type (WT) mice after *S. suis* serotype 2 strain 89-1591 infection..... 148

**Figure 6.** Survival curve of wild-type (WT) mice after *S. suis* serotype 2 strain P1/7 secondary infection ..... 149

**Figure 7.** Titration of protein-specific Abs of pigs after *S. suis* serotype 2 strain 89-1591 primary infection ..... 150

**Figure 8.** Titration of CPS-specific Abs of pigs after *S. suis* serotype 2 strain 89-1591 primary infection ..... 151

**Figure S1A.** Titration of protein-specific Abs of wild-type (WT) and TLR2<sup>-/-</sup> mice after *S. suis* serotype 2 strain P1/7 primary infection ..... 153

**Figure S1B.** Titration of CPS-specific Abs of wild-type (WT) and TLR2<sup>-/-</sup> mice after *S. suis* serotype 2 strain P1/7 primary infection..... 154

ARTICLE III: Terminal sialic acid in Gram-positive bacterial capsular polysaccharides does not exert an immunosuppressive effect on the humoral response

**Figure 1.** Titration of CPS-specific Abs in mice after infection with *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V ..... 180

**Figure 2.** Titration of CPS-specific Abs in mice after immunization with purified native or desialylated *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS..... 181

**Figure 3.** Adjuvant effect of CpG on the CPS-specific humoral response in mice immunized with purified native or desialylated *S. suis* serotype 2 CPS or purified *S. pneumoniae* serotype 3 CPS (PS3) ..... 182

**Figure 4.** *In vitro* immunomodulatory effect of purified native *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS on BAFF/IL-4-induced Ig secretion by naïve B cells..... 183

**Figure 5.** *In vitro* immunomodulatory effect of purified native *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS on CpG-induced Ig secretion by naïve B cells ..... 184

**Figure 6.** *In vivo* immunomodulatory effect of purified native *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS on OVA-specific Ab response..... 185

**Figure S1.** Blood bacteremia of mice after infection with *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V ..... 186

**Figure S2.** Titration of CPS-specific Abs in mice after primary and secondary immunization with purified native or desialylated *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS..... 187

**Figure S3.** Adjuvant effect of CpG on the CPS-specific Ab response in mice immunized with purified *S. pneumoniae* serotype 3 CPS (PS3)..... 188

**Figure S4.** *In vitro* immunomodulatory effect of purified native or desialylated *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS on BAFF/IL-4-induced Ig secretion by naïve B cells ..... 189

**Figure S5.** *In vitro* immunomodulatory effect of purified native or desialylated *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS on CpG-induced Ig secretion by naïve B cells ..... 190

## DISCUSSION

**Figure 10.** Titration des Ac anti-CPS (A) et anti-protéine (B) chez les souris sauvages (WT) et CD4<sup>-/-</sup> après infections primaire et secondaire par *S. suis* type 2 ..... 199

**Figure 11.** Modèle proposé des mécanismes du développement de la réponse humorale dirigée contre les CPS de *S. suis* et GBS ..... 224

## ANNEXES

ARTICLE V: *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen?

**Figure 1.** Proposed hypotheses for the different steps involved in the pathogenesis of meningitis due to *Streptococcus suis* serotype 2 ..... lxxvi

**Figure 2.** Number of publications on *Streptococcus suis* and of *S. suis*-related human cases per year from January 1989 to November 2009 as cited by PubMed and ScienceDirect databases..... lxxviii

ARTICLE VI: Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 14 capsular polysaccharide

**Figure 1.** Enzyme-linked lectin assay (ELLA) of *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) lectin or *Limax flavus* agglutinin (LFA) binding to purified native capsular polysaccharide (native CPS) and mild acid-hydrolyzed polysaccharide (acid treated PS) ..... cix

**Figure 2.** One-dimensional  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance (NMR) spectra ..... cx

**Figure 3.** Portion of the 500.1 MHz total correlation spectroscopy (TOCSY) spectrum ..... cxi

**Figure 4.** Portion of the 700.3 MHz heteronuclear single-quantum coherence spectrum ..... cxii

**Figure 5.** Tentative correlation between structure and genes encoding glycosyltransferases (black arrows) and polymerase (white arrow) responsible for the biosynthesis of *Streptococcus suis* serotype 14 capsular polysaccharide (CPS) .... cxiii

**Figure S1.** Size-exclusion chromatograms with multi-angle light scattering (MALS) and refractive index (RI) detection ..... cxvii

**Figure S2.** Regions of the 176.1 MHz one-dimensional  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of the desialylated polysaccharide in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at 74 °C .... cxviii

**Figure S3.** Portion of the 500.1 MHz correlation spectroscopy (COSY) spectrum .. cxix

**Figure S4.** Portion of the 500.1 MHz rotating-frame nuclear Overhauser effect spectroscopy without total correlation spectroscopy (T-ROESY) spectrum ..... cxx

**Figure S5.** Portion of the 700.3 MHz heteronuclear single-quantum coherence total correlation spectroscopy (HSQC–TOCSY) spectrum ..... cxxi

**Figure S6.** Portions of the 700.3 MHz heteronuclear multiple-bond coherence (HMBC) spectrum showing correlations to anomeric protons (A) and from anomeric carbons (B) ..... cxxii

**Figure S7.** Portions of the 700.3 MHz total correlation spectroscopy (TOCSY) spectrum ..... cxxiii

**Figure S8.** Portion of the 700.3 MHz heteronuclear single-quantum coherence (HSQC) spectrum ..... cxxiv

**Scheme S1.** Reaction scheme for the preparation of the oligosaccharide ..... cxxv

**Figure S9.** Mass spectra of the oligosaccharide obtained by Smith degradation of the oxidized-reduced polysaccharide ..... cxxvi

**Figure S10.** Structures of pathogenic streptococci capsular polysaccharides (CPSs) having features in common with that of *Streptococcus suis* serotype 14 ..... cxxvii

ARTICLE VII: The NOD2 receptor does not play a major role in the pathogenesis of Group B *Streptococcus* in mice

**Figure 1.** Absence of NOD2 receptor does not alter mouse susceptibility to GBS infection..... cxlii

**Figure 2.** *Ex-vivo* production of pro-inflammatory cytokines and chemokines is reduced in NOD2<sup>-/-</sup> mice infected with GBS..... cxliii

**Figure 3.** Serum pro-inflammatory cytokine production is reduced in NOD2<sup>-/-</sup> mice infected with GBS..... cxliv

**Figure 4.** CD69 expression by T and B cells is not significantly altered in GBS-infected NOD2<sup>-/-</sup> mice..... cxlv

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

|               |   |
|---------------|---|
| <b>Ab</b>     | « antibody »                                      |
| <b>abpb</b>   | « amylase-binding protein B »                     |
| <b>Ac</b>     | anticorps   |
| <b>ACP</b>    | « alpha C protein »                               |
| <b>Ag</b>     | antigène  |
| <b>AID</b>    | « activation-induced cytidine deaminase »         |
| <b>AP1</b>    | « activator protein 1 »                           |
| <b>APC</b>    | cellule présentatrice d'antigènes                 |
| <b>APRIL</b>  | « a proliferation-inducing ligand »               |
| <b>ASC</b>    | cellule sécrétrice d'anticorps                    |
| <b>BAFF</b>   | « B cell-activating factor of the TNF family »    |
| <b>BAFF-R</b> | « BAFF receptor »                                 |
| <b>BCMA</b>   | « B cell maturation antigen »                     |
| <b>BCP</b>    | « beta C protein »                                |
| <b>BCR</b>    | récepteur des lymphocytes B                       |
| <b>BMEC</b>   | cellule endothéliale microvasculaire du cerveau   |
| <b>Btk</b>    | tyrosine kinase de Bruton                         |
| <b>CARD</b>   | « caspase-activation and recruitment domain »     |
| <b>CCL</b>    | « chemokine ligand »                              |
| <b>cDC</b>    | cellule dendritique conventionnelle               |
| <b>CDP</b>    | progéniteur commun des cellules dendritiques      |
| <b>CFA</b>    | adjuvant complet de Freund                        |
| <b>CLP</b>    | progéniteur lymphoïde commun                      |
| <b>CLR</b>    | récepteur lectine de type C                       |
| <b>CMH-II</b> | complexe majeur d'histocompatibilité de classe II |
| <b>CMP</b>    | progéniteur myéloïde commun                       |
| <b>CPEC</b>   | cellule épithéliale du plexus choroïdien          |
| <b>CPS</b>    | capsule polysaccharidique                         |
| <b>CR</b>     | récepteur du complément                           |
| <b>CRD</b>    | « carbohydrate-recognition domain »               |
| <b>CRP</b>    | « C-reactive protein »                            |
| <b>CSR</b>    | commutation de classe                             |
| <b>CTLA-4</b> | « cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 »   |
| <b>DC</b>     | cellule dendritique                               |

|                |   |
|----------------|---|
| <b>DC-SIGN</b> | « dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin »  |
| <b>DNGR1</b>   | « dendritic cell natural killer lectin group receptor 1 » |
| <b>DNP</b>     | dinitrophénol   |
| <b>EF</b>      | « extracellular factor »                                  |
| <b>ELLA</b>    | « enzyme-linked lectin assay »                            |
| <b>EOD</b>     | « early onset disease »                                   |
| <b>Fc</b>      | fragment constant   |
| <b>FLT3</b>    | « fms-related tyrosine kinase 3 »                         |
| <b>FO</b>      | folliculaire  |
| <b>Gal</b>     | galactose   |
| <b>GBS</b>     | <i>Streptococcus</i> du groupe B                          |
| <b>Glc</b>     | glucose   |
| <b>GlcNAc</b>  | <i>N</i> -acétylglucosamine                               |
| <b>HP0197</b>  | « hypothetical protein 0197 »                             |
| <b>HSC</b>     | cellule souche hématopoïétique                            |
| <b>HSPG</b>    | « heparan sulfate proteoglycans »                         |
| <b>HUVEC</b>   | cellule endothéliale humaine de la veine ombilicale       |
| <b>ICOS</b>    | « inducible T-cell costimulator »                         |
| <b>Ig</b>      | immunoglobuline   |
| <b>IL</b>      | interleukine  |
| <b>IP3</b>     | inositol triphosphate                                     |
| <b>IRAK</b>    | « IL-1 receptor-associated kinase »                       |
| <b>IRF</b>     | « IFN regulator factor »                                  |
| <b>ITAM</b>    | « immunoreceptor tyrosine-based activating motif »        |
| <b>ITIM</b>    | « immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif »        |
| <b>LB</b>      | lymphocyte B  |
| <b>LOD</b>     | « late onset disease »                                    |
| <b>LOS</b>     | lipooligosaccharide                                       |
| <b>LPS</b>     | lipopolysaccharide  |
| <b>LRR</b>     | « leucine rich repeats »                                  |
| <b>LrrG</b>    | « leucine-rich repeat group B protein»                    |
| <b>Lsc</b>     | « lymphoid blast crisis second cousin »                   |
| <b>LT(reg)</b> | lymphocyte T (régulateur)                                 |
| <b>LTA</b>     | acide lipotéichoïque                                      |
| <b>MALT</b>    | tissu lymphoïde associé aux muqueuses                     |
| <b>MAPK</b>    | « mitogen-activated protein kinases »                     |
| <b>MARCO</b>   | « macrophage receptor with a collagenous structure »      |



|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>MCP-1</b>                    | « monocyte chemotactic protein 1 »                                     |
| <b>mlg</b>                      | immunoglobuline membranaire  |
| <b>MIP-1<math>\alpha</math></b> | « macrophage inflammatory protein 1 alpha »                            |
| <b>MLST</b>                     | « multilocus sequence typing »   |
| <b>MR</b>                       | récepteur au mannose   |
| <b>MRP</b>                      | « muraminidase-released protein »                                      |
| <b>MyD88</b>                    | « myeloid differentiation primary response gene 88 »                   |
| <b>MZ</b>                       | zone marginale   |
| <b>NCAM</b>                     | « neuronal cell adhesion »   |
| <b>Neu5Ac</b>                   | acide <i>N</i> -acétylneuraminique                                     |
| <b>Neu5Gc</b>                   | acide <i>N</i> -glycolylneuraminique                                   |
| <b>NF-<math>\kappa</math>B</b>  | « nuclear factor kappa B »   |
| <b>NKT</b>                      | « natural killer T cell »  |
| <b>NLR</b>                      | « nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors » |
| <b>NLRP</b>                     | « NLR protein »  |
| <b>NO</b>                       | oxyde nitrique   |
| <b>NOD</b>                      | « nucleotide-binding and oligomerization domain »                      |
| <b>PAMP</b>                     | « pathogen associated molecular patterns »                             |
| <b>PAPI</b>                     | « pilus ancillary protein of island 2b »                               |
| <b>PBMC</b>                     | cellule mononucléaire du sang périphérique                             |
| <b>pDC</b>                      | cellule dendritique plasmacytoïde                                      |
| <b>PG</b>                       | peptidoglycane   |
| <b>PhC</b>                      | phosphorylcholine  |
| <b>PI-3K</b>                    | phosphoinositide 3-kinase  |
| <b>PIP2</b>                     | phosphatidylinositol (4,5)- bisphosphate                               |
| <b>PIP3</b>                     | phosphatidylinositol (3,4,5)- trisphosphate                            |
| <b>PKC</b>                      | protéine kinase C  |
| <b>PRR</b>                      | « pattern recognition receptors »                                      |
| <b>PS3</b>                      | capsule polysaccharidique de <i>S. pneumoniae</i> type 3               |
| <b>PspA</b>                     | « pneumococcal surface protein A »                                     |
| <b>PTK</b>                      | protéine tyrosine kinase   |
| <b>PYD</b>                      | « pyrin domain »   |
| <b>Pyk-2</b>                    | pyruvate kinase 2  |
| <b>rag</b>                      | « recombination-activating genes »                                     |
| <b>Rib</b>                      | « resistance to proteases, immunity, group B protein »                 |
| <b>RNS</b>                      | dérivé réactif du nitrogène  |
| <b>ROS</b>                      | dérivé réactif de l'oxygène  |

|                |  |
|----------------|--|
| <b>Sao</b>     | « surface antigen one »  |
| <b>Sat</b>     | « surface antigen two »  |
| <b>ScpB</b>    | « streptococcal C5a peptidase of GBS »                               |
| <b>scid</b>    | « severe combined immune deficiency »                                |
| <b>Siglecs</b> | « sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins »                  |
| <b>Sip</b>     | « surface immunogenic protein »                                      |
| <b>SNC</b>     | système nerveux central  |
| <b>SR-A</b>    | « scavenger receptor A »   |
| <b>ssRNA</b>   | ARN simple brin  |
| <b>TACI</b>    | « transmembrane activator and calcium modulator »                    |
| <b>TAP</b>     | « transporters associated with antigen processing »                  |
| <b>TCR</b>     | récepteur des lymphocytes T  |
| <b>TD</b>      | thymo-dépendant  |
| <b>Th</b>      | « T helper »   |
| <b>TI</b>      | thymo-indépendant  |
| <b>TIR</b>     | Toll/IL-1R   |
| <b>TIRAP</b>   | « TIR domain-containing adapter protein »                            |
| <b>TLR</b>     | « Toll-like receptors »  |
| <b>TNF</b>     | « tumor necrosis factor »  |
| <b>TNP</b>     | trinitrophenol   |
| <b>TRAF</b>    | « TNF receptor-associated factor »                                   |
| <b>TRAM</b>    | « TRIF-related adapter molecule »                                    |
| <b>TRIF</b>    | « TIR domain-containing adapter inducing interferon (IFN)- $\beta$ » |
| <b>TSLS</b>    | « toxic shock-like syndrome »  |
| <b>TT</b>      | toxoïde tétanique  |
| <b>WT</b>      | parental/sauvage   |
| <b>xid</b>     | « X-linked immunodeficiency »  |
| <b>ZPS</b>     | CPS zwitterionique   |

# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué directement ou indirectement à mon projet de doctorat, et en particulier :

Ma directrice Dre Mariela Segura. Je vous remercie tout d'abord de m'avoir accueillie au Québec et dans votre laboratoire. Mais merci surtout pour votre encadrement et votre disponibilité dont tout étudiant au doctorat rêverait de pouvoir bénéficier. Et merci pour votre confiance, vos encouragements et votre appui qui ont été déterminants durant ces six années de doctorat très « challengentes » et on ne peut plus enrichissantes, tant sur le plan professionnel que personnel.

Mon co-directeur Dr Marcelo Gottschalk pour sa supervision et sa grande disponibilité. Ce fut un vrai privilège de pouvoir bénéficier de vos conseils tout au long de mon PhD.

Ma co-directrice Dre Marie-Rose Van Calsteren, merci de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire au CRDA. Merci pour vos précieux conseils, pour les discussions scientifiques et votre disponibilité.

Le Dr Thierry Defrance pour m'avoir permis d'effectuer un stage au sein de son laboratoire au CIRI à Lyon.

Les membres de mon comité conseil et de différents jurys : Dre Marie Archambault, Dr Charles Dozois, Dr Daniel Dubreuil, Dr Philippe Fravalo, Dr Martin Lessard, Dr Michael Mourez, Dr René Roy.

Sonia Lacouture, assistante de recherche du Dr Marcelo Gottschalk, pour ses conseils et son aide précieuse.

Fleur Gagnon, assistante de recherche du Dre Marie-Rose Van Calsteren, pour son aide tout aussi indispensable au CRDA.

Tous mes collègues, présents et passés dont l'amitié, l'aide et le soutien ont joué un rôle indéniable dans mon parcours, et en particulier MaryCruz, Claude, Marie-

Pier, Guillaume, Jean-Philippe, Corinne, David et Gaël. Un énorme merci à toi Paul pour avoir été un collègue de travail « en or », pour ton aide inconditionnelle, ton support moral et ta gentillesse. Ton amitié m'est très précieuse et j'espère sincèrement que nos chemins se recroiseront.

Tous les professeurs et membres du GREMIP, du CRIPA et de la faculté de Médecine Vétérinaire. Merci à Claudia Duquette pour son aide au laboratoire et sa bonne humeur. Merci aussi pour l'aide précieuse et chaleureuse de Micheline St-Germain, Hélène Boucher-Rhéaume, Diane Rodier, Christine Blondin, Nancy Bisailon, Manon Coutellier et Isabelle Flibotte.

Mes amis, ma famille, mes parents Chantal et Jacques et ma sœur Sonia, pour leur confiance et leurs encouragements.

Au long de mon doctorat, j'ai eu l'opportunité de recevoir des bourses des organismes suivants: CRIPA, FQRNT, Faculté des Etudes supérieures et Postdoctorales de l'Université de Montréal.

# **I – INTRODUCTION**

Les infections par les bactéries encapsulées causent de sérieux problèmes en médecine humaine et/ou vétérinaire à travers le monde, et parmi ces micro-organismes, on compte *Streptococcus suis* et *Streptococcus* du groupe B (GBS). Ces deux streptocoques Gram-positifs sont à l'origine de pathologies similaires, incluant des septicémies et des méningites. *S. suis* est un pathogène majeur chez le porc, responsable de pertes économiques importantes pour l'industrie porcine, ainsi qu'un agent zoonotique. Il a été longtemps considéré comme étant seulement à l'origine de cas d'infection isolés chez les professionnels en contact étroit avec les porcs ou leurs produits dérivés. Cependant, deux épidémies humaines en Chine, avec un taux de décès élevé, ont mis en lumière le fait que la bactérie constitue une menace sérieuse en santé publique. GBS est un pathogène humain qui représentait la cause majeure de septicémies et méningites néonatales dans les années 1970-1980. Malgré un déclin significatif suite à l'instauration de stratégies nationales basées sur l'antibioprophylaxie dans les pays développés, GBS demeure toujours une cause importante d'infections chez les nouveau-nés. De plus, l'incidence de la maladie causée par ce pathogène s'accroît maintenant considérablement chez l'adulte, et en particulier chez les personnes âgées. Parmi les 35 sérotypes de *S. suis* et les 10 sérotypes de GBS décrits à ce jour, *S. suis* types 2 et 14 et GBS types III et V font partie des sérotypes les plus fréquemment isolés et les plus virulents.

Une molécule centrale dans l'immunopathogénèse de *S. suis* et GBS est la capsule polysaccharidique (**CPS**). En plus d'être à la base du sérotypage, la CPS est un facteur de virulence clé de ces deux bactéries, en les protégeant notamment de la réponse immunitaire de l'hôte. Toutefois, la CPS semblerait moduler différemment l'interaction de ces deux streptocoques avec les cellules immunitaires. Alors que les structures des CPS de GBS types III et V sont connues depuis le début des années 1990, celles des CPS de *S. suis* types 2 et 14 ont été déterminées seulement au cours des cinq dernières années. Ces quatre CPS partagent certains éléments dans leurs compositions et leurs structures et se distinguent par la présence d'acide sialique, une caractéristique unique parmi les CPS des bactéries Gram-positives. Toutefois, chacune de ces CPS est constituée d'un arrangement unique de monosaccharides, et la liaison osidique de l'acide sialique diffère entre les deux espèces bactériennes. Il a été suggéré que l'expression d'acide sialique par les pathogènes pouvait représenter une stratégie d'évasion immunitaire, cette molécule étant également exprimée à la surface de la majorité des cellules des mammifères, contribuant notamment au maintien de l'homéostasie. La spécificité de reconnaissance pour le type de lien que fait l'acide sialique avec le sucre adjacent par des récepteurs exprimés à la surface

des leucocytes est susceptible d'être reliée à une fonction biologique particulière. Ainsi, l'expression différentielle d'acide sialique par les CPS de *S. suis* et GBS pourrait résulter en une modulation distincte de l'activation des cellules immunitaires de l'hôte par ces deux pathogènes.

Outre son rôle dans la pathogénèse, la CPS constitue une cible antigénique prometteuse de l'immunité humorale dans la lutte contre les infections à *S. suis* et GBS. En effet, les anticorps (Ac) dirigés contre les CPS de ces deux streptocoques présentent un bon potentiel protecteur *in vitro* dans les tests bactéricides et *in vivo* lorsqu'ils sont administrés passivement chez l'animal avant un challenge bactérien. Toutefois, aucun vaccin commercial n'est encore disponible contre ces deux pathogènes, et l'efficacité des prototypes vaccinaux composés de la CPS purifiée de GBS testés en essais cliniques chez l'homme varie selon le sérotype inclus dans la préparation. Un obstacle majeur dans l'élaboration de vaccins à base de CPS est lié à l'immunogénicité limitée de ces molécules. Par exemple, on détecte peu d'Ac anti-CPS chez les porcs infectés par *S. suis* type 2, et les femmes qui donnent naissance à des nourrissons développant une infection à GBS type III ont des taux sanguins bas d'Ac anti-CPS.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la réponse humorale dirigée spécifiquement contre la CPS, et notamment contre celles de *S. suis* et GBS, restent un domaine très méconnu de l'immunologie, ce qui peut représenter un frein notable au développement de vaccins efficaces contre les bactéries encapsulées. La faible capacité des CPS à induire une réponse Ac s'explique, du moins en partie, par leur inaptitude à recruter l'aide des lymphocytes T (LT) durant la mise en place de la réponse humorale, les catégorisant comme étant des antigènes (Ag) « thymo-indépendants » (TI). Bien que nos connaissances soient encore assez limitées, il est généralement admis qu'en plus des lymphocytes B (LB), l'intervention de cellules auxiliaires, en particulier les cellules dendritiques (DC), est capitale dans la génération des réponses humorales TI. Ces cellules de l'immunité innée jouent un rôle clé de sentinelle de l'organisme du fait de leur capacité à déceler la présence des pathogènes via l'expression d'un large éventail de récepteurs spécifiques pour des motifs conservés des micro-organismes, tels que les récepteurs « Toll-like » (TLR). Ces cellules ne se contentent pas de détecter les microbes, elles tiennent aussi un rôle central dans l'orchestration des réponses immunitaires adaptatives, et notamment humorales. Dans le contexte des réponses Ac TI, les DC fourniraient un signal clé aux LB via la sécrétion de certaines cytokines qui pourraient se substituer à l'aide apportée

par les LT durant les réponses humorales thymo-dépendantes (TD). Finalement, il a été suggéré que les agonistes des TLR pourraient aussi potentialiser les réponses humorales TI.

Bien que des progrès aient été faits dans la compréhension des mécanismes de la réponse humorale TI, principalement grâce à l'utilisation d'Ag TI synthétiques, l'influence de la biochimie des CPS sur la génération de cette réponse était un domaine négligé de la glycoimmunologie au début de ce projet de thèse. En particulier, l'effet potentiellement immunomodulateur des constituants de la CPS, comme par exemple l'acide sialique, sur la qualité de la réponse Ac induite est méconnu.

- L'**hypothèse** de cette thèse est que la biochimie de la CPS, et notamment la présence d'acide sialique, module l'activation des cellules immunitaires impliquées dans le développement de la réponse humorale, et par extension, dans l'efficacité de la réponse Ac anti-CPS induite.
- L'**objectif général** est d'évaluer les caractéristiques et les mécanismes du développement de la réponse Ac dirigée spécifiquement contre les CPS de *S. suis* (types 2 et 14) et GBS (types III et V), ainsi que l'effet de la présence de l'acide sialique dans cette réponse.

1. Le **premier objectif** est d'étudier les caractéristiques de la réponse humorale anti-CPS au cours de l'infection par *S. suis* types 2 et 14 et GBS types III et V.

- Cet objectif se concentre plus particulièrement à évaluer la nature (cinétique, magnitude et composition isotypique) de la réponse Ac anti-CPS sérique chez la souris et/ou le porc infectés par des souches vivantes virulentes de ces pathogènes.

2. Le **deuxième objectif** est d'étudier l'influence des propriétés biochimiques intrinsèques de la CPS sur le développement de la réponse humorale anti-CPS. Pour cela, les expériences sont conduites avec des CPS hautement purifiées de *S. suis* types 2 et 14 et GBS types III et V.

- Dans un premier temps, cet objectif se concentre plus particulièrement à évaluer la nature de la réponse Ac anti-CPS sérique chez la souris après immunisation avec la CPS purifiée de ces pathogènes.
- Dans un second temps, cet objectif se concentre plus particulièrement à évaluer l'effet immunomodulateur de la CPS sur les acteurs de la réponse



humorale. Pour cela, l'interaction de la CPS purifiée de ces pathogènes avec les DC (évaluation de la réponse inflammatoire et du rôle des TLR) et les LB murins (évaluation de la sécrétion d'immunoglobulines (Ig)) est analysée *in vitro*.

- Dans un troisième temps, cet objectif se concentre plus particulièrement à évaluer le rôle de l'acide sialique sur l'effet immunomodulateur de la CPS *in vivo* et *in vitro* grâce à l'utilisation de la CPS purifiée chimiquement désialylée de ces pathogènes.

## **II – REVUE DE LA LITTÉRATURE**

# 1. L'immunopathogénèse de l'infection à *Streptococcus suis* et *Streptococcus* du groupe B (GBS)

## 1.1. Aspects généraux

### 1.1.1. Historique et épidémiologie

#### 1.1.1.1. *S. suis*

*S. suis* a été isolé pour la première fois chez le porc au début des années 1950 et est considéré depuis comme étant un pathogène majeur de cette espèce, responsable de pertes économiques importantes pour l'industrie porcine (1). Chez l'homme, le premier cas a été signalé au Danemark en 1968 (2) et plus de 1600 cas ont été rapportés depuis, apparaissant généralement de façon sporadique (3). Toutefois, deux grandes épidémies en Chine, en 1998 et en 2005, affectant plus de 200 personnes et causant plus de 50 décès, ont attiré l'attention de la communauté scientifique et des professionnels de la santé, et on estime maintenant que *S. suis* est un agent zoonotique à surveiller [(4) + **ANNEXE, ARTICLE V**]. En particulier, l'infection à *S. suis* chez l'homme est devenue un important problème de santé publique en Asie, la bactérie étant la première cause de méningite chez l'adulte au Vietnam, la seconde en Thaïlande et la troisième à Hong Kong. Bien que *S. suis* soit principalement un pathogène du porc et de l'homme, il a aussi été isolé chez d'autres espèces animales telles que les ruminants, les chevaux, les chats et les chiens (5).

La classification actuelle de cette bactérie Gram-positif encapsulée est basée sur les différences antigéniques de la CPS, et 35 sérotypes ont été décrits à ce jour, à savoir 1, 1/2, 2 à 34. Toutefois, l'appartenance des sérotypes 20, 22, 26, 32, 33 et 34 à l'espèce *S. suis* est remise en question (3). À côté du sérotypage par l'utilisation d'antisérum de référence et/ou par PCR (« polymerase chain reaction ») ciblant les gènes du locus *cps*, l'analyse par MLST (« multilocus sequence typing ») est une méthode d'identification complémentaire qui révèle la grande diversité génétique des souches de *S. suis* à l'intérieur des différents sérotypes (3). Une étude répertoriant les cas cliniques de *S. suis* chez le porc à travers le monde de 2002 à 2013 conclut que le sérotype 2 est le plus fréquemment isolé (28%), suivi des sérotypes 9 (19%) et 3 (16%) (3). La distribution des sérotypes peut varier selon les régions du globe et par exemple, dans certains pays d'Europe comme l'Espagne et les Pays-Bas, le sérotype

9 est principalement isolé chez les animaux malades (61%), loin devant le sérotype 2 (18%). Les cas cliniques humains rapportés mondialement jusqu'en 2013 sont causés très majoritairement par le sérotype 2 (76%) puis, dans une moindre mesure, par le sérotype 14 (2%) (3). Ils sont répertoriés presque exclusivement en Asie (90%) puis en Europe (9%) incluant les Pays-Bas, la France, le Royaume-Uni et l'Espagne. Au Canada, seulement 5 cas ont été rapportés jusqu'à maintenant (3).

#### 1.1.1.2. GBS

*Streptococcus* du groupe B (GBS) ou *Streptococcus agalactiae* a été identifié pour la première fois en 1887 comme un agent responsable de la mammite bovine (6). Les premières études relatant la présence de GBS chez l'humain datent des années 1930 et depuis, cette bactérie est surtout considérée comme étant un pathogène pour l'humain (7). Les rapports de cas à GBS étaient sporadiques pendant des décennies jusqu'aux années 1970-1980, où le pathogène a alors été décrit comme étant la cause majeure de septicémies et méningites néonatales dans la plupart des pays développés. Outre les nouveau-nés, où l'infection apparaît sous forme précoce (EOD : « early onset disease », jusqu'à 6 jours d'âge) ou tardive (LOD : « late onset disease », de 7 jours à 3 mois d'âge), les femmes enceintes et les personnes âgées représentent deux autres populations à risque. Suite à la mise en place de stratégies de prévention basées sur l'antibioprophylaxie intrapartum dans les années 1990, un déclin significatif de la EOD chez les nouveau-nés a été observé, mais le pathogène demeure toujours une cause importante d'infections néonatales (8). De plus, l'incidence des cas néonataux à GBS dans certains pays en voie de développement pourrait être plus grande que celle des pays développés (7). Contrairement à la tendance stable et/ou à la baisse des cas de GBS chez les nouveau-nés et les femmes enceintes dans les pays développés, l'incidence de la maladie chez l'adulte s'accroît considérablement. Si on prend l'exemple des USA, il s'agit d'une augmentation de plus de 30% de 1999 à 2005, et les personnes âgées (de plus de 65 ans) comptent pour plus de 40% des personnes malades, loin devant les nouveau-nés, ainsi que pour plus de la moitié des décès associés à GBS (9).

GBS est une bactérie Gram-positive qui peut être classée en 10 sérotypes, à savoir Ia, Ib et II-IX selon les différences d'antigénicité de leurs CPS. Tout comme pour *S. suis*, l'analyse par MLST est un outil épidémiologique précieux pour la surveillance mondiale de cette bactérie. Une étude répertoriant les cas cliniques de GBS à travers le monde de 1980 à 2011 démontre que les sérotypes III (49%), Ia (23%), V (9%), Ib

(7%) et II (6%) sont les plus fréquemment isolés chez les nouveau-nés (10). Les sérotypes Ia, III et II sont prédominants dans la EOD, tandis que les sérotypes III, Ia et V sont caractéristiques de la LOD (10). Les sérotypes affectant les femmes enceintes sont similaires à ceux de la LOD (7). Chez l'adulte « non enceinte » et les personnes âgées, les cas cliniques à GBS sont principalement dus au sérotype V, puis aux sérotypes Ia et III (11, 12). Le sérotype III est le plus fréquemment isolé des cas de méningite (9). Tout comme pour *S. suis*, la distribution des sérotypes causant la maladie peut varier selon les régions du globe. Alors que les principaux sérotypes circulant en Occident sont Ia, Ib, II, III et V (13, 14), les sérotypes VI et VIII seraient prédominants au Japon (15).

### **1.1.2. Transmission et maladies**

#### **1.1.2.1. *S. suis***

Chez le porc, *S. suis* colonise le plus souvent les voies respiratoires supérieures, en particulier les amygdales et les cavités nasales, mais il peut aussi se retrouver au niveau du tractus gastrointestinal et des voies génitales (1). Près de 100% des fermes porcines à travers le monde hébergent des porcs colonisés par *S. suis*, ces derniers pouvant toutefois rester des porteurs asymptomatiques toute leur vie (3, 16). Les porcs peuvent abriter différentes souches de *S. suis* appartenant à un même sérotype, voire même à des sérotypes différents (17). La bactérie peut affecter les porcs de tous âges, toutefois la maladie apparaît le plus souvent avant 12 semaines d'âge (18). La transmission de *S. suis*, principalement par voie respiratoire, peut se faire verticalement, lorsque la truie hébergeant la bactérie au niveau du tractus génital contamine les porcelets au moment de la mise bas, et horizontalement, après la naissance, lors d'un contact étroit du porcelet avec la truie ou d'autres porcelets abritant le pathogène (1). Par des mécanismes qui restent encore mal compris, la bactérie peut franchir les barrières muqueuses de l'hôte, se disséminer via la lymphe ou le sang et devenir hautement invasive (19). *S. suis* est principalement responsable de septicémie, méningite, arthrite et endocardite et peut conduire à la mort (1, 5). Les premiers signes de l'infection consistent, entre autres, en l'anorexie, la dépression et une fièvre élevée. Après plusieurs jours, les animaux infectés peuvent présenter des signes neurologiques incluant opisthotonos, décubitus latéral, ataxie et convulsions (1, 5). L'incidence de la maladie est très variable d'un troupeau à l'autre et peut aussi varier dans le temps à l'intérieur d'un même troupeau. Les pratiques liées à l'hébergement des animaux comme le surpeuplement, une température excessive

ainsi que la présence d'autres pathogènes comme le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin ont été suggérées comme étant des facteurs prédisposant les porcs à l'infection par *S. suis* (5, 20-22).

La contamination chez l'homme se fait principalement via des petites coupures de la peau et au niveau des muqueuses nasales et de la bouche, mais aussi possiblement par voie orale suite à l'ingestion de nourriture contaminée (4). La plupart des cas sont rapportés chez des personnes en contact direct avec les porcs ou des produits dérivés, incluant les éleveurs, les bouchers et les vétérinaires. Tout comme chez le porc, l'homme peut être un porteur asymptomatique principalement au niveau du tractus respiratoire supérieur. Les manifestations cliniques de la maladie les plus communes sont la méningite puis la septicémie, mais on peut observer aussi, entre autres, l'endocardite, la pneumonie et la péritonite (4). Lors des deux épidémies en Chine, la présentation clinique de l'infection était toutefois différente avec une incidence élevée de la maladie systémique, dont les symptômes étaient apparentés à un syndrome de choc toxique (TSL : « toxic shock-like syndrome »), liée à une réponse inflammatoire suraiguë, un taux élevé de mortalité et des cas de méningite proportionnellement moins nombreux (4). La splénectomie, l'alcoolisme et le diabète sucré pourraient être des facteurs de prédisposition à la maladie (4).

#### **1.1.2.2. GBS**

Environ 10 à 40% des adultes, incluant les femmes enceintes, sont porteurs de GBS, principalement au niveau des voies gastro-intestinales et génito-urinaires, de manière transitoire, intermittente ou permanente, et le plus souvent de façon asymptomatique (23). Les maladies causées par GBS chez la femme enceinte et en post-partum peuvent être des infections du tractus urinaire et génital (cystite, pyélonéphrite, vaginite, endométrite), la bactériémie, la septicémie et, dans de très rares cas, la méningite (24). Les facteurs de risques suggérés pour la colonisation et/ou la maladie à GBS pourraient être une sexualité active, l'ethnicité, ou l'obésité (7).

La transmission de la bactérie de la mère au bébé peut se faire verticalement *in utero*, le plus souvent après rupture de la poche des eaux, mais aussi à travers la membrane intacte, ainsi que par inhalation ou contact lors du passage dans la filière génitale au cours de l'accouchement. La transmission peut aussi être horizontale après la naissance par contact du bébé avec une personne colonisée ou transitoirement contaminée (23). Dans les pays développés, la grande majorité des nouveau-nés

colonisés par GBS demeurent en bonne santé, mais 1 à 3% d'entre eux peuvent développer une maladie invasive (23). Chez les nouveau-nés, la EOD est la forme prédominante de la maladie et se caractérise par une pneumonie fulminante, une septicémie et, plus rarement, une méningite (23). Le facteur de risque majeur est la colonisation génitale maternelle, cette forme de maladie à GBS étant transmise verticalement. La prématurité, un faible taux d'Ig anti-CPS lié à un faible transfert transplacentaire et la rupture prolongée de la poche des eaux sont également associés au risque de la EOD (7, 23). Les enfants développant la LOD présentent une bactériémie et, dans un quart des cas, une méningite qui laisse souvent des séquelles neurologiques permanentes chez les survivants comme des déficits auditifs et la cécité. Contrairement à la EOD, la LOD est acquise horizontalement, mais les facteurs de risque ne sont pas encore bien compris (7, 24).

Finalement, chez les adultes non enceintes, l'âge (65 ans et plus) et les conditions médicales sous-jacentes, comme le diabète et les maladies pulmonaires, sont des facteurs de risque majeurs. Les manifestations cliniques les plus communes sont les infections de la peau et des tissus mous et, plus particulièrement pour les personnes âgées, la pneumonie et les infections urinaires (11).

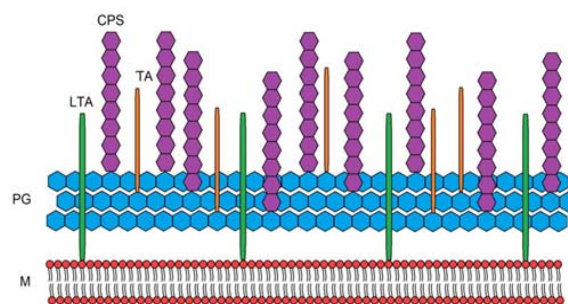
➤ En plus de servir au sérotypage de *S. suis* et GBS, la CPS joue un rôle majeur dans la physiopathologie de ces deux bactéries. Avant de détailler les étapes de la pathogénèse de ces deux micro-organismes, nous allons définir les caractéristiques biochimiques et biologiques générales de la CPS, une molécule centrale à ce projet de thèse.

### 1.1.3. La capsule polysaccharidique (CPS)

Les bactéries produisent différents types de polysaccharides exprimés à la surface du pathogène sous forme de glycoconjugués (glycoprotéines, glycolipides), mais aussi sécrétés (25, 26) (voir **Figure 1**). Au niveau de la paroi, plusieurs polysaccharides contribuent au maintien de l'intégrité physique de la bactérie incluant le peptidoglycane (PG), constitué de chaînes de polysaccharides composées d'acide *N*-acétylmuraminique et de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), qui sont reliées par des oligopeptides au niveau de l'acide *N*-acétylmuraminique. Les bactéries Gram-positives expriment aussi l'acide téichoïque, lié de façon covalente au PG, et l'acide

lipotéichoïque (LTA), attaché à une extension glycolipidique de la membrane cytoplasmique. Ce sont deux polysaccharides composés de glycérol phosphate ou de ribitol phosphate. Finalement, les bactéries Gram-négatives synthétisent aussi le lipooligosaccharide (LOS) ou le lipopolysaccharide (LPS), un puissant immunostimulateur qui forme une barrière hydrophilique contre certains antibiotiques. Le LPS est une molécule constituée de l'Ag-O, un polysaccharide propre à chaque souche/espèce bactérienne, lié de façon covalente à un oligosaccharide conservé, ce dernier étant attaché à la membrane externe via le lipide A. Les bactéries ont également la compétence de sécréter des exopolysaccharides pouvant participer à la formation de biofilms.

Certaines bactéries Gram-positives et Gram-négatives sont aussi capables de synthétiser un réseau structuré de polymères linéaires ou branchés très rigide et hydraté constituant la couche la plus externe du pathogène, la **CPS** (26, 27).



**Figure 1. Schéma simplifié des polysaccharides de la surface des bactéries Gram-positives.**

CPS : capsule polysaccharidique; PG : peptidoglycane; (L)TA : acide (lipo)téichoïque; M : membrane lipidique. *D'après (28).*

### 1.1.3.1. La grande diversité des CPS

Les CPS sont des molécules de haut poids moléculaire (de 100 à 1000 kDa) qui peuvent être exprimées à la surface de bactéries commensales mais aussi pathogènes, notamment au niveau des tractus respiratoire, gastro-intestinal et urinaire (26). Les CPS présentent une diversité remarquable, tant au niveau de leur composition que de leur structure, qui s'observe entre les différentes espèces bactériennes mais aussi à l'intérieur d'une même espèce (25, 29). On décompte par exemple plus de 90 CPS chez *Streptococcus pneumoniae* et plus de 80 CPS chez *Escherichia coli*. Les CPS sont formées d'unités répétitives de un à huit sucres incluant



des monosaccharides communs comme le glucose (Glc), le galactose (Gal) et le rhamnose et diverses glycosamines, comme des dérivés *N*-acétylés de la D-glucosamine et de la D-galactosamine. Certaines CPS présentent aussi des similarités biochimiques avec les acides téichoïques et contiennent des résidus de ribitol phosphate et de glycérol phosphate. D'un point de vue structural, les différences peuvent porter, entre autres, sur la position des liens glycosidiques entre les sucres, la forme énantiomérique des sucres (D ou L), le nombre de carbones formant la structure cyclique du sucre (forme furanose ou pyranose) ou encore la configuration du centre anomérique de chaque sucre ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) (25). Finalement, bien que la plupart des CPS soient neutres ou chargées négativement, un petit nombre dites zwitterioniques (ZPS), incluant la CPS de *Bacteroides fragilis* type A, la CPS de *S. pneumoniae* type 1 et les CPS de *Staphylococcus aureus* types 5 et 8, présentent la particularité de porter à la fois des charges positives et négatives (30). De façon tout aussi remarquable, cette grande diversité de CPS interagit spécifiquement avec le système immunitaire de l'hôte, chaque CPS définissant un sérotype particulier. Nous allons revenir sur ce point dans la section 2.4.1. Quelques structures de CPS bactériennes évoquées dans cette revue de littérature sont représentées dans la **Figure 2**.

En plus des sucres cités plus haut, certaines bactéries sont capables d'incorporer de l'acide sialique dans leur CPS. Nous allons maintenant décrire les caractéristiques de ce sucre qui est une molécule capitale dans ce projet de thèse.

|   |   |
|---|---|
| $\alpha\text{-D-Neup5Ac-(2}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcpNAc}$<br>1<br>↓<br>3<br>$[\text{4-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{)]}_n$  | <b>GBS type Ia</b>  |
| $\alpha\text{-D-Neup5Ac-(2}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-GlcpNAc}$<br>1<br>↓<br>3<br>$[\text{4-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{)]}_n$  | <b>GBS type Ib</b>  |
| $[\text{8-}\alpha\text{-D-Neup5Ac-(2}\rightarrow\text{)]}_n$  | <b><i>N. meningitidis</i> groupe B<br/><i>E. Coli</i> type K1</b> |
| $[\text{9-}\alpha\text{-D-Neup5Ac-(2}\rightarrow\text{)]}_n$<br>(7/8OAc)  | <b><i>N. meningitidis</i> groupe C</b>                            |
| $\alpha\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-D-Glcp}$<br>1<br>↓<br>2<br>$[\text{3-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{)]}_n$ | <b><i>S. pneumoniae</i> type 2</b>                                |
| $[\text{3-}\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{)]}_n$  | <b><i>S. pneumoniae</i> type 3</b>                                |
| $[\text{3-}\beta\text{-D-ManpNAc-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-FucpNAc-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-GalpNAc-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{)]}_n$<br>(2,3Pyr)   | <b><i>S. pneumoniae</i> type 4</b>                                |
| $[\text{2-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{4)-D-Rib-(5-}P\text{-O}\rightarrow\text{)]}_n$   | <b><i>S. pneumoniae</i> type 6B</b>                               |
| $\beta\text{-D-Galp}$<br>1<br>↓<br>4<br>$[\text{6-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{)]}_n$   | <b><i>S. pneumoniae</i> type 14</b>                               |
| $[\text{4-}\beta\text{-D-ManpNAc-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1-}P\text{-O}\rightarrow\text{)]}_n$  | <b><i>S. pneumoniae</i> type 19F</b>                              |
| $\alpha\text{-L-Rhap}$<br>1<br>↓<br>2<br>$[\text{4-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{)]}_n$<br>3<br>↑<br>Gro-2- <i>P</i> -O   | <b><i>S. pneumoniae</i> type 23F</b>                              |

**Figure 2. Structures des CPS de GBS types Ia et Ib, *Neisseria meningitidis* groupes B et C, *E. Coli* type K1, et *S. pneumoniae* types 2, 3, 4, 6B, 14, 19F et 23F.**

Neu5Ac : acide *N*-acétylneuraminique; Gal : galactose; Glc : glucose; GlcNAc : *N*-acétylglucosamine; Rha : rhamnose; GlcA : acide glucuronique; ManNAc : *N*-acétylmannosamine; FucNAc : *N*-acétylfucosamine; Rib : ribitol; Gro : glycérol; Pyr : pyruvate. D'après (27, 29).

### 1.1.3.2. L'acide sialique

L'acide sialique est un terme générique regroupant une large famille de plus de 50 membres d'acides  $\alpha$ -cétoaldoniques (un dérivé d'oses) à squelette de 9 carbones, comprenant d'une part l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) et ses dérivés, incluant l'acide neuraminique (dérivé du Neu5Ac suite à la désacétylation en C<sub>5</sub>) et l'acide *N*-glycolylneuraminique (Neu5Gc) (dérivé du Neu5Ac suite à l'addition d'un atome d'oxygène au groupement *N*-acétyl en C<sub>5</sub>), et d'autre part l'acide désaminoneuraminique (possédant un groupement « -OH » en C<sub>5</sub>) et ses dérivés (31). La grande diversité de la famille des acides sialiques vient des multiples modifications possibles, en plus des variations au niveau du carbone C<sub>5</sub>, des groupements hydroxyles au niveau des carbones C<sub>4</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub> et/ou C<sub>9</sub> (31). Plusieurs types de *O*-substitutions sont possibles incluant l'*O*-acétylation, l'*O*-lactylation, l'*O*-sulfatation et l'*O*-méthylation (31). Finalement, d'autres acides  $\alpha$ -cétoaldoniques font partie de la grande famille des acides sialiques mais ne seront pas détaillés ici (31).

Les acides sialiques sont exprimés de façon ubiquitaire par diverses espèces vivantes incluant les eucaryotes, majoritairement les vertébrés, et les bactéries. Les bactéries acquièrent l'acide sialique en le prélevant à partir de l'environnement, notamment à partir des cellules de l'hôte, en sécrétant des sialidases, mais aussi en le synthétisant *de novo* comme dans le cas des mammifères (31). Nous allons nous concentrer par la suite sur l'acide sialique Neu5Ac qui est la forme la plus couramment retrouvée chez les espèces vivantes. La première étape de la biosynthèse de Neu5Ac consiste en la conversion du métabolite UDP-GlcNAc en *N*-acétylmannosamine (via par exemple l'action de l'enzyme NeuC chez certaines bactéries), puis ce dernier est ensuite converti en Neu5Ac (via notamment NeuB) et enfin activé en CMP-Neu5Ac (via notamment NeuA). Cette molécule est enfin liée à son substrat, comme par exemple une molécule de Gal, GlcNAc ou Neu5Ac, par l'action de sialyltransférases, le plus souvent en ( $\alpha$ 2-3), ( $\alpha$ 2-6) ou ( $\alpha$ 2-8) (31, 32).

Chez les eucaryotes, les acides sialiques sont exprimés à la surface de divers types cellulaires le plus souvent en position terminale de glycoprotéines et glycolipides et interviennent dans divers processus biologiques tels que la reproduction, le développement et le maintien de l'homéostasie (31, 33). Par exemple, Neu5Ac( $\alpha$ 2-3) est le monosaccharide terminal de l'Ag Sialyl-Lewis<sup>x</sup> qui est exprimé par divers leucocytes et impliqué dans la reconnaissance cellule-cellule et la migration cellulaire. Les gangliosides, composés généralement d'une à quatre molécules de Neu5Ac liées

en ( $\alpha$ 2-3) ou en ( $\alpha$ 2-8) à un glycosphingolipide, sont des constituants membranaires qui interviennent dans diverses fonctions des cellules nerveuses. Les eucaryotes peuvent aussi exprimer l'acide sialique sous forme d'homopolymère et par exemple, la molécule d'adhésion NCAM (« neuronal cell adhesion »), qui participe la plasticité neuronale du système nerveux embryonnaire et adulte, porte un polysaccharide linéaire de molécules de Neu5Ac( $\alpha$ 2-8).

Les bactéries incorporent l'acide sialique au sein de diverses macromolécules incluant la CPS et le LOS/LPS (26, 31, 32). De façon remarquable, quelques bactéries miment à l'identique certains motifs de Neu5Ac exprimés par les cellules eucaryotes. Par exemple, les CPS d'*E. coli* type K1 et *Neisseria meningitidis* groupe B sont constituées du même homopolymère de Neu5Ac que la molécule NCAM. Ce mimétisme moléculaire est susceptible de permettre aux bactéries de pervertir le système immunitaire de l'hôte, et ce point crucial à cette thèse sera développé plus en détails dans la section 2.4.2.2.

### 1.1.3.3. Les récepteurs des CPS

La reconnaissance des pathogènes et le déclenchement des réponses immunes subséquentes mettent en jeu un ensemble de récepteurs désignés sous le nom de PRR (« pattern recognition receptors »), qui sont exprimés à la surface cellulaire, dans les compartiments intracellulaires ou bien sous forme sécrétée par une grande majorité de leucocytes. Les PRR comprennent, entre autres, les TLR, les NLR (« nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors ») et les récepteurs lectines incluant les CLR (« C-type lectin receptors ») et les Siglecs (« sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins ») (34-37). Ces récepteurs reconnaissent des motifs moléculaires conservés chez les pathogènes dénommés PAMP (« pathogen associated molecular patterns »), qui peuvent être des molécules protéiques, lipidiques ou saccharidiques. Les fonctions assurées par les PRR sont multiples et complexes du fait de la grande diversité des PAMP, des types cellulaires exprimant les PRR, ainsi que de la complexité voire même de l'enchevêtrement des voies de signalisation intracellulaires mises en jeu. Elles incluent la fixation et l'internalisation des pathogènes ainsi que l'orchestration des réponses immunitaires innées et adaptatives (34-38). En plus de participer à la lutte anti-infectieuse, les PRR sont aussi impliqués dans le maintien de l'homéostasie immunitaire chez l'hôte, notamment en contrant le développement de réponses inflammatoires exacerbées (37, 39). Cette fonction peut être détournée par les pathogènes afin de déjouer le système immunitaire de l'hôte et ce point sera développé plus en détails dans la section 2.4.2.

En ce qui concerne plus précisément les PRR mis en jeu dans la reconnaissance des CPS, les connaissances restent encore limitées, mais les récepteurs lectines et les TLR seraient engagés. Etant donné que nous nous sommes concentrés sur le rôle des TLR dans le cadre de cette thèse, ces récepteurs vont être décrits plus en détails.

#### **1.1.3.3.1. Les « Toll-like receptors » (TLR)**

Les TLR sont des protéines transmembranaires composées d'un domaine extracellulaire à motifs structuraux riches en leucine (LRR) contribuant à la reconnaissance et la fixation des PAMP, d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine intracellulaire de type TIR (Toll/IL-1R), conservé parmi les membres de la superfamille du récepteur de l'IL-1, qui est impliqué dans l'initiation des voies de signalisation (34). Treize TLR ont été identifiés chez les mammifères jusqu'à maintenant, les TLR -1 à -9 étant conservés chez l'homme et la souris, TLR10 n'étant fonctionnel que chez l'homme et les TLR -11 à -13 étant présents seulement chez la souris. Les TLR 1, 2, 4, 5 et 6 sont exprimés à la surface cellulaire et reconnaissent principalement les composants microbiens membranaires comme les protéines, les lipides et les lipoprotéines, tandis que les TLR 3, 7, 8, 9, 11 et 13 sont exprimés dans des compartiments intracellulaires comme les endosomes et les lysosomes et sont spécialisés dans la détection des acides nucléiques provenant des microbes internalisés par la cellule. Chaque TLR détecte un répertoire distinct de PAMP qui peuvent être exprimés par une large variété de microbes incluant les bactéries, les virus, les parasites et les champignons (voir **Tableau I**). Tandis que la plupart des TLR agissent sous forme d'homodimères, TLR2 a la particularité de s'associer en hétérodimère avec TLR1 ou TLR6 (34, 40-42). Il est à noter qu'une gamme de récepteurs, autres que TLR, peuvent s'associer à TLR2 afin de contribuer à une activation optimale, incluant le CD14.

**Tableau I. Récapitulatif des TLR et de leurs ligands.**

| TLR          | Ligand  | Espèce microbienne   |
|--------------|---|--|
| TLR1/TLR2    | lipopeptides triacylés                            | mycobactéries  |
| TLR2/TLR6    | lipopeptides diacylés                             | mycobactéries et bactéries                                       |
|              | acide lipotéichoïque                              | bactéries  |
|              | zymosane  | champignons  |
| TLR2         | lipoarabinomannane                                | mycobactéries  |
|              | porines   | bactéries ( <i>Neisseria meningitidis</i> )                      |
|              | protéine liée par le glycosylphosphatidylinositol | parasites ( <i>Trypanosoma</i> )                                 |
|              | hémagglutinine                                    | virus (virus de la rougeole)                                     |
| TLR3         | ARN double brin                                   | virus  |
| TLR4         | lipopolysaccharide                                | bactéries  |
|              | protéines de l'enveloppe                          | virus (virus encéphalomyocardique, virus respiratoire syncytial) |
| TLR5         | flagelline  | bactéries  |
| TLR7         | ARN simple brin                                   | virus à ARN  |
| TLR8 (homme) | ARN simple brin                                   | virus à ARN  |
| TLR9         | CpG oligodéoxynucléotides                         | bactéries  |
|              | ADN   | virus à ADN  |
|              | hémozoïne   | parasites ( <i>Plasmodium</i> )                                  |
| TLR11        | non déterminé                                     | bactéries uropathogéniques                                       |
|              | molécule de type profiline                        | parasites ( <i>Toxoplasma gondii</i> )                           |
| TLR13        | motifs non méthylés de l'ARN ribosomal 23S        | bactéries  |

TLR : Toll-like receptor. D'après (34).

L'interaction des TLR avec leurs ligands spécifiques induit le recrutement de protéines adaptatrices, kinases et ligases engagées dans diverses voies de signalisation intracellulaires où se déroulent des processus de phosphorylation, d'ubiquitination et d'interactions protéine-protéine. Il en résulte une activation de facteurs de transcription qui régulent l'expression de gènes impliqués dans la défense antimicrobienne et dans l'inflammation (34, 40-42).

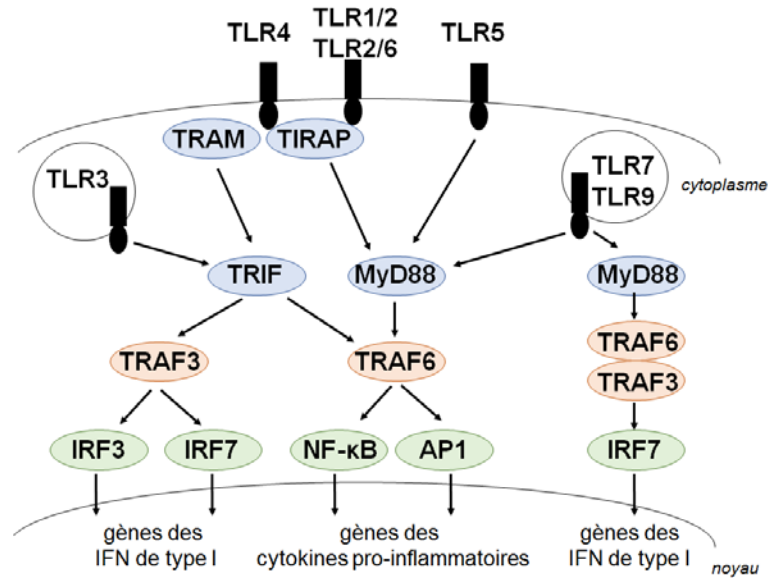
Les TLR peuvent être divisés en 2 groupes selon le type de protéine adaptatrice qui se lie initialement au domaine TIR. Le premier groupe constitué des TLR 1/2, 2/6, 5, 7, 8 et 9 emprunte la voie de MyD88 (« myeloid differentiation primary response gene 88 »), tandis que le deuxième groupe composé de TLR3 emprunte la voie de

TRIF (« TIR domain-containing adapter inducing interferon (IFN)- $\beta$  »). TLR4 est capable d'emprunter les 2 voies. Il est à noter que TLR2 et TLR4 utilisent une protéine adaptatrice additionnelle, TIRAP (« TIR domain-containing adapter protein »), pour recruter MyD88. De même, la protéine adaptatrice TRAM (« TRIF-related adapter molecule ») fait la liaison entre TLR4 et TRIF (34, 40-42).

Dans la voie dépendante de MyD88, le complexe TLR-MyD88 recrute dans un premier temps IRAK1/2 et IRAK4, des sérine/thréonine kinases de la famille IRAK (« IL-1 receptor-associated kinase »), puis la ligase TRAF6 (« TNF receptor-associated factor »). Le complexe ainsi formé est impliqué dans le déclenchement de deux voies de signalisation majeures, la voie des MAPK (« mitogen-activated protein kinase ») et la voie du NF- $\kappa$ B (« nuclear factor kappa B »), qui aboutissent à l'activation et la translocation dans le noyau des facteurs de transcription AP1 (« activator protein 1 ») et NF- $\kappa$ B, respectivement. Ceci résulte principalement en l'activation des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires. La voie dépendante de TRIF joue un rôle essentiel dans l'activation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7, appartenant à la famille des IRF (« IFN regulator factor »), médiée par la ligase TRAF3, dont la translocation dans le noyau conduit à l'activation des gènes codant pour les IFN de type I (34, 40-42).

La voie TRIF-dépendante est également connue pour contribuer à l'activation des voies des MAPK et du NF- $\kappa$ B médiées entre autres par TRAF6. En plus de cibler l'activation des voies des MAPK et du NF- $\kappa$ B via le recrutement de MyD88, les TLR 7 et 9 présentent la singularité de pouvoir réguler les gènes des IFN de type I de façon TRIF-indépendante. En effet, dans le cas précis d'une expression de ces récepteurs par les DC plasmacytoïdes (pDC), l'engagement d'un complexe moléculaire constitué des molécules MyD88, IRAK1, IRAK4, TRAF3 et TRAF6 conduit à l'activation d'IRF7 ciblant la production d'IFN de type I par la cellule (34, 40-42).

Les voies intracellulaires participant la signalisation des différents TLR sont schématisées dans la **Figure 3**.



**Figure 3. TLR et voies de signalisation.**

TLR : Toll-like receptor; TRIF : TIR domain-containing adapter inducing IFN- $\beta$ ; TRAM : TRIF-related adapter molecule; TIRAP : TIR domain-containing adapter protein; MyD88 : myeloid differentiation primary response gene 88; TRAF : TNF receptor-associated factor; IRF : interferon regulator factor; NF- $\kappa$ B : nuclear factor kappa B; AP1 : activator protein 1. D'après (40-42).

L'interaction des CPS avec les TLR a été très peu étudiée. Toutefois, au début de ce projet, une étude *in vitro* a démontré que la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages péritonéaux murins stimulés par la CPS purifiée de *S. pneumoniae* type 2 était partiellement dépendante de TLR2 et CD14 (43). Aussi, la CPS du champignon *Cryptococcus neoformans* induit l'expression des molécules de co-stimulation CD40 et CD86 par les macrophages humains de façon TLR4-dépendante (44).

### 1.1.3.3.2. Les récepteurs lectines

Les CLR sont une vaste famille de récepteurs solubles et transmembranaires. Parmi ces derniers, on compte le récepteur humain DC-SIGN (« dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin ») et le récepteur au mannose (MR) (35). Ces deux récepteurs sont constitués d'un domaine extracellulaire comportant une région CRD (« carbohydrate-recognition domain ») impliquée dans la liaison calcium-dépendante des PAMP, d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine intracellulaire contenant des motifs d'internalisation (45). DC-SIGN et MR ont une spécificité de liaison pour le mannose, le fucose, la GlcNAc et la *N*-acétylgalactosamine.



SIGNR-1, l'homologue murin de DC-SIGN, prend part à la reconnaissance et l'internalisation *in vivo* et *in vitro* de la CPS purifiée de divers sérotypes de *S. pneumoniae*, incluant les sérotypes 3 et 14, par les macrophages spléniques (46). La CPS de *S. pneumoniae* type 14 est aussi capable de se lier à DC-SIGN exprimé par les DC humaines (47). Finalement, MR est également mis en jeu dans la reconnaissance *in vitro* de divers sérotypes de *S. pneumoniae* (48).

Les Siglecs constituent la plus grande famille de lectines liant l'acide sialique chez les mammifères (36, 37). Ce sont des protéines transmembranaires constituées d'un domaine extracellulaire dont la partie proximale, qui partage une homologie de séquence avec les régions variables des Ig, est impliquée dans la fixation de l'acide sialique, d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine intracytoplasmique qui contient des motifs de type ITIM (« immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif »). La stimulation des récepteurs à motifs ITIM est classiquement associée au recrutement de tyrosines phosphatases et à l'inhibition subséquente des voies de signalisation intracellulaires. Un petit groupe de Siglecs ne possède toutefois pas de motif intracellulaire ITIM (comme par exemple Siglec-1) et/ou est associé à des molécules adaptatrices contenant des motifs ITAM (« immunoreceptor tyrosine-based activating motif »). Chaque leucocyte exprime un panel de Siglecs qui lui est propre et chaque Siglec présente une spécificité de liaison pour un type d'acide sialique ainsi que pour le type de lien que fait l'acide sialique avec le sucre adjacent. Par exemple CD22, qui est exprimé par les LB, lie préférentiellement les séquences Neu5Ac( $\alpha$ 2-6)Gal et Neu5Gc( $\alpha$ 2-6)Gal chez l'homme et/ou la souris, tandis que Siglec-E, qui se retrouve chez les neutrophiles et les DC murines, a une meilleure affinité pour la séquence Neu5Ac( $\alpha$ 2-3)Gal et Neu5Ac( $\alpha$ 2-6)Gal (36).

En adéquation avec les caractéristiques distinctes de leurs domaines intracytoplasmiques, les membres de la famille des Siglecs contrôlent les fonctions des leucocytes de façon différente. Le rôle biologique prédominant des Siglecs est le maintien d'un certain niveau d'inhibition des leucocytes en fixant les molécules d'acide sialique exprimées en *cis* (c'est-à-dire par la même cellule qui exprime le récepteur Siglec) (37, 49). Par exemple, la stimulation *in vitro* des macrophages murins par divers ligands des TLR non sialylés induit l'expression de Siglec-E qui exerce un rétrocontrôle négatif subséquent sur la production de cytokines et chémokines pro-inflammatoires TLR-dépendante (50). L'augmentation exacerbée de la signalisation intracellulaire chez les souris déficientes pour CD22 et Siglec-G, ou bien dont les LB expriment une forme altérée du ligand sialylé spécifique de ces récepteurs, démontre aussi le rôle

crucial de l'interaction Siglec-acide sialique dans le maintien de la tolérance des LB (51-53).

Quelques études ont établi que les Siglecs participent aussi à la lutte anti-infectieuse. Par exemple, la reconnaissance *in vitro* par Siglec-1 des macrophages murins et/ou porcins de la séquence Neu5Ac( $\alpha$ 2-3)Gal exprimée par le LPS de *N. meningitidis* et les mucines du parasite *Trypanosoma cruzi* conduit à la phagocytose de ces pathogènes (37). Au début de ce projet de thèse, la capacité des Siglecs à reconnaître l'acide sialique de la CPS bactérienne demeure très largement inexplorée. Nous développerons ce point dans la section 2.4.2.2.

### 1.1.3.3.3. Les autres récepteurs

Le système du complément représente l'une des premières de lignes de défense de l'immunité innée et comprend plus de 30 protéines sériques, qui consistent en des précurseurs inactifs, des molécules effectrices et des molécules régulatrices (54-56). Il existe trois voies d'activation du complément, la voie classique initiée principalement par la fixation des Ig à la surface du pathogène, la voie alterne activée par contact direct des molécules du complément à la surface du pathogène, et enfin la voie des lectines, initiée par la fixation d'une lectine soluble aux résidus de mannose des micro-organismes. L'activation du complément conduit à une cascade de réactions enzymatiques qui résulte en la formation de produits peptidiques impliqués dans la lyse cellulaire et, suite à la reconnaissance par les récepteurs du complément (CR) tels que CR1, CR2/CD21 et CR3 exprimés par les leucocytes, à l'opsonisation et à l'activation des fonctions effectrices des cellules du système immunitaire inné et adaptatif (54-56).

Parmi les CR, CR3 est une intégrine transmembranaire hétérodimérique composée des molécules CD11b et CD18, qui possède deux sites de reconnaissance : un site qui lie la molécule du complément iC3b (un des produits de dégradation de la molécule du complément C3) fixée à la surface du pathogène, et un site lectine spécifique pour certains sucres exprimés par les pathogènes tels que les  $\beta$ -glucanes et le GlcNAc (57, 58). La CPS de GBS serait susceptible d'être reconnue par ce site, ce qui sera plus développé dans la section 1.2.4.2. (58).

Les NLR sont des protéines cytosoliques composées en général d'un domaine C-terminal riche en LRR impliqué dans la détection des PAMP, d'un domaine central (NACHT) impliqué dans l'oligomérisation du récepteur, et d'un domaine N-terminal CARD (« caspase-activation and recruitment domain ») ou PYD (« pyrin domain »)

impliqué dans la fonction effectrice (38, 59). Une trentaine de NLR ont été identifiés chez les mammifères et peuvent se diviser globalement en deux groupes. Le premier groupe comporte les récepteurs NOD et leur activation induit le déclenchement de voies de signalisation impliquant la voie des MAPK et de NF- $\kappa$ B résultant, entre autres, en la production de cytokines pro-inflammatoires et des IFN de type I. Le second groupe comporte les récepteurs NLRP (« NLR protein »), incluant NLRP3, et régit l'assemblage d'un complexe multiprotéique, l'inflammasome, régulant plus spécifiquement la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 (38, 59).

A côté de la reconnaissance bien établie du PG et/ou de ses produits de dégradation par les NLR, cette famille de récepteurs est aussi capable de reconnaître certains sucres exprimés par les pathogènes. Par exemple, chez la souris, l'interaction *in vitro* du curdlane, un  $\beta$ -glucane de champignon, avec NLRP3 induit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les macrophages et les DC ainsi que l'activation des LB spléniques, incluant l'augmentation de l'expression de CD69 et la production d'Ig (60). Toutefois, la capacité de la CPS à interagir avec les NLR reste inconnue.

#### **1.1.3.4. La CPS : un facteur de virulence clé**

Les CPS sont impliquées dans la prévention de la dessiccation bactérienne, dans l'adhérence et, pour ce qui va nous intéresser plus particulièrement dans le cadre de cette thèse, dans l'évasion immunitaire (26). Dans les modèles d'infection *in vivo* chez l'animal, la virulence atténuée des souches mutantes non encapsulées de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *E. coli* et *S. aureus*, pour ne citer que ces bactéries, démontre que l'expression de la CPS permet à la bactérie de résister aux défenses immunitaires de l'hôte (26, 61-63).

Un mécanisme de résistance majeur médié par la CPS consiste à empêcher la bactérie d'être internalisée et détruite par les cellules immunitaires de l'hôte, et plusieurs phénomènes peuvent en être à l'origine (26). Tout d'abord, il a été suggéré que la présence de la CPS inhibe les interactions physiques entre la bactérie et les phagocytes (26). La charge négative à la surface bactérienne conférée par la CPS est susceptible de créer une force de répulsion vis-à-vis de la charge négative du glycocalyx des phagocytes. La nature hydrophilique de la CPS pourrait aussi réduire la tension de surface à l'interface entre le pathogène et ces cellules. Aussi, la CPS protège la bactérie de l'opsonisation par les molécules de la voie alterne du complément (26). Cette voie, qui constitue une des premières lignes de défense de l'immunité innée de l'hôte en absence d'Ac spécifique, est initiée par le dépôt de C3b à la surface bactérienne suivi d'un processus d'activation impliquant, entre autres, le

facteur B. La reconnaissance de C3b ainsi fixé par les CR exprimés à la surface des neutrophiles et des macrophages conduit à la phagocytose et à la destruction du microbe (26). *In vitro*, il a été démontré que l'encombrement stérique causé par la CPS masque la reconnaissance par les CR des molécules du complément qui sont fixées aux composants sous-capsulaires de la bactérie (55, 64). Les CPS de diverses bactéries comme par exemple *N. meningitidis* groupes B et C, *S. pneumoniae* types 2 et 4 et *E. coli* type K1, interfèrent aussi avec l'activation du complément en empêchant le dépôt de C3b et/ou du facteur B à la surface bactérienne (26, 55, 61, 65-68). Il est à noter que la CPS peut également bloquer l'activation de la voie classique du complément en interférant avec la fixation de la protéine sérique CRP (« C-reactive protein ») et des Ac naturels à la surface bactérienne, comme cela a été vu chez *S. pneumoniae* (61).

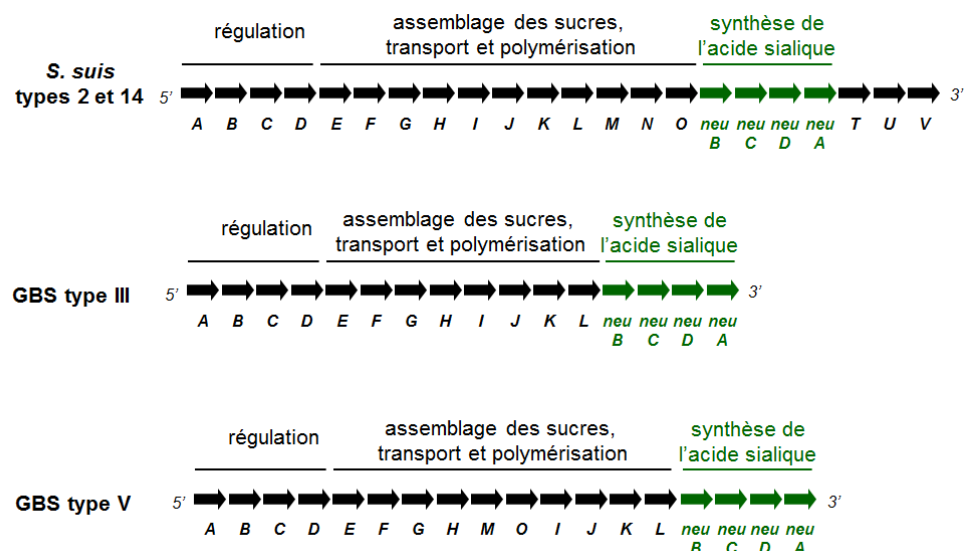
En plus de former une barrière physique contre l'opsonisation et/ou l'internalisation par les phagocytes, la CPS serait aussi susceptible d'immunomoduler activement les fonctions leucocytaires de l'hôte en interférant avec les voies de signalisation des PRR exprimés par ces cellules, et l'acide sialique pourrait y jouer un rôle clé. Ce point sera abordé plus en détails par la suite.

#### **1.1.3.5. Les CPS de *S. suis* et GBS**

La synthèse de la CPS de *S. suis* et GBS requiert de multiples enzymes codées par un cluster de gènes qui présente une homologie avec ceux impliqués dans la synthèse de la CPS d'autres bactéries Gram-positives encapsulées (69-71). Si on prend le modèle général de la synthèse de la CPS chez *S. pneumoniae* qui a été particulièrement étudiée (72), l'étape initiale consiste en la liaison d'un premier monosaccharide sur l'undécaprényl-phosphate au niveau de la surface interne de la membrane cytoplasmique bactérienne par une transférase initiale. Il s'en suit un ajout séquentiel d'autres monosaccharides par des glycosyltransférases spécifiques, ce qui résulte en la formation d'une unité répétitive saccharidique transportée à travers la membrane cytoplasmique par une flippase. Au niveau de la surface membranaire externe, une polymérase lie les unités répétitives entre elles puis la CPS mature est enfin transloquée et attachée au PG à la surface bactérienne.

Bien que les fonctions de beaucoup de gènes demeurent inconnues, les analyses réalisées sur les 35 sérotypes de *S. suis* (73) et les 10 sérotypes de GBS (74, 75) dressent une organisation schématique du locus *cps* en trois grandes parties

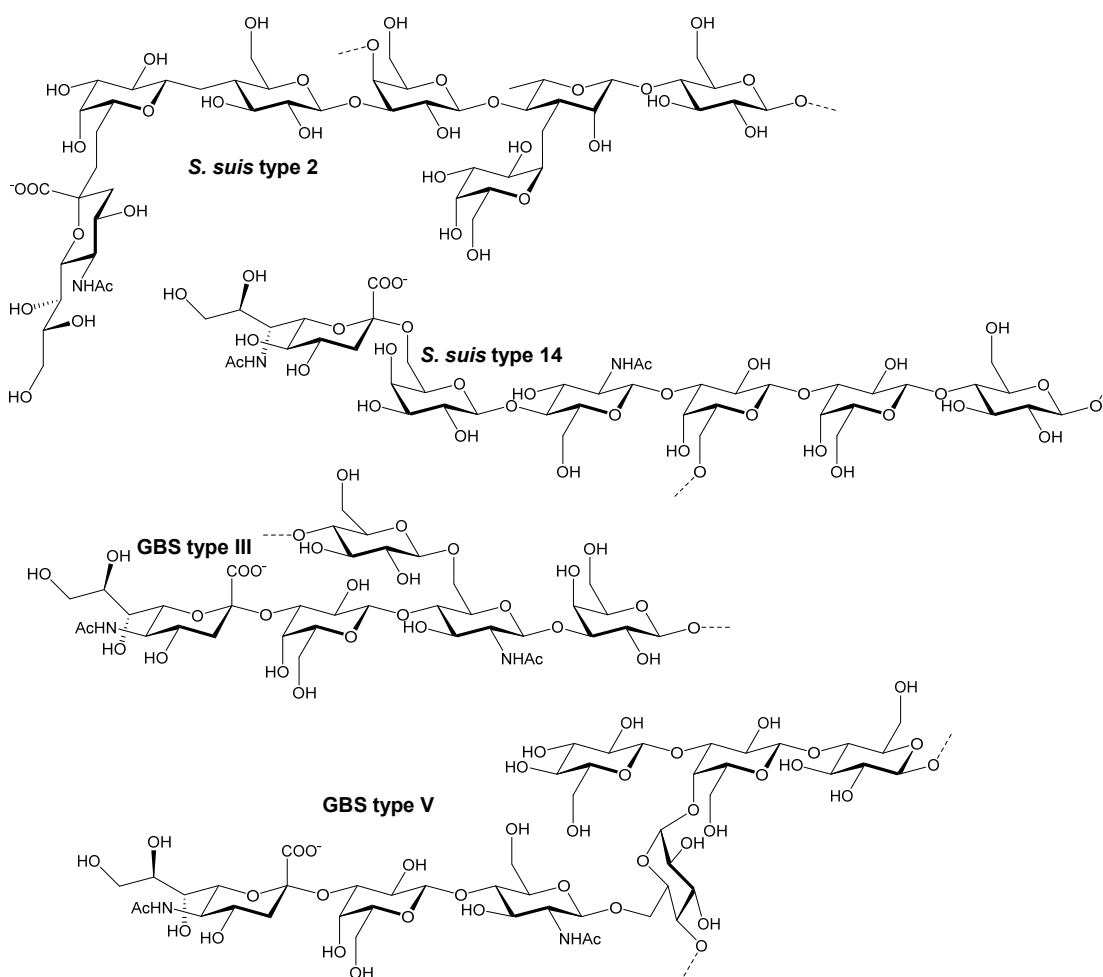
(voir **Figure 4**). A l'extrémité 5', les gènes *cpsABCD* seraient impliqués dans la régulation, la taille de la chaîne polysaccharidique et l'attachement de la CPS à la paroi bactérienne alors que les gènes de la région centrale du locus, coderaient pour les glycosyltransférases, la flippase et la polymérase. Finalement, les gènes *neuBCDA* à l'extrémité 3', présents dans le locus de tous les sérotypes de GBS mais seulement pour les sérotypes 1, 1/2, 2, 6, 13, 14, 16 et 27 de *S. suis*, seraient engagés dans la synthèse de l'acide sialique sous forme Neu5Ac (73-75). Dans le cas de *S. suis* types 2 et 14, l' $\alpha$ 2-6 sialyltransférase codée par les gènes *cps2N* et *cps14N*, respectivement, ajoute Neu5Ac au Gal de la CPS. Dans le cas de GBS types III et V, l' $\alpha$ 2-3 sialyltransférase codée par les gènes *cpsIIIK* et *cpsVK*, respectivement, ajoute Neu5Ac au Gal adjacent. L'existence des nombreux sérotypes de *S. suis* et GBS semble être liée, du moins en partie, à la grande variation dans les gènes de la région centrale du locus *cps* codant pour les glycosyltransférases. L'accumulation de transfert de gènes intra-espèce et/ou de mutations à petite échelle pourraient expliquer la diversité antigénique des CPS de ces deux bactéries. La conservation des gènes *cpsABCD* et *neuBCDA* témoigne toutefois d'un avantage de survie conféré par leur produit qui contrebalance l'émergence des différents sérotypes induite notamment par la pression de sélection exercée par l'hôte infecté. Il est important de souligner que *S. suis* et GBS sont les seules bactéries Gram-positives à exprimer de l'acide sialique dans leurs CPS.



**Figure 4. Organisation des gènes du locus *cps* de *S. suis* types 2 et 14 et GBS types III et V. D'après (69, 71, 73, 74).**

Alors que les structures des CPS de tous les sérotypes de GBS ont été déterminées (75), seules les structures des CPS de *S. suis* types 2 et 14 ont été caractérisées à l'heure actuelle [(76) + **ANNEXE, ARTICLE VI**] (voir **Figure 5**). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes concentrés sur les CPS des sérotypes 2 et 14 de *S. suis* et des sérotypes III et V de GBS puisque, comme expliqué précédemment, ils correspondent aux sérotypes les plus fréquemment isolés et les plus virulents.

Si on compare ces quatre CPS anioniques, plusieurs similarités ressortent, en adéquation avec l'homologie des locus *cps* de ces bactéries. Elles sont notamment formées d'unités répétitives de Glc, de Gal, de GlcNAc et d'acide sialique (sous forme Neu5Ac). Toutefois, chaque CPS est composée d'un arrangement unique de ces sucres à des ratios différents, et la CPS de *S. suis* type 2 contient du rhamnose en plus des quatre sucres cités. De plus, comme indiqué ci-dessus, l'acide sialique, qui est situé à l'extrémité terminale de la chaîne latérale de chaque unité répétitive, forme une liaison en ( $\alpha$ 2-6) chez *S. suis* et en ( $\alpha$ 2-3) chez GBS avec le Gal adjacent. Comme nous allons le voir par la suite, cette variation à priori minime, peut hypothétiquement résulter en une interaction bien différente des deux bactéries avec le système immunitaire de l'hôte. Il est à noter que les CPS de *S. suis* types 2 et/ou 14 partagent plusieurs similarités dans leurs compositions et leurs structures avec les CPS d'autres sérotypes de GBS, incluant les types Ia, Ib, II, III, IV et VIII [(76) + **ANNEXE, ARTICLE VI**]. Aussi, la séquence des sucres de la chaîne principale de la CPS de *S. suis* type 2 est identique à celle de la CPS de *S. pneumoniae* type 23F (76).



**Figure 5. Structures des CPS de *S. suis* types 2 et 14 et GBS types III et V.**  
 Neu5Ac : acide *N*-acétylneuraminique; Gal : galactose; Glc : glucose; GlcNAc : *N*-acétylglucosamine; Rha : rhamnose. D'après [(76-78) et ANNEXE, ARTICLE VI].

## 1.2. Aspects immunologiques

Les mécanismes par lesquels *S. suis* et GBS causent une infection sont complexes et multifactoriels. Les étapes de la pathogénèse de ces deux bactéries consistent en la pénétration initiale des barrières mucoales de l'hôte, en la survie et la dissémination dans la circulation sanguine, puis l'invasion de multiples organes tels que la rate, les poumons et le système nerveux central (SNC) grâce à l'expression d'un large éventail de facteurs dits de « virulence » sécrétés ou associés à la bactérie [(1, 19, 79-81) + **ANNEXE, ARTICLE IV**]. Ces facteurs ne seront pas, cependant, décrits dans cette thèse.

Alors que la notion de « facteur de virulence » ne possède pas toujours de définition claire et peut différer d'un groupe de chercheurs à l'autre selon les modèles expérimentaux (**ANNEXE, ARTICLE V**), une molécule est incontestablement cruciale dans la physiopathologie de *S. suis* et GBS, à savoir la CPS. En effet, dans les modèles d'infection *in vivo* chez l'animal, les souches mutantes isogéniques déficientes pour l'expression de la CPS perdent leur virulence et sont rapidement éliminées par l'hôte comparativement aux souches sauvages (WT) (69, 82-84). Bien que les étapes de la pathogénèse de GBS et *S. suis* soient similaires et que les deux bactéries expriment un/des facteur(s) de virulence commun(s), l'interaction de ces deux pathogènes avec les cellules du système immunitaire de l'hôte, et en particulier le rôle de la CPS dans ces interactions, diffère sensiblement.

Dans la suite du chapitre, les aspects cellulaires et moléculaires de la pénétration des barrières mucoales et du SNC de l'hôte par *S. suis* et GBS vont être décrits très succinctement. Nous allons nous attarder plus longuement sur les caractéristiques et les mécanismes de la phase de survie systémique et le rôle de la CPS.

### 1.2.1. La pénétration des barrières mucoales

A l'exception d'une pénétration de l'organisme directement dans la circulation sanguine, par exemple suite à une coupure, GBS et *S. suis* doivent faire face aux premières lignes de défense de l'hôte connues collectivement sous le nom de tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT), composées d'une couche supérieure de cellules épithéliales et de tissus lymphoïdes sous-jacents, avant de pouvoir se disséminer dans l'organisme. Alors que l'interaction entre *S. suis* et le MALT a été évaluée presque exclusivement au niveau du tractus respiratoire supérieur, les études



chez GBS ont porté surtout sur les muqueuses des tractus génital, gastro-intestinal et respiratoire inférieur.

Suite à une infection intranasale de *S. suis* type 2 chez le porc, la détection de la bactérie dans les amygdales au niveau du lymphoépithélium et de structures et tissus lymphoïdes sous-épithéliaux démontre que la bactérie est capable de pénétrer les barrières mucosales de l'hôte (85, 86). De façon générale, la présence de la CPS interfère avec l'aptitude *in vitro* de la bactérie à adhérer (87-89) et envahir (88, 89) divers types de cellules épithéliales respiratoires humaines ou porcines, probablement en rendant moins accessible certaines molécules contribuant aux phénomènes d'adhésion et/ou d'invasion. Cependant, l'effet des signaux environnementaux sur la régulation de l'expression de la CPS par la bactérie et son interaction subséquente avec les cellules épithéliales doit être plus étudié (89).

Dans le cas de GBS, diverses études *in vitro* ou *in vivo* ont démontré que GBS type III est capable d'adhérer et d'envahir plusieurs types de cellules épithéliales humaines des tractus génital, gastro-intestinal et respiratoire, ainsi que les cellules épithéliales des membranes placentaires, à savoir les cellules chorioniques et amniotiques (80, 90-95). La capacité de la bactérie à induire *in vitro* la production de divers médiateurs de l'inflammation par les cellules amniotiques pourrait aussi endommager ces cellules et permettre le franchissement de la bactérie (93). D'autres sérotypes de GBS, notamment le sérotype V, peuvent adhérer/envahir différents types de cellules épithéliales (91, 93, 95-100). GBS se lie aussi aux cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC) et il est capable d'envahir ces cellules (95, 98). Différentes molécules exprimées par GBS sont impliquées dans l'adhésion directe de la bactérie aux cellules épithéliales et/ou indirecte via l'interaction avec les composants de la matrice extracellulaire (80, 101). Tout comme pour *S. suis*, l'expression de la CPS pourrait bloquer l'exposition de ces adhésines et/ou interférer avec le processus d'invasion (90, 95, 98-100). Il a été suggéré que GBS module l'expression de sa CPS en fonction des conditions environnementales, ce qui influencerait son interaction avec les cellules de l'hôte. Par exemple, l'exposition de GBS à un pH acide est associée *in vitro* à une diminution de la production de CPS (102) ainsi qu'à une adhérence maximale de la bactérie sur les cellules épithéliales respiratoires et génitales (90).

### **1.2.2. La survie et la dissémination systémique**

Une fois les barrières mucoales franchies, *S. suis* et GBS sont confrontées aux cellules phagocytaires du système immunitaire inné de l'hôte au niveau des tissus et/ou de la circulation sanguine, à savoir les neutrophiles, et les cellules mononucléaires, plus précisément les monocytes/macrophages. Un recrutement de ces cellules sur les sites de pénétration de la bactérie au niveau des muqueuses et dans le sang est en effet observé chez l'hôte infecté par *S. suis* (86, 103) et GBS (104-107).

Les phagocytes jouent un rôle essentiel dans l'élimination précoce des pathogènes via leur aptitude à la phagocytose qui requiert généralement l'opsonisation préalable de la bactérie par des Ac spécifiques et/ou les molécules du complément. Un autre système de défense de ces cellules consiste en la production d'un large panel de molécules antimicrobiennes, incluant des protéines (lysozyme et lactoferrine) et des peptides (défensines et cathélicidines) pouvant agir aussi bien à l'intérieur du phagolysosome que dans le milieu extracellulaire, ainsi que des oxydants, incluant les dérivés réactifs du nitrogène (RNS) produits à partir de l'oxyde nitrique (NO) et les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (108, 109). Les neutrophiles et les monocytes/macrophages exercent aussi divers effets immunomodulateurs et ils orchestrent les réponses immunitaires adaptatives via la sécrétion de molécules inflammatoires incluant les cytokines et les chémokines. *S. suis* et GBS ont toutefois développé plusieurs stratégies afin d'échapper à l'élimination par ces cellules en interférant avec leurs mécanismes bactéricides intra- et/ou extracellulaires.

Il est à noter que les DC, des cellules mononucléaires du système immunitaire inné sur lesquelles nous allons revenir dans la section 2.2.2.1., jouent un rôle bien établi dans l'immunopathogénèse de nombreuses bactéries. Toutefois, au début de cette thèse, l'interaction de ces cellules avec *S. suis* et GBS n'avait jamais été évaluée.

#### **1.2.2.1. La résistance aux cellules de l'immunité innée**

Comme énoncé ci-dessus, la CPS a été décrite jusqu'à maintenant comme étant le facteur de virulence le plus critique dans la pathogénèse de *S. suis* et GBS.

Dans le cas de *S. suis*, les études *in vitro* ont démontré que la CPS permet à la bactérie de résister à la destruction par les monocytes, les macrophages et les neutrophiles d'origine murine, humaine ou porcine, via ses propriétés anti-

phagocytaires (83, 84, 110-112). Les rares bactéries internalisées ne survivent pas à l'intérieur des cellules et sont rapidement détruites (110). Les études *in vitro* réalisées avec les macrophages murins ont révélé que la CPS interférait activement avec la machinerie d'internalisation de ces cellules. En utilisant des billes de latex liées de façon covalente à la CPS purifiée de *S. suis* type 2 et/ou en comparant l'interaction de *S. suis* type 2 WT avec son mutant isogénique non encapsulé, il a été prouvé que l'adhésion de la CPS induit une déstabilisation des microdomaines lipidiques à la surface cellulaire empêchant l'accumulation de lactosylcéramide, un glycosphingolipide reconnu comme étant un PRR, au niveau de la cupule phagocytaire (113). Ceci peut ensuite résulter en un blocage des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la phagocytose, notamment via l'inhibition de l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI-3K) et de la protéine kinase C (PKC) suite au recrutement de tyrosines phosphatases (114). Tandis que toutes ces études ont été réalisées avec le sérotype 2, la capacité de la CPS de *S. suis* type 14 à interférer avec la phagocytose *in vitro* des macrophages murins n'a été démontrée que très récemment (84). Finalement, bien que les mutants non encapsulés de *S. suis* type 2 présentent aussi une plus forte sensibilité *in vitro* à la phagocytose par les neutrophiles, les mécanismes utilisés par la CPS pour interférer avec l'internalisation de ces cellules n'ont pas été autant analysés (111, 112). Alors que la CPS de *S. suis* joue un rôle incontestable dans la résistance à la phagocytose par les phagocytes de l'immunité innée, le fait qu'elle permette à la bactérie d'échapper à ce mécanisme en interférant avec l'activation du complément n'a pas été clairement prouvé (112). Outre son rôle dans la capacité de la bactérie à résister à l'internalisation, la CPS de *S. suis* type 2 est aussi impliquée dans l'adhésion *in vitro* de la bactérie aux macrophages, et l'acide sialique de la CPS pourrait prendre part à ce processus (115). Comme stipulé par la théorie du cheval de Troie modifiée, ce phénomène jouerait un rôle déterminant dans la dissémination de *S. suis* dans l'hôte infecté, permettant à la bactérie de circuler dans le sang en étant associée à la surface des phagocytes (116). Il est très important de noter ici que cette habileté remarquable conférée par la CPS à résister à la phagocytose s'applique dans un contexte où il n'y a pas d'Ac spécifique. Nous reviendrons sur cette notion dans la section 1.3.

Dans le cas de GBS, la CPS de GBS permet à la bactérie, en absence d'Ac spécifique, de résister *in vitro* à l'élimination par les leucocytes humains médiée par le complément (117-119), en particulier par les neutrophiles (120), et il a été suggéré que l'acide sialique plus spécifiquement jouerait un rôle important en empêchant l'activation de la voie alterne du complément, en interférant notamment avec le dépôt de C3 à la

surface bactérienne (121, 122). Le blocage de l'activation du complément par l'acide sialique conduirait non seulement à une inhibition de l'opsonisation de la bactérie, mais aussi à la réduction de la production de molécules chémoattractrices comme C5a (123). En interagissant avec les Siglecs exprimés par les leucocytes, l'acide sialique de la CPS de GBS posséderait aussi la capacité remarquable de moduler négativement les fonctions bactéricides de ces cellules. Nous reviendrons sur cet aspect fondamental dans la section 1.2.4.2. Bien que l'expression de la CPS permette à GBS de résister à la destruction par les phagocytes, il est très important de retenir que contrairement à *S. suis*, cette résistance n'est pas liée à une activité anti-phagocytaire. En effet, *in vitro* GBS type III est phagocytée par les macrophages murins (110, 124, 125) et la présence de la CPS n'interfère pas avec ce phénomène (110). Une fois internalisée, GBS survit à l'intérieur des cellules pendant plus de 24 h (110, 125), une période qui, *in vivo*, est plus que suffisante pour induire une bactériémie, et cela indépendamment de l'expression ou non de la CPS (110). L'ajout de complément ne semble pas influencer de façon importante l'internalisation ni la survie intracellulaire de GBS type III, ce qui est en accord avec la panoplie de facteurs limitant l'activation du complément que la bactérie possède, dont la CPS (125-127). Même si les mécanismes ne sont pas encore totalement élucidés, quelques études ont démontré que GBS a développé plusieurs stratégies afin de résister à la destruction intracellulaire des macrophages, dont l'inhibition de la fusion phagolysosomale (125), l'interférence dans les voies de signalisation en aval de PKC (126), et la résistance au stress oxydatif causé par les ROS (127-130).

Finalement, autant *S. suis* que GBS peuvent résister à d'autres fonctions bactéricides des phagocytes via l'expression de facteurs autres que la CPS, mais qui ne seront pas détaillés ici.

### **1.2.2.2. La réponse inflammatoire**

La réaction inflammatoire du système immunitaire est indispensable pour contrer les infections bactériennes, et une production moins efficace de médiateurs de l'inflammation par les phagocytes de l'hôte jeune, du fait d'un défaut dans le recrutement de ces cellules et/ou de leur fonctionnalité, pourrait éventuellement expliquer leur plus grande susceptibilité à ces microbes (131). Toutefois, l'inflammation non contrôlée est tout aussi néfaste et justement, les séquelles cliniques des infections à GBS et *S. suis* sont corrélées à une réponse inflammatoire exacerbée chez l'hôte infecté. De nombreuses cellules sont susceptibles de produire des médiateurs de

l'inflammation, incluant les cellules épithéliales et les leucocytes, et nous allons nous concentrer plutôt sur l'implication des phagocytes dans cette réponse.

La corrélation entre une réponse inflammatoire excessive et un mauvais pronostic vital est bien reflétée par la prévalence élevée de patients avec TSLs qui présentaient des niveaux extrêmement élevés de cytokines pro-inflammatoires sériques durant l'épidémie humaine mortelle à *S. suis* en Chine (4, 132). Dans les modèles d'infection expérimentale chez l'animal, l'infection à *S. suis* se caractérise aussi par une réponse inflammatoire suraiguë (133, 134). Chez la souris, l'infection à *S. suis* présente une première phase septique au cours de laquelle de hauts niveaux de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 (p40/p70), IFN- $\gamma$ , CCL2/MCP-1, CXCL1/KC et CCL5/RANTES sont mesurés dans le sang dans les deux premiers jours (135). La présence d'une forte bactériémie, sans lésion spécifique, chez les souris qui meurent durant cette phase suggère que la réponse inflammatoire exacerbée est principalement responsable de la mortalité des animaux. De façon similaire, les cas de septicémie du nouveau-nés causés par GBS chez l'homme (136-138) et dans les modèles d'infection néonatale chez l'animal (139) se caractérisent par des taux cytokiniques plasmatiques et spléniques très élevés, incluant TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8 et IFN- $\gamma$ .

L'importance de l'équilibre entre les réponses pro- et anti-inflammatoires dans l'évolution de la maladie à GBS ou à *S. suis* est illustrée dans les modèles d'infection expérimentale par une meilleure survie des souris après avoir reçu une administration de cytokines anti-inflammatoires (IL-10), d'Ac neutralisant les cytokines pro-inflammatoires (anti-TNF- $\alpha$ , antagoniste du récepteur à l'IL-1) ou d'un inhibiteur des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la production de cytokines inflammatoires (134, 139-142)

Plusieurs études *in vitro* indiquent que *S. suis* et GBS sont tous les deux capables de stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires et de chémokines par les monocytes et les macrophages humains, porcins et/ou murins (143-148). Cependant, le pouvoir inflammatoire de GBS semblerait être supérieur à celui de *S. suis*.

L'association de *S. suis* avec les cellules semble être suffisante pour induire la production de cytokines, l'internalisation de la bactérie n'étant pas requise (144). Les composants de la paroi cellulaire seraient principalement impliqués dans la production de cytokines et chémokines (143, 145, 149). Ceci est en adéquation avec le fait que les souches mutantes de *S. suis* non encapsulées promeuvent une plus forte sécrétion

de ces molécules par les monocytes/macrophages (145). La CPS semble toutefois contribuer à la production de CCL2 (145).

Le rôle de la CPS dans la modulation de la réponse inflammatoire induite par GBS est plus controversé et moins bien défini que chez *S. suis*. Le PG et le polysaccharide du groupe B entraînent une réponse inflammatoire significativement plus forte que le LTA ou la CPS, incluant la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 (150-152). Néanmoins, une étude *in vitro* a conclu, au contraire, que la CPS exercerait un effet immunostimulateur supérieur au PG et au LTA, notamment dans la capacité à induire la sécrétion de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 par les cellules totales du sang humain (153). Nous reviendrons sur les possibles raisons de ces conclusions divergentes dans la discussion.

D'autres facteurs exprimés par *S. suis* ou par GBS participent aussi à la réponse pro-inflammatoire (154-161), ainsi qu'à l'activation des voies de transduction mettant en jeu les MAPK et NF- $\kappa$ B (142, 146, 162, 163). Outre la production de cytokines et chémokines, *S. suis* et GBS induisent la libération d'autres médiateurs de l'inflammation par les macrophages susceptibles de contribuer à la physiopathogénèse de la maladie, incluant le NO (113, 161).

### **1.2.3. La pénétration du système nerveux central et la méningite**

L'hôte infecté par *S. suis* ou GBS qui réussit à survivre à la phase de septicémie peut développer des signes cliniques plus tardifs de méningite. Afin de causer une inflammation du SNC, la bactérie doit être capable de pénétrer les cellules endothéliales microvasculaires du cerveau (BMEC) au niveau de la barrière hémato-encéphalique et/ou les cellules épithéliales du plexus choroïdien (CPEC) au niveau de la barrière entre le sang et le liquide céphalo-rachidien. Au niveau du SNC, *S. suis* et GBS font face aux cellules gliales immunitaires, à savoir la microglie, une population de macrophages résidents, et les astrocytes.

*In vitro*, *S. suis* type 2 est capable d'adhérer et d'envahir les BMEC humaines et/ou porcines (164-166). Tout comme pour les cellules épithéliales mucosales, la présence de la CPS interfère partiellement avec l'adhésion et/ou l'invasion de ces cellules (165, 167) en cachant certains composants impliqués dans ces processus comme le LTA (168, 169). *S. suis* type 2 a aussi l'aptitude d'adhérer et d'envahir les CPEC porcines d'autant mieux si l'expression de la CPS a été génétiquement abolie. Finalement, la CPS et la paroi bactérienne agissent en synergie pour induire la libération de la prostaglandine E2 ainsi que de la métalloprotéinase matricielle 9 par

les macrophages humains, ces deux molécules pouvant perturber l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (170). Dans le cas de GBS, il est aussi capable d'adhérer et d'envahir les BMEC humaines (171), et la CPS atténue l'interaction de la bactérie avec ces cellules. GBS adhère aussi aux CPEC humaines (101). D'autres mécanismes cytotoxiques contribuent aussi à la capacité de *S. suis* et de GBS à envahir le SNC (101, 165, 172, 173).

L'inflammation du SNC peut s'expliquer par la capacité de *S. suis* ou GBS à induire la production de médiateurs de l'inflammation par les BMEC (174, 175). La production de cytokines par les astrocytes, les cellules de la microglie et/ou les leucocytes infiltrants pourrait contribuer à la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique ainsi qu'à la méningite lors d'infection à GBS ou *S. suis* (80, 135, 176-178).

Dans le cas de *S. suis*, la production de ces molécules serait préférentiellement induite par les constituants de la paroi bactérienne (174, 176-178). La CPS contribue à la résistance de *S. suis* face à l'internalisation par les cellules de la microglie et régule la réponse inflammatoire en masquant les constituants de la paroi bactérienne (178). Finalement, *S. suis* induit l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et les leucocytes, incluant les monocytes humains (179, 180). Ce phénomène, combiné à la fragilisation de la barrière hémato-encéphalique et à la sécrétion de molécules chémoattractrices par les cellules du SNC, favorise l'invasion du SNC par les leucocytes inflammatoires, ces derniers représentant une source d'inflammation additionnelle (19).

#### **1.2.4. Les récepteurs impliqués**

##### **1.2.4.1. *S. suis***

Au début de ce projet de thèse, la recherche sur les récepteurs engagés dans l'immunopathogénèse de *S. suis* n'est encore qu'à ses débuts, et seul le rôle des TLR est établi. La modulation de l'expression du gène codant pour TLR2 par les cellules myéloïdes du cerveau des souris infectées par *S. suis* type 2 (135), et *in vitro* par les monocytes humains et les cellules de la microglie murine (145, 178), suggère fortement que ce récepteur est impliqué dans la reconnaissance du pathogène par le système immunitaire de l'hôte et/ou dans l'activation subséquente des fonctions cellulaires. Les souris déficientes pour l'expression de TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>) survivent mieux que les souris WT. Alors que les taux bactériens sanguins sont similaires pour les deux

groupes, les souris TLR2<sup>-/-</sup> présentent une production moins exacerbée de cytokines et chémokines dans le sang et/ou au niveau de la rate (181). Il est à noter que cette observation s'applique pour une souche bactérienne européenne et peut différer selon l'origine géographique de la bactérie. *In vitro*, la production de cytokines par les monocytes humains et les macrophages murins stimulés en présence de *S. suis* type 2 est médiée principalement par TLR2 (145), mais d'autres TLR seraient également impliqués. Ceci est suggéré par l'inhibition totale de la production de cytokines par les macrophages MyD88<sup>-/-</sup> (145). Alors que TLR4 (145) et TLR1 (182) ne semblent pas être engagés dans la reconnaissance de la bactérie, la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) humaines nécessite non seulement TLR2, mais aussi TLR6 et TLR9 (182). Il faut toutefois noter que CD14 coopère aussi avec TLR2 lors de la réponse cytokinique inflammatoire des phagocytes mononucléaires (144).

Contrairement à la production de cytokines, la sécrétion de chémokines par les monocytes humains et les macrophages murins induite par *S. suis* type 2, incluant CCL2 et CXCL8, semble être moins strictement dépendante de la présence de TLR2 et de CD14 (144, 145). La sécrétion de CCL2 fait partie d'une cascade pro-inflammatoire où TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  sont produites en amont et modulent en aval la production de chémokines, ce qui complexifie les mécanismes régulant la libération de ces molécules. L'inhibition incomplète de la sécrétion de CCL2 par les macrophages murins MyD88<sup>-/-</sup> suggère qu'une troisième voie TLR-indépendante est impliquée dans la production des chémokines par *S. suis* (145).

Les PAMP exprimés par la bactérie qui sont reconnus par les TLR des phagocytes demeurent très mal connus. Les composants de la paroi bactérienne (145) et en particulier les lipoprotéines (183) sembleraient contribuer à la reconnaissance de *S. suis* type 2 et/ou 9 par le complexe TLR2/6 humain (183). L'ADN purifié de *S. suis* induit l'activation des PBMC humaines via TLR9 (182). Finalement, le récepteur impliqué dans la production *in vitro* de CCL2 par les monocytes/macrophages induite par la CPS purifiée n'a pas été identifié, mais ne semblerait pas appartenir à la famille des TLR (145). Bien que les CPS des sérotypes de *S. suis* contenant de l'acide sialique soient capables de se fixer aux lectines de plantes, l'interaction de ces antigènes avec les lectines exprimées par les leucocytes de mammifères, incluant les CLR et les Siglecs, n'a jamais été évaluée (184).



#### 1.2.4.2. GBS

La recherche portant sur les récepteurs engagés dans l'immunopathogénèse de GBS est plus avancée que pour *S. suis*. Les TLR, les CR et les Siglecs seraient mis en jeu. Cependant, le rôle des TLR dans la résistance *in vivo* à l'infection par GBS demeure complexe et quelque peu controversé. Ainsi, la susceptibilité ou la résistance des souris TLR2<sup>-/-</sup> ou MyD88<sup>-/-</sup> dépend des modèles d'infection, des sérotypes de GBS et/ou des doses bactériennes utilisées (141, 185, 186). Le rôle des TLR dans l'activation *in vitro* des fonctions bactéricides des phagocytes induite par GBS, ainsi que l'identification des facteurs bactériens reconnus par ces récepteurs, sont tout aussi complexes. Alors que la voie des TLR ne semble pas intervenir dans l'internalisation de GBS par les macrophages, ces récepteurs sont mis en jeu dans l'activation des voies des MAPK et du NF-κB ainsi que dans la production de NO/RNS, de cytokines et de chémokines (187). Deux types de PAMP exprimés par GBS sont concernés dans la réponse inflammatoire des macrophages médiée par les TLR. Les premiers, sécrétés par la bactérie, engagent un complexe de récepteurs comprenant TLR2 et TLR6 et correspondraient à des lipoprotéines matures (157). Les seconds, non sécrétés, induisent la production de NO et de cytokines (notamment TNF-α) sous la dépendance de MyD88, mais indépendamment de TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR9 et/ou TLR2/4 (158, 187-189). Cette production nécessite aussi l'internalisation de la bactérie par les macrophages (190). Il est à noter qu'une minorité de gènes liés à la réponse inflammatoire sont tout de même induits de façon TLR2-dépendante par des PAMP non sécrétés (189). En ce qui concerne l'identité de ces seconds types de PAMP, ceux-ci ne correspondraient pas aux composants exposés à la surface bactérienne tels que la CPS, les lipoprotéines ou le LTA (151, 152, 157, 191). De plus, l'activation des macrophages par le LTA est médiée par TLR2/6 (191). Une étude a récemment identifié l'ARN simple brin de GBS (ssRNA) comme étant le PAMP non sécrété indispensable pour promouvoir la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires MyD88-dépendante par les macrophages (158, 159). En particulier, les auteurs ont découvert que la phagocytose de la bactérie entraîne la production de NO par la cellule, qui est à son tour impliquée dans l'acidification du phagolysosome et l'exposition de ssRNA (159). Le(s) récepteur(s) TLR(s) participant à la reconnaissance de ssRNA de GBS à l'intérieur des macrophages demeure inconnu(s).

A côté de la voie des TLR, d'autres récepteurs sont engagés dans la reconnaissance et l'activation des phagocytes par GBS. Alors que l'implication d'un système de reconnaissance intracellulaire est établie, très peu de travaux se sont

penchés sur l'identification des récepteurs mis en jeu. Une première étude a révélé que GBS type III stimule la production d'IFN de type I par les macrophages murins suite à la reconnaissance de l'ADN de la bactérie par un récepteur cytosolique putatif ne faisant pas partie de la famille des TLR ni des récepteurs NOD (130). Une seconde étude a ensuite démontré que GBS induit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les macrophages murins suite à l'échappement de l'ARN bactérien hors du phagolysosome et à son interaction subséquente avec le récepteur cytosolique NLRP3 de l'inflammasome (160).

Un autre récepteur engagé dans l'activation des phagocytes par GBS est CR3, mais son rôle reste controversé (187, 192, 193). Les molécules exprimées par GBS qui interagiraient avec CR3 et mèneraient à la production de médiateurs de l'inflammation ne sont pas bien connues, mais il ne s'agirait pas de la CPS (192). Enfin, divers sérotypes de GBS peuvent se lier *in vitro* à plusieurs types de Siglecs humains recombinants, et cette liaison est dépendante de l'expression de l'acide sialique capsulaire (194). En particulier, GBS type III fixe préférentiellement Siglec-9, tandis que GBS type V a une préférence pour les Siglecs 8, 11, 5 et 6. Au tout début de ce projet, il a été démontré que l'interaction de GBS type III avec Siglec-9, notamment via l'acide sialique, supprime les fonctions bactéricides des neutrophiles humains, incluant la dégranulation et le stress oxydatif, et induit l'augmentation de l'expression de la cytokine inhibitrice IL-10 (195, 196).

➤ Alors que la participation des cellules du système immunitaire inné dans la pathogénèse de *S. suis* et GBS a été relativement bien étudiée, les études portant sur l'interaction de ces deux pathogènes avec les cellules du système immunitaire adaptatif manquaient cruellement dans la littérature au début de ce projet de thèse. En particulier, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse humorale, qui comme nous allons le voir dans la section suivante joue pourtant un rôle critique dans la protection contre *S. suis* et GBS, était un sujet négligé des études immunologiques portant sur ces deux bactéries.

### 1.3. Aspects prophylactiques

#### 1.3.1. Statut actuel de la recherche et du développement vaccinal

##### 1.3.1.1. *S. suis*

Différentes pratiques prophylactiques peuvent être mises en œuvre dans la lutte contre *S. suis* [(1) + **ANNEXE, ARTICLE IV**]. Bien que la technique de sevrage précoce (avec médication) puisse donner des résultats satisfaisants contre certains pathogènes du porc comme *Actinobacillus pleuropneumoniae* ou *H. parasuis*, des études montrent qu'elle ne prévient pas l'apparition de l'infection à *S. suis* chez les porcelets (197), rendant nécessaires le développement de techniques prophylactiques alternatives (5).

Une de ces techniques est la vaccination dans le but d'induire une immunité humorale protectrice. Le rôle crucial de ce type d'immunité dans la défense de l'hôte infecté par *S. suis* a été prouvé à la fois *in vitro* et *in vivo*. Alors que *S. suis* type 2 est résistante à l'élimination *in vitro* par les phagocytes de l'hôte (médiée ou non par le complément), l'ajout d'Ac spécifiques provoque la phagocytose et/ou la destruction du pathogène ainsi opsonisé par les neutrophiles et les monocytes (112, 198-201). *In vivo*, le transfert passif de sérums hyperimmuns spécifiquement dirigés contre les Ag de *S. suis* type 2 confère une protection aux souris et aux porcs face à un challenge homologue (198, 200, 202-205), confirmant le rôle clé joué par les Ac dans l'immunité protectrice. De nombreuses approches ont été suivies dans la recherche d'un vaccin efficace contre *S. suis* (1). Cependant, les seuls vaccins utilisés sur le terrain sont pour la plupart à base de souches de *S. suis* tuées autogènes (c'est-à-dire isolées du troupeau) ou commerciales, encore appelées bactérines, et confèrent généralement une faible protection des porcelets (1, 199, 206). En effet, l'efficacité des bactérines à base de *S. suis* type 2 chez le porcelet est très rarement rapportée dans la littérature et s'applique seulement lorsque des adjuvants toxiques sont utilisés tels que le Spécol® (207, 208), une émulsion eau-dans-huile dont les effets secondaires se sont avérés être parfois aussi toxiques que l'adjuvant complet de Freund (CFA) (209). La vaccination avec une bactérine à base de *S. suis* type 9 ne protège pas non plus significativement les porcelets face à un challenge homologue, et l'absence de protection est corrélée à de faibles taux d'Ac opsonisants (210, 211). Outre la faible efficacité de protection des bactérines face à un challenge homologue, elles sont incapables d'induire une protection croisée face à un challenge avec une souche

hétérologue du même sérotype ou contre un autre sérotype (199). La dégradation des Ag protecteurs lors de l'élaboration de la bactérine ou la production d'Ac dirigés contre des Ag qui ne sont pas associés à des facteurs de virulence pourrait expliquer la faible performance de ces préparations vaccinales (1).

Les stratégies de vaccination à base de bactérines chez le porc décrites ci-dessus reposent sur l'immunisation directe des porcelets, mais une autre technique indirecte consiste à immuniser la truie gestante et est basée sur le transfert passif de l'immunité maternelle de la mère aux porcelets. Toutefois, bien que l'immunisation avec une bactérine à base de *S. suis* type 2 puisse induire le développement d'une réponse humorale composée d'Ac opsonisants chez la truie, ce mode de vaccination ne confère pas de protection suffisante aux porcelets de la portée (212). La vaccination des truies avec une bactérine à base de *S. suis* type 14 ne permet pas non plus de réduire statistiquement la mortalité et la morbidité des porcelets de la portée (213). De plus, à cause du fort effet inhibiteur des Ac maternels sur l'immunisation active des porcelets allaités ou sevrés, les programmes de vaccination actuels où une bactérine à base de *S. suis* type 2 est administrée à la fois à la truie et aux porcelets après leur naissance doivent être révisés (212).

Des vaccins vivants atténués ont fait aussi l'objet de recherches. Ceci est basé sur le fait qu'une souche vivante virulente est capable d'induire une réponse Ac protectrice dans certains essais (202). Ainsi, plusieurs mutants non-virulents ou des souches vivantes naturellement non pathogéniques ont été testés dans des essais de protection expérimentaux chez la souris ou le porc. Outre les résultats décevants en terme de protection, l'introduction d'une souche bactérienne vivante dans un troupeau est une pratique potentiellement à risque en considérant le potentiel zoonotique de *S. suis* (202, 208, 214-217).

Une autre stratégie d'immunisation est alors l'utilisation de vaccins sous-unitaires permettant de cibler précisément le système immunitaire de l'hôte vers une (des) molécule(s) du pathogène en particulier. Les recherches actuelles ciblent des protéines exprimées par la majorité des souches du sérotype 2, mais aussi par la plupart des sérotypes dans le but de créer un vaccin universel. L'immunisation avec différentes protéines exposées à la surface de la bactérie, incluant MRP (« muraminidase-released protein ») en combinaison avec EF (« extracellular factor ») (207), la suilysine (218) ou un Ag de 38 kDa (219), confère une bonne protection aux porcelets face à un challenge homologue avec *S. suis* type 2. Plusieurs autres candidats intéressants exprimés par *S. suis* types 2 et 9, incluant des protéines

membranaires associées à la paroi bactérienne et/ou sécrétées, ont été identifiés par immunoprotéomique grâce à l'utilisation de sérums immuns humain et/ou animal ou encore par analyse du « surfome », consistant à un traitement de la bactérie vivante par des protéases suivie d'une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) des peptides générés (220-224). Alors que l'administration de certaines de ces molécules, le plus souvent en association avec des adjuvants toxiques comme le CFA, assure une protection des souris face une infection subséquente avec *S. suis* type 2 (156, 198, 201, 225-228), 1 (229) et/ou 7 (230), incluant Sao (« surface antigen one ») (201, 230), émolase (225, 230), HP0197 (« hypothetical protein 0197 ») (198), PAPI (« pilus ancillary protein of island 2b ») (226), Sat (« surface antigen two ») (227), SSPepO (228) et abpb « amylase-binding protein B » (156), leur potentiel protecteur chez le porc dans une formulation vaccinale compatible avec les pratiques en médecine vétérinaire reste à être évalué. Finalement, tout comme pour les vaccins à base de bactérie entière, un même vaccin sous-unitaire n'a pas réussi pour l'instant à conférer une protection chez le porc contre différents sérotypes de *S. suis* (199).

Ainsi, malgré de nombreux essais d'immunisation avec différents types de préparations vaccinales, le développement d'un vaccin protecteur et/ou à large spectre contre *S. suis* représente encore un défi à l'heure actuelle.

### **1.3.1.2. GBS**

La seule stratégie de prévention disponible actuellement contre GBS consiste en l'administration d'antibiotiques intrapartum chez les femmes enceintes où une colonisation rectovaginale est dépistée, incluant la pénicilline et l'ampicilline (231). Cette stratégie instaurée en 1996 s'est avérée très efficace et a permis de réduire l'incidence de la EOD de 70 % entre 1996 et 1998 aux USA (13). Toutefois, malgré le dépistage universel des femmes enceintes et le suivi strict des lignes directrices de ce programme prophylactique, on continue encore de dénombrier annuellement des cas d'EOD. De plus, l'antibioprophylaxie intrapartum n'a aucune influence sur la LOD ni sur la maladie chez la femme enceinte (13, 231). Finalement, l'utilisation d'antibiotiques à grande échelle a eu un impact négatif avec l'émergence de souches de GBS résistantes à divers antibiotiques comme l'érythromycine et la clindamycine qui sont fréquemment prescrits en cas d'allergie à la pénicilline (231). De plus, cette prophylaxie contre GBS a profondément altéré le profil des micro-organismes à l'origine des maladies EOD, avec certes une baisse considérable des cas dus à GBS,

mais une forte augmentation d'infections causées par les bactéries Gram-négatives comme *E. coli* et *H. influenzae* (231). Ainsi, tout comme pour *S. suis*, une autre alternative dans la lutte contre GBS est nécessaire.

Un premier ensemble de travaux s'est concentré sur le développement de vaccins sous-unitaires composés de protéines exprimées à la surface de GBS (232). Plusieurs d'entre elles, hautement conservées entre les sérotypes et les souches de GBS, sont capables d'induire une forte réponse IgG protectrice face à un challenge avec divers sérotypes de GBS chez la souris. Parmi ces protéines, Sip (« surface immunogenic protein ») administrée aux souris les protège face à l'infection par GBS types Ia, Ib, II, III, V et VI, faisant de cette molécule un candidat de choix pour un vaccin universel (233). Aussi, l'immunisation avec LrrG (« leucine-rich repeat group B protein») ou ScpB (« streptococcal C5a peptidase of GBS ») permet aux souris de lutter efficacement contre une infection subséquente avec une souche de GBS type III et VI, respectivement (234, 235). L'expression de ces deux molécules par la plupart, si ce n'est par tous les sérotypes de GBS, font de ces protéines des candidats intéressants pour un vaccin à couverture mondiale (232). Toutefois, aucune preuve expérimentale de la capacité de LrrG ou ScpB à induire une protection face à de multiples sérotypes de GBS n'est pour l'instant disponible. Finalement, d'autres protéines, incluant Rib (« resistance to proteases, immunity, group B protein ») d'une part, et ACP (« alpha C protein ») et BCP (« beta C protein ») d'autre part, confèrent une protection face à un challenge contre GBS type III et Ia, respectivement (232). Toutefois, ces protéines ne sont exprimées que par certains sérotypes, voire même seulement par certaines souches à l'intérieur d'un sérotype donné, et induisent très peu/pas de protection croisée. A cet égard, les prototypes vaccinaux composés d'une association de ces protéines entre elles (Rib + ACP) (236) ou bien avec la CPS de GBS III ([ACP + CPS] ou [BCP + CPS]) (237, 238) assurent une bonne couverture vaccinale contre les sérotypes Ia, Ib, II et III de GBS chez la souris. Finalement, l'utilisation de nouvelles méthodologies telles que la « vaccinologie inversée », consistant à cribler le génome des bactéries à la recherche d'Ag de surface susceptibles de déclencher une bonne réponse Ac, a conduit à l'identification de trois protéines pili. Celles-ci, administrées en association avec Sip, confèrent une protection contre les sérotypes Ia, Ib, II, III, V et VIII de GBS dans un modèle d'infection chez la souris, qui est corrélée avec la présence d'Ac opsonisants (239).

En parallèle de l'élaboration de prototypes vaccinaux protéiques, une deuxième série de travaux s'est concentrée sur le développement de vaccins à base de CPS, et

cette molécule représente la seule cible des essais cliniques humains réalisés jusqu'à maintenant (voir section suivante).

### **1.3.2. La CPS comme cible antigénique prometteuse de l'immunité humorale protectrice**

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* chez l'homme et/ou l'animal pointent la CPS comme étant une cible vaccinale extrêmement intéressante dans la lutte contre *S. suis* et GBS. La CPS constitue en effet la couche la plus externe de la bactérie et donc la cible des Ac opsonisants protecteurs.

Le rationnel du développement vaccinal à base de CPS dans la lutte contre GBS chez l'homme réside dans l'observation d'une corrélation entre la présence d'IgG « naturels » dirigés contre la CPS de GBS type III ou la chez la femme enceinte, présentant un fort pouvoir opsonisant *in vitro*, et un plus faible risque d'accoucher d'un bébé développant la EOD (240-242). Toutefois, le problème réside dans le fait que la majorité des femmes ne possède pas de taux d'Ac anti-CPS « naturels » suffisamment élevés. Dans les années 1980, les essais cliniques de vaccination avec la CPS purifiée chez l'homme (CPS types Ia, II ou III) et la femme enceinte (CPS type III) démontrent une immunogénicité modeste de ces molécules (13). Pour les femmes enceintes qui répondent à l'immunisation, des Ac anti-CPS sont détectés à des doses substantielles dans le sang de cordon et possèdent une activité bactéricide *in vitro* (243). En écho avec le développement de vaccins conjugués à base de CPS dans la lutte contre *H. influenzae* et *S. pneumoniae*, des essais vaccinaux sont conduits chez l'homme à partir du milieu des années 90 avec des conjugués monovalents composés de la toxoïde tétanique (TT) couplée à la CPS de GBS sérotype III dans un premier temps, puis ensuite aux sérotypes Ia, Ib, II, V (13). Tous ces essais sont concluants, les vaccins sont bien tolérés et une seule injection en absence d'adjuvant est globalement suffisante pour une détection d'Ac jusqu'à au moins 2 ans après immunisation (13). Les sujets vaccinés développent une réponse Ac anti-CPS significative (le critère de significativité correspondant à une augmentation d'au moins 4 fois des titres d'IgG par rapport aux titres pré-immuns à 8 semaines post-immunisation), avec un pourcentage de réponse variant de 80% à 100% (13). La réponse est largement dominée par les IgG à bon pouvoir bactéricide *in vitro* et protecteur *in vivo* lorsqu'administrés passivement chez l'animal avant le challenge bactérien (13). Dans les années 2000, un essai vaccinal avec la CPS GBS III-TT chez la femme enceinte conclut également à une bonne réponse IgG anti-CPS avec un excellent transfert transplacentaire de ces

Ac (244). Du fait de l'absence de protection croisée entre les sérotypes, la recherche s'est aussi concentrée sur le développement de vaccins multivalents. Le seul prototype de vaccin conjugué divalent administré jusqu'à présent chez l'homme en essais cliniques est composé des CPS de GBS types II et III. Le vaccin induit le développement d'Ac dirigés à la fois contre les CPS types II et III à des taux et avec une activité bactéricide *in vitro* similaires à chaque conjugué monovalent injecté séparément (245). Un autre essai vaccinal avec un conjugué trivalent comportant les CPS de GBS types Ia, Ib et III est actuellement en cours chez la femme enceinte (246).

Malgré ces résultats plutôt concluants, une exception pourrait concerner le vaccin conjugué à base de CPS de GBS type V. En effet, par des mécanismes mal compris, la réponse Ac anti-CPS face à ce vaccin est dominée par les IgM et non les IgG. Cet isotype d'Ig possède un moins grand potentiel protecteur et ne passe pas la barrière placentaire, un inconvénient majeur dans la lutte contre les infections néonatales à GBS (247). Ce profil isotypique pourrait être problématique aussi chez les personnes âgées qui ont tendance à développer une réponse IgG anti-CPS face à ce conjugué plus faible que l'adulte de moins de 50 ans (13, 248). Il est indispensable de s'assurer d'avoir un vaccin efficace contre GBS type V étant donné que, comme expliqué ci-dessus, il s'agit du sérotype le plus souvent isolé chez les personnes de plus de 65 ans et c'est cette catégorie qui est maintenant la plus touchée par l'infection à GBS dans les pays occidentaux.

Dans le cas de *S. suis*, quelques études démontrent un fort potentiel protecteur des Ac anti-CPS dans la lutte contre *S. suis*. *In vitro*, l'ajout d'Ac dirigés contre la CPS de *S. suis* type 2 augmente la capacité bactéricide des cellules porcines sanguines, incluant les monocytes et les neutrophiles, envers la bactérie (199, 200, 249). *In vivo*, le transfert passif d'Ac monoclonaux spécifiquement dirigés contre la CPS de *S. suis* type 2 permet aux souris de résister à un challenge homologue (200). De plus, la comparaison de l'efficacité protectrice de deux bactérines à base de *S. suis* type 2, l'une encapsulée et l'autre composée de son mutant isogénique non encapsulé, suggère que la présence d'Ac anti-CPS est nécessaire pour conférer une protection optimale (208). Finalement, une étude descriptive datant des années 1990 a montré que les porcelets infectés par une souche vivante de *S. suis* type 2 développent une réponse IgG anti-CPS sérique relativement faible (250). Cependant, la CPS de *S. suis* n'a jamais fait l'objet d'études plus poussées en qualité d'Ag vaccinal.



- Ainsi, en plus d'être un facteur de virulence majeur pour *S. suis* et GBS, la CPS est une cible vaccinale de choix, non seulement parce que les Ac anti-CPS ont un fort potentiel protecteur, mais aussi parce qu'une préparation à base de CPS de différents sérotypes pourrait être la clé d'un vaccin universel. Paradoxalement, la recherche immunologique sur *S. suis* et GBS, deux bactéries pour lesquelles aucun vaccin commercial n'est actuellement disponible, s'est très peu, voire pas du tout, concentrée sur les mécanismes du développement de la réponse humorale anti-CPS. La compréhension de l'orchestration cellulaire et moléculaire de cette réponse est indispensable pour le développement de vaccins à base de CPS efficaces contre l'infection à *S. suis*, un champ de recherche inexistant, ainsi que pour l'amélioration du design vaccinal de ceux mis au point en essais cliniques dans la lutte GBS.
- Dans la seconde partie de cette revue de la littérature, nous allons décrire les connaissances que nous avons présentement sur les mécanismes du développement de la réponse Ac anti-CPS.

## 2. Les mécanismes du développement de la réponse humorale dirigée contre la CPS

La capacité d'un Ag à déclencher une réponse humorale spécifique chez l'hôte, c'est-à-dire son immunogénicité, est déterminée à la fois par des facteurs expérimentaux, comme la biologie de l'hôte (âge, génotype) et les paramètres d'injection (dose, voie, fréquence, ajout d'adjuvant), ainsi que par des facteurs intrinsèques à l'Ag lui-même. Tout d'abord, afin de susciter une réponse immunitaire, l'Ag injecté doit être perçu par l'organisme receveur comme ne faisant pas partie du soi. Ainsi, des Ag dont la composition et/ou la structure sont similaires à des molécules exprimées par les cellules de l'hôte ne présenteront pas une bonne immunogénicité. D'autres critères physico-chimiques tels que la taille moléculaire et l'hétérogénéité chimique entrent également en jeu. Finalement, la sensibilité de l'Ag à l'internalisation, à l'apprêtement et à la présentation par les cellules présentatrices d'Ag (APC) au niveau des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) détermine aussi critiqueusement son degré d'immunogénicité.

### 2.1. Définitions générales

#### 2.1.1. Les deux classes d'antigènes (Ag)

Classiquement, deux catégories d'Ag sont capables d'induire une réponse Ac chez l'hôte, les Ag thymo-dépendants (TD) et thymo-indépendants (TI). Les caractéristiques générales de ces deux types d'Ag sont résumées dans le **Tableau II**.

Les protéines représentent les Ag TD prototypiques. Ces Ag sont reconnus sous leur forme native par le récepteur des LB (BCR) et sous la forme de peptides associés aux molécules du CMH-II par le récepteur des LT (TCR). Le développement de la réponse humorale face aux Ag TD requiert la présence des LT CD4<sup>+</sup>.

Un Ag TI se définit originellement par sa capacité à induire une réponse humorale chez l'hôte déficient en LT, comme par exemple la souris *nude* athymique (251). Les Ag TI peuvent être classés en deux groupes, les Ag TI-1, incluant le LPS, et les Ag TI-2. Le groupe des Ag TI-2 comporte plusieurs types de molécules incluant des polymères saccharidiques naturels, tels que la CPS ou les polysaccharides de la

paroi bactérienne comme l'acide téichoïque, et des polymères synthétiques formés d'une matrice polysaccharidique, tels que le dextrane ou le Ficoll, couplée (ou non) à un haptène, comme le dinitrophénol (DNP) ou le trinitrophénol (TNP). Les polymères synthétiques, très largement utilisés dans la littérature, permettent d'évaluer expérimentalement les mécanismes d'activation des LB spécifiques pour un Ag donné grâce à la disponibilité de souris qui ont été modifiées génétiquement pour exprimer un BCR spécifique de l'haptène. Contrairement aux Ag TI-1, des mitogènes qui entraînent une stimulation polyclonale des LB indépendamment de la spécificité antigénique du BCR, les Ag TI-2 induisent une activation de clones de LB via l'agrégation du BCR dont ils sont spécifiques (251-253). Nous allons nous concentrer par la suite exclusivement sur la catégorie des Ag TI-2 qui va être regroupée sous le terme « Ag TI » par mesure de simplicité.

Une caractéristique majeure des Ag TI qui les différencie des Ag TD est leur incapacité à se complexer aux molécules du CMH-II, et donc d'être présentés aux LT (251-253). Par définition, les Ag TI présentent ainsi généralement une moins bonne immunogénicité que les Ag TD. Les ZPS bactériennes constituent cependant une exception car elles ont la particularité de pouvoir être traitées, présentées à la surface des APC au niveau des molécules du CMH-II et ainsi activer les LT (30). Les ZPS possèdent des propriétés immunologiques qui leur sont propres mais qui ne seront pas relatées ici, cette classe de CPS ne faisant pas l'objet de cette thèse. Les Ag TI diffèrent aussi des Ag TD par leur incapacité à induire une réponse Ac chez un hôte dont le système immunitaire est considéré comme immature, tels que les enfants de moins de 2 ans et les souriceaux de moins de trois semaines. De plus, ces Ag ne peuvent pas déclencher une réponse humorale chez les individus présentant des mutations dans le gène codant pour la protéine tyrosine kinase (PTK) de Bruton (Btk), une enzyme intervenant dans la voie de signalisation du BCR, ce qui est le cas des souris *xid* (« X-linked immunodeficiency ») et des humains souffrant d'agammaglobulinémie liée à l'X (251). D'un point de vue biochimique, les Ag TI possèdent généralement une masse moléculaire relativement élevée d'au moins 100 kDa et expriment des épitopes antigéniques multiples, identiques, répétés et ordonnés. L'espacement bidimensionnel de 5 à 10 nm entre les épitopes ainsi que leur rigidité gouvernent de façon critique les propriétés activatrices des Ag TI (251, 252).

A la surface du LB, le complexe du BCR se compose d'Ig membranaires (mIg), impliquées dans la fixation de l'Ag et qui peuvent lier simultanément deux épitopes identiques grâce à leur structure bivalente, associées à un hétérodimère Ig- $\alpha$ /Ig- $\beta$  qui prend part à la transmission du signal à l'intérieur de la cellule. De par leur structure multimérique, les Ag TI possèdent la capacité remarquable de pouvoir agréger un

grand nombre de mlg dont ils sont spécifiques, délivrant alors un signal fort et rapide d'activation au LB (252). Brièvement, le premier événement de la cascade de la signalisation intracellulaire consiste en la phosphorylation et l'activation de plusieurs PTKs étroitement associées au complexe du BCR, qui sont à leur tour impliquées dans le recrutement et la phosphorylation d'autres PTKs incluant Btk. L'activation de Btk est potentialisée par son recrutement à la membrane cellulaire via le phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3), un produit de la conversion du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) par la PI-3K. Btk active à son tour la phospholipase PLC $\gamma$ 2, qui clive PIP2 pour générer le diacylglycérol, activateur de la PKC, et l'inositol triphosphate (IP3), générateur d'un influx intracellulaire persistant de Ca<sup>2+</sup>. Ces molécules sont à l'origine de différentes cascades de signalisation, incluant la voie des MAPK et du NF- $\kappa$ B, qui aboutissent à une régulation transcriptionnelle des gènes impliqués notamment dans l'activation, la prolifération et la survie des LB (252). Même si l'existence d'un « signalosome », mettant en jeu les molécules Btk, PI-3K, PLC $\gamma$ 2 et PKC, ait été proposée comme étant cruciale pour l'induction des réponses aux Ag TI, l'implication différentielle des molécules de la signalisation du BCR dans les réponses aux Ag TD et TI reste toutefois à être mieux définie (254). De plus, la majorité de ces études ont été effectuées en présence d'Ag TI synthétiques, et la nature de la signalisation intracellulaire subséquente à la stimulation du BCR par un Ag polysaccharidique naturel demeure méconnue. Bien que le signal puissant fourni par l'engagement du BCR par l'Ag TI permette d'initier l'activation des LB, il n'est cependant pas suffisant pour induire leur différenciation en cellules sécrétrices d'Ac (251, 252). Ainsi, le développement de la réponse humorale TI, bien qu'indépendant de la présence des LT, n'en nécessite pas moins l'intervention de cellules auxiliaires et/ou de molécules complémentaires, ce que nous allons décrire plus en détails dans la section 2.2.

**Tableau II. Comparaison des caractéristiques générales des Ag TD et TI.**

| <b>Propriétés chimiques</b>              | <b>Antigène TD</b> | <b>Antigène TI</b> |
|--|--------------------|--------------------|
| nature                                   | protéique          | polysaccharidique  |
| structure                                | mono/oligomérique  | multimérique       |
| poids moléculaire                        | variable           | élevé              |
| biodégradabilité                         | variable           | faible             |
| <b>Propriétés de la réponse humorale</b> | <b>Antigène TD</b> | <b>Antigène TI</b> |
| sous-populations de LB impliquées        | LB FO              | LB MZ, LB-1        |
| commutation isotypique                   | oui                | limitée (IgG3)     |
| maturation d'affinité                    | oui                | non                |
| réponse chez l'hôte jeune                | oui                | non                |
| réponse chez l'hôte déficient en LT      | non                | oui                |

TD : thymo-dépendant; TI : thymo-indépendant; LB : lymphocyte B; LT : lymphocyte T; FO : folliculaire; MZ : zone marginale. *D'après (251, 252).*

### **2.1.2. La bactérie : une mosaïque d'Ag thymo-dépendants (TD) et thymo-indépendants (TI)**

Même si les Ag TD et TI représentent deux types d'immunogènes aux propriétés distinctes, générant, par des mécanismes qui leur sont propres, des réponses humorales de natures différentes, une telle dichotomie n'est en réalité pas aussi présente dans le contexte physiologique d'une réponse humorale au cours d'une infection bactérienne. Une bactérie est en effet une structure antigénique complexe où une multitude d'Ag TD, incluant des protéines membranaires et de la paroi, sont associés à une multitude d'Ag TI, incluant la CPS et les polysaccharides de la paroi, au sein d'une même particule, formant entre eux différents types de liaisons covalentes et non covalentes (255, 256). Ces multiples PAMP sont prompts à moduler différemment les réponses immunitaires de l'hôte via leur interaction avec les PRR dont ils sont spécifiques. L'expression de la CPS dans le contexte d'une bactérie entière est donc susceptible de lui conférer des propriétés immunologiques uniques en comparaison avec la CPS sous forme libre soluble (255, 256). Au début de ce projet de thèse, la plupart des études s'étaient penchées sur la réponse humorale dirigée contre les Ag TI solubles purifiés, et les caractéristiques de la réponse Ac anti-CPS suite à l'infection par une bactérie encapsulée avaient été très peu évaluées.

➤ Dans la section qui va suivre, nous allons décrire les mécanismes cellulaires et moléculaires des réponses humorales TD et TI. Alors que les étapes du développement de la réponse Ac TD ont été énormément étudiées et sont très bien caractérisées à l'heure actuelle, nos connaissances sur la réponse Ac TI sont bien plus restreintes. Nous n'évoquerons ces aspects que chez la souris, étant donné que ce projet de thèse a porté plus spécifiquement sur cet hôte.

## **2.2. Les acteurs cellulaires de la réponse humorale anti-CPS**

### **2.2.1. Les lymphocytes B (LB)**

#### **2.2.1.1. Les sous-types de LB**

Chez la souris, les LB matures naïfs se divisent en deux groupes, les LB-1, comprenant les LB-1a et LB-1b, et les LB-2, comprenant les LB folliculaires (FO) et les LB de la zone marginale (MZ). Ces cellules sont distinguables par leur ontogénie, leur caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles et leur localisation micro-anatomique (257, 258).

Les LB FO constituent la population majoritaire des LB des organes lymphoïdes secondaires (plus de 70% des LB totaux de la rate) et du sang. Ce sont des cellules circulantes qui font la navette entre le sang/lymphe et les follicules B des organes lymphoïdes secondaires jusqu'à ce qu'elles rencontrent leur Ag spécifique. Ces lymphocytes possèdent un répertoire naïf extrêmement diversifié et sont communément impliqués dans les réponses humorales TD.

Les LB MZ représentent 5% des LB périphériques et 15% des LB de la rate. Ce sont des cellules non circulantes qui résident dans la MZ de la rate, une région qui démarque la pulpe blanche de la pulpe rouge. De ce fait, les LB MZ sont localisés aux portes d'entrée des pathogènes provenant de la circulation sanguine.

Finalement, les LB-1 se retrouvent préférentiellement dans les cavités coelomiques péritonéales et pleuro-péricardiques, où ils peuvent représenter jusqu'à 20% des cellules mononuclées, et constituent ainsi la première ligne de défense contre les pathogènes pénétrant les séreuses. Ces cellules sont capables de se délocaliser et se retrouvent au niveau du MALT de l'intestin, dans la circulation sanguine, et dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques et la rate où elles se logent principalement dans la MZ. Alors que les LB-1a sont responsables de la

production constitutive d'Ac autoréactifs et peuvent être considérés comme des acteurs de l'immunité humorale « innée », les LB-1b interviendraient préférentiellement dans les réponses humorales TI. Nous reviendrons sur ce concept par la suite.

Les LB murins expriment plusieurs types de PRR, notamment les TLR et les Siglecs. Les différents sous-types de LB expriment globalement les mêmes TLR, les TLR 7, 9 et 1 étant généralement présents de façon prédominante. L'expression quantitative de ces récepteurs est aussi assez semblable, même si les TLR 3 et 8 sont préférentiellement exprimés par les LB spécialisés dans les réponses TI (259). Ces conclusions diffèrent parfois quelque peu entre les études, et cela peut être relié aux méthodes de purification des LB, au statut génétique et/ou à l'âge de la souris (260). Alors que CD22/Siglec-2 et Siglec-G se retrouvent à la fois chez les LB FO, les LB MZ et les LB-1 péritonéaux (37, 261), Siglec-E serait exprimé plus particulièrement par ces deux derniers sous-types (262).

Une fois activés, les LB entrent dans une phase de prolifération. Une fraction de ces cellules proliférantes sécrètent des Ac et sont dénommées plasmoblastes. Finalement, les plasmocytes correspondent à l'étape de différenciation finale des LB et sont des cellules sécrétrices d'Ac qui ne prolifèrent plus. Il existe différents sous-types de plasmocytes comme nous allons le voir plus loin. Les plasmoblastes et les plasmocytes peuvent être regroupés sous le nom d'ASC (« antibody secreting cells »). Le **Tableau III** décrit les caractéristiques phénotypiques des différents sous-types de LB naïfs et de plasmocytes.

Tableau III. Marqueurs phénotypiques des différents sous-types de LB naïfs et de plasmocytes chez la souris.

| Marqueur | Sous-type de LB |       |                                      | Sous-type de plasmocytes          |                                   |
|----------|-----------------|-------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|          | LB FO           | LB MZ | LB-1                                 | plasmocytes à courte durée de vie | plasmocytes à longue durée de vie |
| CD19     | ++              | ++    | +++                                  | +                                 | -                                 |
| B220     | ++              | ++    | +                                    | +                                 | -                                 |
| IgM      | +               | +++   | +++                                  | -                                 | -                                 |
| IgD      | +++             | +/-   | +/-                                  | -                                 | -                                 |
| CD21/CR2 | ++              | +++   | +/-                                  | -                                 | -                                 |
| CD23     | ++              | -     | -                                    | -                                 | -                                 |
| CD11b    | -               | -     | + (cavités péritonéales)<br>- (rate) | -                                 | -                                 |
| CD5      | -               | -     | + (LB-1a)<br>- (LB-1b)               | -                                 | -                                 |
| CD9      | -               | ++    | ++                                   | ++                                | ++                                |
| CD43     | -               | -     | +                                    | +                                 | -                                 |
| CD138    | -               | -     | -                                    | +                                 | +                                 |

LB : lymphocyte B; FO : folliculaire; MZ : zone marginale. *D'après (257, 258, 263).*

### 2.2.1.2. L'ontogénèse des LB

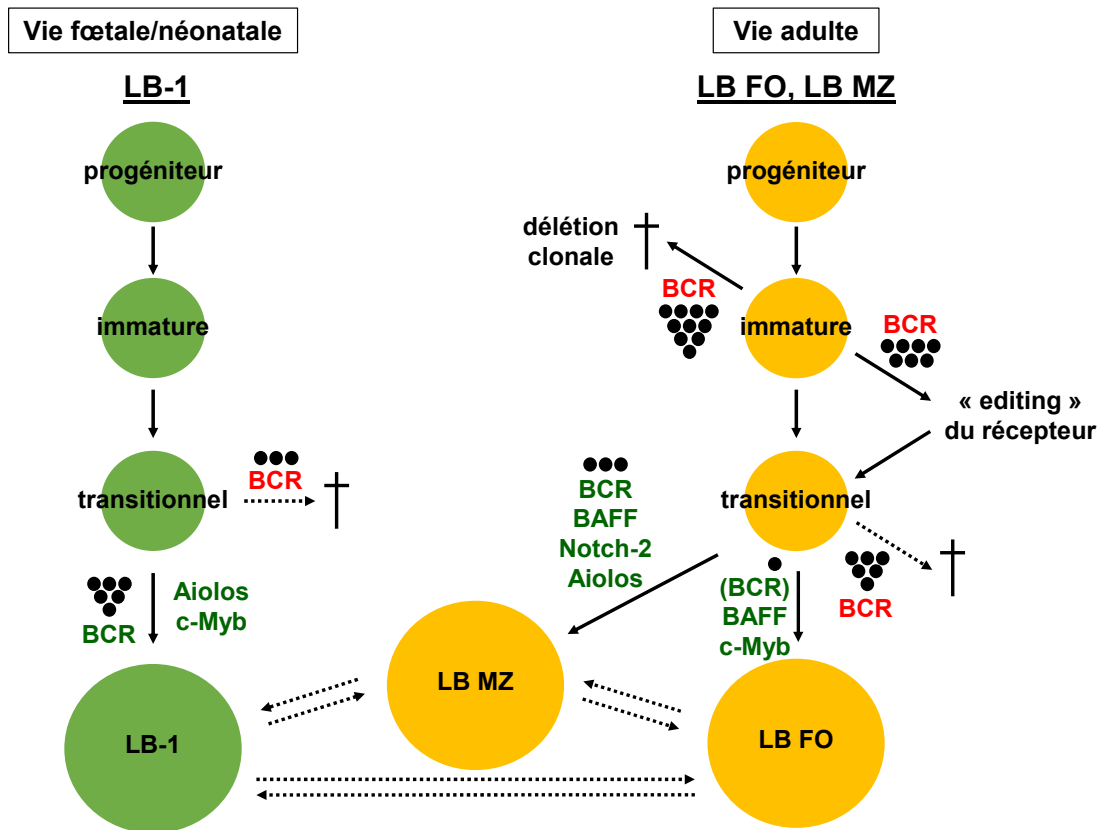
La génération des LB immatures se déroule dans la moelle osseuse indépendamment de la présence de l'Ag étranger. En revanche, le microenvironnement fourni par les cellules stromales joue un rôle critique, notamment via l'expression de diverses molécules d'adhésion ainsi que la sécrétion d'IL-7. Les premières cellules possédant les caractéristiques de la lignée des LB, les cellules pro-B, sont générées à partir d'un précurseur lymphoïde commun provenant lui-même des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Le passage du stade « pro-B » à « pré-B » se caractérise par le réarrangement des segments géniques *VDJ* des chaînes lourdes des Ig, aboutissant à une cellule exprimant à sa surface un « pré-BCR » composé d'une chaîne lourde complète  $\mu$  (codée par le gène  $C\mu$ ) et d'une pseudo-chaîne légère. La poursuite du développement d'une cellule pré-B vers une cellule B immature nécessite un réarrangement des gènes des chaînes légères productif. Les LB immatures expriment alors une mIgM à leur surface qui est associée à un hétérodimère  $Ig\alpha/Ig\beta$ , l'ensemble de ce complexe formant un BCR fonctionnel capable d'interagir avec l'Ag. De nombreux facteurs de transcription interviennent dans la maturation des



LB qui régulent notamment l'expression des gènes *rag* (« recombination-activating genes »).

Les LB immatures deviennent des LB transitionnels avant de se différencier en LB matures (257). D'anciens modèles de la maturation des LB décrivaient un développement séquentiel linéaire avec l'apparition des LB transitionnels à la périphérie, générés à partir d'un précurseur de la moelle osseuse, qui aboutissait à une différenciation bidirectionnelle, soit en LB FO, soit en LB MZ. Toutefois, il est maintenant établi que les LB-2 matures, du moins les LB FO, proviennent d'au moins deux voies, une première où les LB transitionnels sont générés et poursuivent leur maturation dans la moelle osseuse et une seconde voie analogue mais se déroulant en périphérie. Contrairement aux LB-2 qui se développent continuellement au cours de la vie adulte à partir de cellules progénitrices de la moelle osseuse, les LB-1 proviendraient majoritairement de progéniteurs issus des tissus hématopoïétiques du foie foetal dont la population se renouvelle ensuite d'elle-même à l'âge adulte. Toutefois, l'identification de progéniteurs des LB-1 dans la moelle osseuse laisse suggérer qu'en plus d'un auto-renouvellement de cellules matures, la population de LB-1 pourrait aussi provenir de la différenciation de cellules progénitrices au cours de la vie adulte (264). Finalement, la rate jouerait aussi un rôle dans la génération et la maintenance du pool de LB-1a (265).

L'orientation de la différenciation des LB transitionnels vers les différents sous-types de LB est gouvernée par plusieurs facteurs de transcription, par la force d'engagement du BCR, ainsi que par l'interaction de BAFF (« B cell-activating factor of the TNF family ») avec BAFF-R (« BAFF receptor ») (voir **Figure 6**) (257, 266, 267).



**Figure 6. Modèle des facteurs impliqués dans l'ontogénèse des LB.**

LB : lymphocyte B; BCR : B-cell receptor; FO : folliculaire; MZ : zone marginale; Aiolos : ikaros family zinc finger 3 (IKZF3); Notch-2 : neurogenic locus notch homolog protein 2; Myb : myeloblastosis; BAFF : B cell-activating factor of the TNF family. *D'après (266).*

### 2.2.1.3. La réponse humorale TD

La réponse humorale TD se déroule communément dans les organes lymphoïdes secondaires et nécessite trois acteurs à savoir les LT CD4<sup>+</sup>, les LB de même spécificité antigénique et les APC, plus particulièrement les DC. Les étapes décrites ci-après concernent plus particulièrement les événements se déroulant dans la rate.

#### 2.2.1.3.1. La réponse humorale TD primaire

Suite à la capture de l'Ag au niveau du site de pénétration, les DC migrent vers les organes lymphoïdes secondaires, tout en subissant un processus de maturation qui sera plus détaillé dans la section 2.2.2.1.3. Elles peuvent alors présenter les peptides dérivés de l'Ag, au niveau des molécules du CMH-II, aux clones de LT CD4<sup>+</sup> naïfs spécifiques et activer ces dernières via l'instauration d'une première synapse immunologique (voir section 2.2.2.1.3). Lorsque les clones de LB naïfs rencontrent ce

même Ag dont ils sont spécifiques, sous forme soluble ou bien complexée aux DC, cela induit leur survie et leur activation. Après internalisation, l'Ag est traité et apprêté au niveau des molécules du CMH-II par les LB. L'augmentation de l'expression de CCR7 (récepteur pour les chémokines CCL19 et CCL21 sécrétées par les LT des organes lymphoïdes secondaires) provoque la migration de ces LB activés vers le manchon lymphoïde périartériel de la rate (appelé aussi zone T) où ils sont à leur tour piégés au contact du couple DC/LT CD4<sup>+</sup> activé de même spécificité antigénique, constituant la deuxième synapse immunologique. La communication spécifique entre les LT et les LB, mettant en jeu les interactions TCR/CMH-II-peptide, CD40L/CD40, CD28/B7 ainsi que diverses cytokines, conduit à une prolifération intense des clones de LB qui deviennent par définition des blastes. Ceux-ci forment alors des foyers primaires à la périphérie de la zone T à partir desquels peuvent découler deux types de réactions, la réaction folliculaire et la réaction extrafolliculaire (voir **Figure 7**). Ces deux voies ne sont pas mutuellement exclusives et sont souvent sollicitées conjointement (263).

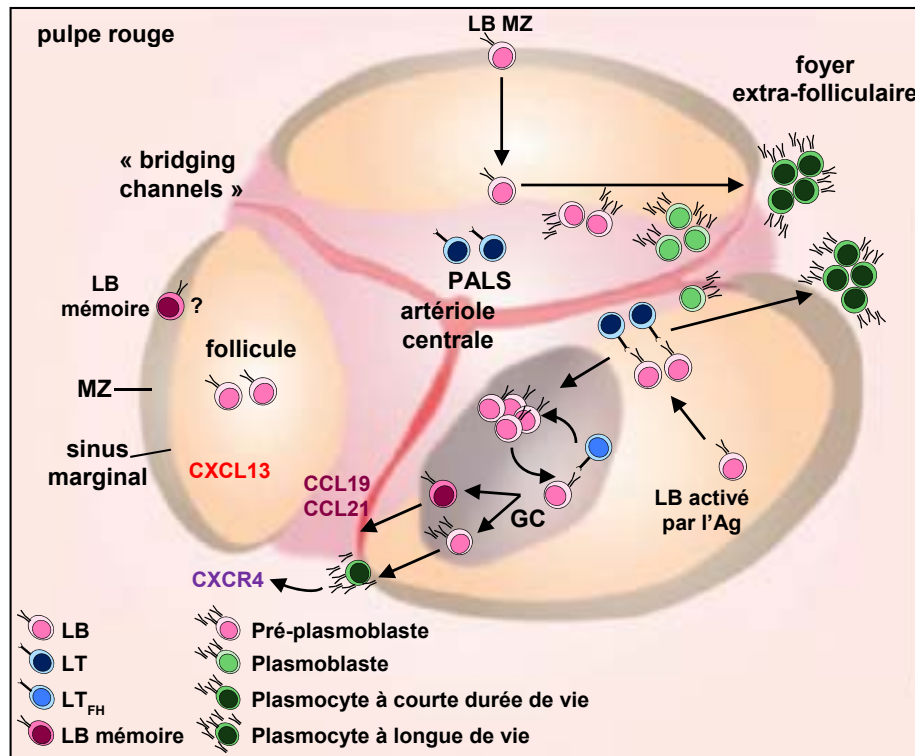
La réaction extrafolliculaire, qui correspond à une phase précoce d'activation des LB (en 3 jours), résulte principalement en la génération de plasmocytes à courte durée de vie non migratoires sécrétant d'Ac de faible affinité. La réaction folliculaire, plus lente, génère les LB mémoires et les plasmocytes à longue durée de vie sécrétant d'Ac de forte affinité, qui se logent dans la moelle osseuse (263). Du fait de leur localisation anatomique stratégique, de leur répertoire naïf polyréactif contre des épitopes conservés par les pathogènes et de leur programme génétique pré-orienté vers la différenciation en plasmocytes, les LB MZ et les LB-1 ont un plus grand potentiel que les LB FO à participer aux réponses extrafolliculaires. Toutefois, les LB MZ sont tout aussi capables de participer aux réactions folliculaires lors des réponses TD (268), et les LB FO peuvent prendre part aux réactions extrafolliculaires (269). La nature de l'Ag, et notamment sa force d'interaction avec le BCR (270), ainsi que la sécrétion de certaines cytokines par les LT (263), pourraient également influencer l'orientation vers l'une ou l'autre des deux réactions.

La réaction folliculaire débute par l'entrée des blastes dans les follicules primaires qui évoluent ensuite en une structure appelée centre germinatif. Les LB y subissent alors deux processus, sous la gouvernance de l'enzyme AID (« activation-induced cytidine deaminase »), qui contribuent à la grande diversité du répertoire des Ig des LB FO, à savoir la maturation d'affinité et la commutation de classe (CSR « class-switch recombination ») (263). Plus en détails, au niveau de la zone sombre des centres germinatifs, les LB à très forte activité mitotique, appelés centroblastes,

subissent le phénomène d'hypermutations somatiques qui correspond à l'introduction ponctuelle de mutations dans les gènes réarrangés des régions variables des chaînes lourdes et légères des Ig (263). Les centroblastes quittent ensuite le cycle cellulaire, migrent vers la zone claire du centre germinatif, et deviennent des centrocytes qui sont des cellules quiescentes très sensibles à l'apoptose. A cet endroit, seules les cellules qui portent une Ig de forte affinité reçoivent des signaux de survie, prolifération et différenciation fournis à la fois par les LT CD4<sup>+</sup> ainsi que par l'Ag présenté par les DC folliculaires (263). C'est aussi dans la zone claire que se déroule la CSR (263). Au cours de la CSR, le gène C<sub>μ</sub> est remplacé par le gène C<sub>γ</sub>, C<sub>α</sub> ou C<sub>ε</sub> suite à la recombinaison de séquences d'ADN localisées en amont de C<sub>μ</sub>, nommées régions de recombinaison S<sub>μ</sub>, avec une région analogue S<sub>γ</sub>, S<sub>α</sub> ou S<sub>ε</sub> en amont de C<sub>γ</sub>, C<sub>α</sub> ou C<sub>ε</sub>, respectivement (271, 272). La CSR nécessite la transcription du gène *aicda* codant pour AID, ainsi que la transcription du locus germinatif *IgH* initiée par le promoteur I<sub>H</sub> en amont des régions S<sub>H</sub> engagées dans la commutation. Cette transcription germinale assure l'accessibilité de la chromatine des régions S<sub>H</sub> à la machinerie de la CSR, incluant AID. Alors que l'engagement de CD40 par CD40L est essentiel pour initier la CSR, l'environnement cytokinique est impliqué dans l'orientation de la CSR vers un isotype donné, en activant différents groupes de facteurs de transcription qui se lient spécifiquement à un promoteur I<sub>H</sub> donné. Par exemple, IL-4 active STAT6 et NF-κB qui ciblent la transcription germinale de Iγ1-Sγ1-Cγ1 et Iε-Sε-Cε induisant la CSR vers IgG1 et IgE, respectivement. TGF-β active les facteurs de transcription Smad et Runx qui ciblent la transcription germinale de Iγ2b-Sγ2b-Cγ2b et Iα-Sα-Cα induisant la CSR vers IgG2b et IgA, respectivement. Finalement, IFN-γ cible la transcription germinale de Iγ2a-Sγ2a-Cγ2a induisant la CSR vers IgG2a (271). La CSR confère de nouvelles fonctions effectrices plus efficaces aux LB et représente un mécanisme biologique indispensable dans la lutte anti-bactérienne (voir section 2.3.2.1.). L'orientation finale des LB ayant subi la réaction du centre germinatif vers la voie plasmocytaire ou bien mémoire serait régulée par la force d'interaction entre l'Ag et le BCR, l'environnement cytokinique ainsi que par des facteurs de transcription (273).

Lors de la réaction extrafolliculaire, les blastes des foyers primaires d'expansion clonale se différencient tout d'abord en plasmoblastes. Ces cellules perdent l'expression de CCR7 et CXCR5 et augmentent leur sensibilité à CXCL12, ce qui provoque leur migration vers une zone de jonction entre la pulpe blanche et la pulpe rouge de la rate appelée en anglais « bridging channels ». Dans ces foyers extrafolliculaires où les LT sont absents, les DC jouent un rôle indispensable dans la survie des plasmoblastes et leur différenciation terminale en plasmocytes de faible

affinité et à courte durée de vie (269). Une faible proportion devient toutefois des plasmocytes à longue durée de vie logeant dans la pulpe rouge. Les LB participant à la réaction extrafolliculaire sont également capables de subir la CSR notamment grâce aux signaux reçus par les LT avant leur migration vers les foyers extrafolliculaires. La diversité isotypique est toutefois plus restreinte, majoritairement vers l'IgG3 (269).



**Figure 7. Représentation schématique des réactions folliculaires et extra-folliculaires de la réponse humorale se déroulant au niveau de la rate.**

LB : lymphocyte B; LT : lymphocyte T; MZ : zone marginale; PALS : manchon lymphoïde périartériel; GC : centre germinatif; FH : follicular helper; Ag : antigène. *D'après (263).*

### 2.2.1.3.2. La réponse humorale TD mémoire

Dans un contexte infectieux, la mémoire immunologique se définit comme étant la capacité du système immunitaire à répondre plus rapidement et plus efficacement face à une nouvelle exposition au même pathogène, conférant ainsi une protection à l'hôte face à une ré-infection. Ce concept est à la base du développement vaccinal. La réponse humorale mémoire est médiée par deux composantes, la composante lymphocytaire et la composante plasmocytaire (274).

La composante lymphocytaire est assurée par les LB mémoires, qui n'ont pas de fonction effectrice en eux-mêmes. Ils requièrent une restimulation par l'Ag menant à leur différenciation en plasmocytes, pour pouvoir contribuer à la réponse mémoire. De façon générale, grâce à leur programme transcriptionnel orienté vers une entrée plus rapide dans le cycle cellulaire, les LB mémoires répondent plus rapidement que les LB naïfs face à une restimulation par l'Ag. De plus, leur localisation microanatomique stratégique, au niveau de la MZ et/ou en contact étroit avec les LT CD4<sup>+</sup> mémoires des follicules adjacents aux centres germinatifs, facilite aussi leur réactivation. La réponse mémoire est aussi de plus forte amplitude, du fait de l'augmentation de l'effectif des LB mémoires ; plus persistante, de par la plus grande longévité de ces cellules ; plus efficace, grâce à l'amélioration des fonctions effectrices médiée par la CSR ; et de meilleure affinité (274). La faible fréquence des LB mémoires ainsi que l'absence de marqueurs spécifiques rendent l'étude de ces cellules difficile. Le marquage au BrdU, permettant de détecter les cellules qui ont proliféré en réponse à l'Ag puis qui sont retournées à un état quiescent, ainsi que le marquage génétique irréversible des cellules ayant exprimées le gène *aicda* (permettant de repérer les cellules qui ont rencontré l'Ag) sont des techniques expérimentales qui ont permis de conclure que les LB mémoires représentent une population cellulaire très hétérogène en termes de phénotype, d'isotype et de maturation d'affinité (275). Les LB mémoires sont localisés majoritairement dans la rate, les LB IgM<sup>+</sup> mémoires étant dispersés dans les follicules et au niveau de la MZ, tandis que les LB IgG<sup>+</sup> se retrouvent préférentiellement dans des régions adjacentes aux centres germinatifs contractés (275). Alors qu'une signalisation intracellulaire fonctionnelle en aval du BCR semble jouer un rôle crucial dans la survie des LB mémoires, l'implication des TLR, des récepteurs pour les cytokines, des récepteurs de la famille du TNF ou encore de la présence de l'Ag dans le maintien de cette population restent des sujets de débat (275).

La composante plasmocytaire est assurée par les plasmocytes à longue durée de vie logés dans la moelle osseuse, appelés aussi « plasmocytes mémoires ». Contrairement aux plasmocytes à courte durée de vie dont la demi-vie est estimée à quelques jours, les plasmocytes mémoires, dont la demi-vie est estimée à 3-4 mois chez la souris, sécrètent de façon constante des Ac pendant de longues périodes après l'immunisation (274). L'origine de ces plasmocytes mémoires et/ou les facteurs induisant préférentiellement une différenciation en plasmocytes mémoires ou en plasmocytes à courte durée de vie restent encore mal connus. Comme expliqué ci-dessus, ces cellules seraient générées principalement suite à la réaction du centre germinatif, même si certaines populations de plasmocytes mémoires peuvent aussi provenir de réactions extrafolliculaires. La différenciation finale et/ou la survie des plasmocytes mémoires dépendent de plusieurs événements et facteurs extrinsèques (258, 263, 274). Tout d'abord, les cellules doivent se détacher des organes lymphoïdes secondaires et migrer vers la moelle osseuse. Ces phénomènes sont régulés par la diminution de l'expression de CXCR5 et CCR7 et l'augmentation de l'expression de CXCR4, récepteur de la chémokine CXCL12 produite par les cellules du microenvironnement de la moelle osseuse. Une fois dans la moelle osseuse, les cellules doivent subir un arrêt du cycle cellulaire afin de pouvoir s'y établir. Contrairement aux LB mémoires, une signalisation fonctionnelle du BCR et/ou la présence de l'Ag ne sont pas requises pour la survie des plasmocytes mémoires. En revanche, les signaux fournis par l'environnement médullaire, principalement les cellules stromales, mais aussi possiblement les monocytes/macrophages, les neutrophiles et les fibroblastes, sont indispensables au maintien des plasmocytes mémoires. Ces signaux consistent en des interactions entre les intégrines des plasmocytes et les molécules d'adhésion des cellules stromales, mais sont aussi délivrés par des facteurs solubles comme CXCL12 et BAFF/APRIL (« a proliferation-inducing ligand »). Finalement, il faut noter que les plasmocytes mémoires peuvent se loger dans d'autres niches que la moelle osseuse, incluant la pulpe rouge de la rate, l'intestin et les tissus de l'inflammation (258).

#### **2.2.1.4. La réponse humorale TI**

##### **2.2.1.4.1. Les sous-types de LB mis en jeu**

On soupçonne depuis longtemps les LB MZ d'être des acteurs essentiels des réponses humorales TI, du fait de la plus forte susceptibilité de l'hôte jeune (dont le compartiment des LB MZ est encore immature) et des individus splénectomisés aux

infections bactériennes encapsulées. L'immunisation avec divers Ag TI de souris déficientes dans le développement et/ou la fonctionnalité des LB MZ a clairement démontré l'implication de ces cellules dans ce type de réponse. Par exemple, la souris déficiente pour la PTK Pyk-2 (« pyruvate kinase 2 »), dont le compartiment lymphoïde est dépossédé en LB MZ, produit des titres d'IgM, IgG3 et IgG2a plus faibles face à l'immunisation avec du dextrane ou du NP-Ficoll (276). Aussi, la souris n'exprimant plus la protéine Lsc (« lymphoid blast crisis second cousin »), régulant la migration et l'adhésion des LB MZ, présente une altération significative de la réponse Ac anti-CPS suite à l'immunisation avec *S. pneumoniae* type 14 (277).

A côté du rôle établi des LB MZ dans les réponses Ac TI, plusieurs études ces dix dernières années ont apporté la preuve de l'implication directe des LB-1 dans ce type de réponse. Dans le modèle d'infection à *Borrelia hermsii*, qui se caractérise par des épisodes récurrents de forte bactériémie, le développement rapide d'une réponse IgM dirigée contre le pathogène, et qui se met en place indépendamment de la présence des LT, est essentielle pour contrôler l'infection. Tandis que les souris déficientes en LB FO (IL-7<sup>-/-</sup>) et en LB MZ (après splénectomie) conservent la capacité de lutter contre l'infection, les souris *xid*, déficientes spécifiquement en LB-1, présentent une sensibilité très marquée suggérant que ces cellules sont à l'origine de la production des IgM protecteurs (278). Une autre série d'expériences a permis d'identifier clairement l'implication distincte des LB-1a et des LB-1b, respectivement, dans les versants inné et adaptatif de la réponse humorale contre *S. pneumoniae* type 3 (279). Un de ces travaux a consisté à infecter des souris CD19<sup>-/-</sup>, caractérisées par l'absence de LB-1a, ou des souris sur-exprimant CD19 (hCD19Tg), caractérisées par l'absence de LB-1b, avec *S. pneumoniae* type 3. Les souris CD19<sup>-/-</sup>, qui présentent une déficience dans la production constitutive d'Ac naturels, ont une sensibilité accrue à l'infection par rapport aux souris hCD19Tg. En revanche, après immunisation avec la CPS purifiée de *S. pneumoniae* type 3 (PS3), les souris CD19<sup>-/-</sup> sont les seules à être capables de développer une réponse IgM et IgG3 anti-PS3, leur permettant de lutter efficacement contre un challenge bactérien. L'implication essentielle des LB-1b dans la réponse humorale anti-PS3 a été confirmée par ces mêmes auteurs dans des expériences de transfert où les souris rag<sup>-/-</sup> (qui ne possèdent ni LT ni LB matures) reconstituées avec des LB-1b naïfs montent une réponse Ac anti-PS3 après immunisation avec la CPS purifiée, contrairement aux souris reconstituées avec des LB-1a ou des LB MZ naïfs.



Il faut bien noter que l'implication des LB MZ et des LB-1 dans la réponse TI n'est pas aussi cloisonnée, et les deux types cellulaires collaborent pour une lutte efficace contre les bactéries encapsulées. Cette double contribution des LB-1 et LB MZ a été démontrée pour la première fois dans le cas de la réponse Ac dirigée contre les résidus phosphorylcholine (PhC) de l'acide téichoïque suite à l'immunisation avec *S. pneumoniae* (280). L'implication respective des LB-1 et des LB MZ dans cette réponse dépend des conditions d'administration de l'Ag. Une immunisation par voie intrapéritonéale mobilise préférentiellement les LB-1 péritonéaux, tandis que les LB MZ sont mis en jeu suite à l'administration de *S. pneumoniae* par voie intraveineuse. Une telle coopération des LB MZ et des LB-1b a également été décrite au cours des réponses Ac anti-dextrane chez la souris immunisée avec la bactérie *Enterobacter cloacae* (281).

#### **2.2.1.4.2. La réponse humorale TI primaire**

Depuis 2000, les travaux de quelques groupes de recherche ont permis de mieux comprendre les étapes du déroulement de la réponse primaire aux Ag TI. Celle-ci se fait préférentiellement au niveau des organes lymphoïdes secondaires, en particulier la rate, et met en jeu des réactions extrafolliculaires. Suite à l'administration du NP-FicolI chez la souris, on observe une prolifération généralisée des LB NP-spécifiques dans tous les compartiments spléniques dès 24 h post-immunisation, majoritairement dans la zone T, mais aussi dans la MZ et les follicules (282). Toutefois, la réponse n'évolue pas vers le développement de centres germinatifs, et l'expansion clonale des LB NP-spécifiques ainsi que leur différenciation finale en ASC se font exclusivement au niveau des foyers extrafolliculaires des « bridging channels ». La réponse aboutit enfin à la dispersion progressive des plasmocytes dans la pulpe rouge après une semaine et, contrairement à une réponse mémoire TD classique, aucune accumulation de LB NP-spécifique n'est observée dans la MZ. La nature des interactions cellulaires que les LB NP-spécifiques engagent au niveau de la zone T lors de la phase de prolifération précoce demeure méconnue. Ces interactions pourraient mettre en jeu certaines populations de DC et influencer la survie, la maturation, la CSR et/ou la migration des LB vers les foyers extrafolliculaires (282). Une séquence d'événements similaire est observée pour la réponse Ac spécifiquement dirigée contre le dextrane et la PhC après immunisation avec les bactéries *E. cloacae* (281) et *S. pneumoniae* (280), respectivement. Ces deux dernières études désignent les LB MZ comme étant les acteurs impliqués dans la génération précoce des ASC spécifiques. Lorsque les LB-1b sont recrutés dans la

réponse Ac primaire contre le NP-Ficol, on observe aussi une différenciation en ASC spécifiques au niveau des foyers extrafolliculaires de la rate, soulignant l'importance de ce site également pour les réponses de ce sous-type cellulaire (283).

L'immunisation par *E. cloacae* chez la souris transgénique dont le répertoire est enrichi en LB spécifiques pour le dextrane, a toutefois démontré que les caractéristiques de la réponse des LB-1b diffèrent de celles des LB MZ (281). Suite à l'immunisation, alors que les LB MZ naïfs dextrane-spécifiques sont rapidement recrutés dans le pool de plasmoblastes des foyers extrafolliculaires, l'effectif de cette population retourne à un niveau basal après 3 semaines. En revanche, on observe une expansion du nombre de LB-1b dextrane-spécifiques dans les cavités péritonéales au cours des trois premiers jours post-immunisation, puis la population se maintient à un nombre stable pendant toute la période d'observation. Des cellules avec un phénotype de LB-1b sont alors détectées également dans le sang et dans la rate où elles sont vraisemblablement à l'origine de foyers extrafolliculaires d'ASC persistants.

D'autres preuves expérimentales étaient le fait que les réponses TI n'impliquent pas les réactions folliculaires que l'on voit classiquement dans les réponses TD. Par exemple, bien que l'immunisation des souris avec du NP-Ficol conduit à l'apparition de centres germinatifs indépendamment de la présence de LT ou de la signalisation médiée par CD40 ou CD28, leur formation est abortive et ne génère ni plasmocyte ni LB mémoire (284). Les réponses Ac TI se caractérisent ainsi par l'absence de phénomène de maturation d'affinité et une compétition interclonale durant les premiers jours de la réponse permettrait de sélectionner les LB les plus affins pour la différenciation finale en plasmocytes (285).

#### **2.2.1.4.3. La réponse humorale TI mémoire**

Bien que cela ait été longtemps un sujet de controverse, plusieurs études durant la dernière décennie ont mis en évidence que les Ag TI étaient capables, eux aussi, de générer une réponse mémoire. Cette réponse comprend une composante lymphocytaire et plasmocytaire dont les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles diffèrent par rapport à la réponse mémoire TD (286).

Le modèle d'infection à *B. hermsii* chez la souris a permis d'établir que les LB-1b représentent la composante lymphocytaire majeure de la mémoire TI (287). En effet, les souris rag<sup>-/-</sup> naïves qui reçoivent un transfert de LB-1b sont les seules à

pouvoir survivre à l'infection, grâce à la présence d'IgM spécifiques. Le transfert de LB-1a, LB FO ou LB MZ ne confère pas d'immunité humorale protectrice. Il est à noter toutefois que l'absence d'une MZ fonctionnelle chez les souris rag<sup>-/-</sup> receveuses peut interférer avec la différenciation et/ou la survie des LB MZ transférés, et donc la contribution de ces cellules à la réponse mémoire TI ne peut pas être totalement exclue. Les LB mémoires générés au cours des réponses TI présentent des caractéristiques différentes de leurs homologues des réponses TD. Par exemple, les LB mémoires spécifiques du NP-Ficolin ne montrent pas de meilleure sensibilité ni de plus grande longévité par rapport aux LB naïfs. La mémoire lymphocytaire TI se caractériserait donc par une augmentation de la quantité plutôt que de la fonctionnalité des clones de LB Ag-spécifiques (288).

La composante plasmocytaire de la réponse humorale TI comprend les plasmocytes à longue durée de vie des foyers extrafolliculaires de la rate générés au cours de la réponse primaire à partir des LB-1b. Ces structures sont à l'origine du maintien de taux persistants d'IgM et d'IgG3 spécifiques chez la souris plusieurs mois après immunisation avec du NP-Ficolin (283). Au tout début de ce projet, une équipe de recherche a établi que l'immunisation des souris avec PS3 induit la génération d'un pool de plasmocytes à longue durée dans la moelle osseuse sécrétant d'IgM et d'IgG spécifiques, qui peut persister plusieurs mois indépendamment de la présence de LB naïfs et mémoires (289). Cette population est suffisante pour conférer une protection aux souris face à une infection par *S. pneumoniae*. Dans cette étude, les auteurs prouvent que les plasmocytes mémoires PS3-spécifiques proviennent du compartiment des LB-1b. Comme pour les plasmocytes mémoires TD, la migration et/ou la survie dans la moelle osseuse des plasmocytes mémoires TI dépendent des interactions CXCR4/CXCL12 (286). Toutefois, alors que la génération des plasmocytes à longue durée requiert classiquement la présence des LT, les signaux fournis par les agonistes des TLR et/ou par cytokines pourraient représenter des substituts pour le développement des plasmocytes mémoires TI (286).

➤ Comme évoqué au début de cette deuxième section de revue de littérature, bien que les Ag TI soient capables à eux seuls d'induire l'activation initiale et la prolifération des LB par l'agrégation du BCR dont ils sont spécifiques, un second signal est nécessaire pour déclencher la CSR et la différenciation finale en ASC. Dans les sections qui vont suivre, nous allons décrire les acteurs cellulaires et moléculaires qui co-participent à la réponse humorale TI. Il est à noter qu'en plus des types cellulaires évoqués dans la section 2.2.2., les cellules NKT (« natural killer T cells ») sont aussi susceptibles de contribuer aux réponses humorales TI (252, 290, 291). Ces cellules n'ayant pas fait l'objet de cette thèse, nous n'évoquerons donc pas les mécanismes de leur implication dans ce type de réponse.

## **2.2.2. Les cellules auxiliaires**

### **2.2.2.1. Les cellules dendritiques (DC)**

Les DC forment un groupe de cellules hétérogènes en termes de phénotype, de localisation microanatomique et de fonctions (292, 293).

#### **2.2.2.1.1. Les sous-types de DC**

Les DC peuvent être regroupées en quatre grandes catégories, à savoir les DC conventionnelles (cDC), les cellules de Langerhans, les pDC et les DC dérivées de monocytes (292, 293). Les cDC sont constituées de 2 groupes, les DC dites « migratoires » et les DC résidentes des tissus lymphoïdes. Les DC migratoires sont générées dans les tissus périphériques non lymphoïdes, comme le derme, la lamina propria de l'intestin ou les muscles, et circulent vers les ganglions lymphatiques drainants via les vaisseaux lymphatiques, que ce soient en conditions homéostatiques ou inflammatoires, mais ne se retrouvent pas au niveau de la rate. Cette catégorie se subdivise globalement en cellules CD11b<sup>+</sup> et en cellules CD11b<sup>-</sup> CD103<sup>+</sup>. Les DC résidentes sont générées à partir de précurseurs présents dans les tissus lymphoïdes tels que la rate et les ganglions lymphatiques. Ces cellules restent localisées dans ces tissus et y occupent ainsi une place de choix dans la détection des pathogènes transportés via le sang. Les DC résidentes des tissus lymphoïdes se subdivisent en cellules CD8α<sup>+</sup>, en cellules CD4<sup>+</sup> CD8α<sup>-</sup> et en cellules CD4<sup>-</sup> CD8α<sup>-</sup>. Les cellules de

Langerhans sont localisées spécifiquement au niveau de la peau et sont aussi des cellules migratoires qui se déplacent vers les ganglions lymphatiques drainants, tandis que les pDC se retrouvent dans le sang et tous les organes lymphoïdes secondaires. Finalement, en réponse aux signaux inflammatoires, les monocytes du sang qui arrivent aux tissus sont capables de se différencier en DC. Ces cellules présentent de nombreuses caractéristiques des cDC, mais contrairement à ces dernières qui se trouvent dans les tissus de façon constitutive, les DC dérivées des monocytes n'y sont recrutées qu'en conditions inflammatoires et/ou infectieuses.

Les DC expriment classiquement CD45, CMH-II et CD11c, mais ces marqueurs ne sont pas suffisants pour caractériser correctement tous les sous-types de DC (292, 293). Le **Tableau IV** résume l'expression relative de quelques marqueurs phénotypiques des différents sous-types de DC en conditions homéostatiques, dont le profil peut varier en conditions inflammatoires.

Les DC expriment différents types de PRR dont le répertoire varie entre les sous-types (37, 292-294). Globalement, les cDC de la rate et les pDC ont un large répertoire de TLR incluant les TLR 1 à 9. Toutefois, les cDC CD8 $\alpha^+$  ne portent pas les TLR 5 et 7. Aussi, les cDC CD8 $\alpha^+$  des tissus lymphoïdes et les cDC CD103 $^+$  des tissus non lymphoïdes sont les cDC les plus aptes à exprimer TLR3. Les pDC sont particulièrement efficaces pour détecter les acides nucléiques microbiens et du soi via les TLR 7 et 9, mais ne possèdent pas TLR3. Finalement, les DC dérivées des monocytes répondent spécialement bien au LPS. Les DC expriment aussi de façon différentielle les CLR, incluant la Langerin, DNGR1 (« dendritic cell natural killer lectin group receptor 1 »), CD205 et DC-SIGN, ainsi que les Siglecs. Plus précisément, les cDC de la rate possèdent les Siglecs E et G, et les pDC exposent Siglec-H (37).

**Tableau IV. Marqueurs phénotypiques et principales fonctions des différents sous-types de DC naïves chez la souris.**

| Marqueurs                    | cDC résidentes des tissus lymphoïdes              |                    | cDC migratoires                           |                    | pDC  | LC   |
|------------------------------|---|--------------------|---|--------------------|--|------|
|                              | CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>                         | CD11b <sup>+</sup> | CD103 <sup>+</sup>                        | CD11b <sup>+</sup> |  |      |
| <b>CD45</b>                  | +   | +                  | +   | +                  | +  | +    |
| <b>CD11c</b>                 | +++   | +++                | ++  | ++                 | +  | ++   |
| <b>CMH-II</b>                | ++  | ++                 | ++  | ++                 | +  | ++   |
| <b>CD8</b>                   | +   | -                  | -   | -                  | +/-  | -    |
| <b>CD4</b>                   | -   | +/-                | -   | -                  | +  | n.d. |
| <b>CD11b</b>                 | -   | +                  | -   | +                  | -  | +    |
| <b>CD103</b>                 | +/-   | -                  | ++  | +/-                | -  | -    |
| <b>Langerin</b>              | +/-   | -                  | +   | -                  | -  | ++   |
| <b>DNGR1</b>                 | ++  | -                  | ++  | -                  | +  | -    |
| <b>CD205</b>                 | ++  | +                  | ++  | n.d.               | -  | ++   |
| <b>DC-SIGN</b>               | -   | +                  | -   | +/-                | ++   | -    |
| <b>Principales fonctions</b> | présentation d'Ag aux LT CD8 <sup>+</sup>         |                    | présentation d'Ag aux LT CD8 <sup>+</sup> |                    | sécrétion des IFN de type I (infection virale) |      |
|                              | présentation croisée d'Ag aux LT CD4 <sup>+</sup> |                    | présentation croisée                      |                    | pas de fonctions dominantes                    |      |
|                              | sécrétion IL-12p70, IFN- $\gamma$                 |                    |   |                    |  |      |

cDC : cellule dendritique conventionnelle; pDC : cellule dendritique plasmacytoïde; LC : cellule de Langerhans; LT : lymphocyte T; Ag : antigène; n.d. : non déterminé.

+/- : expression par certaines sous-populations de DC. *D'après (292, 293).*

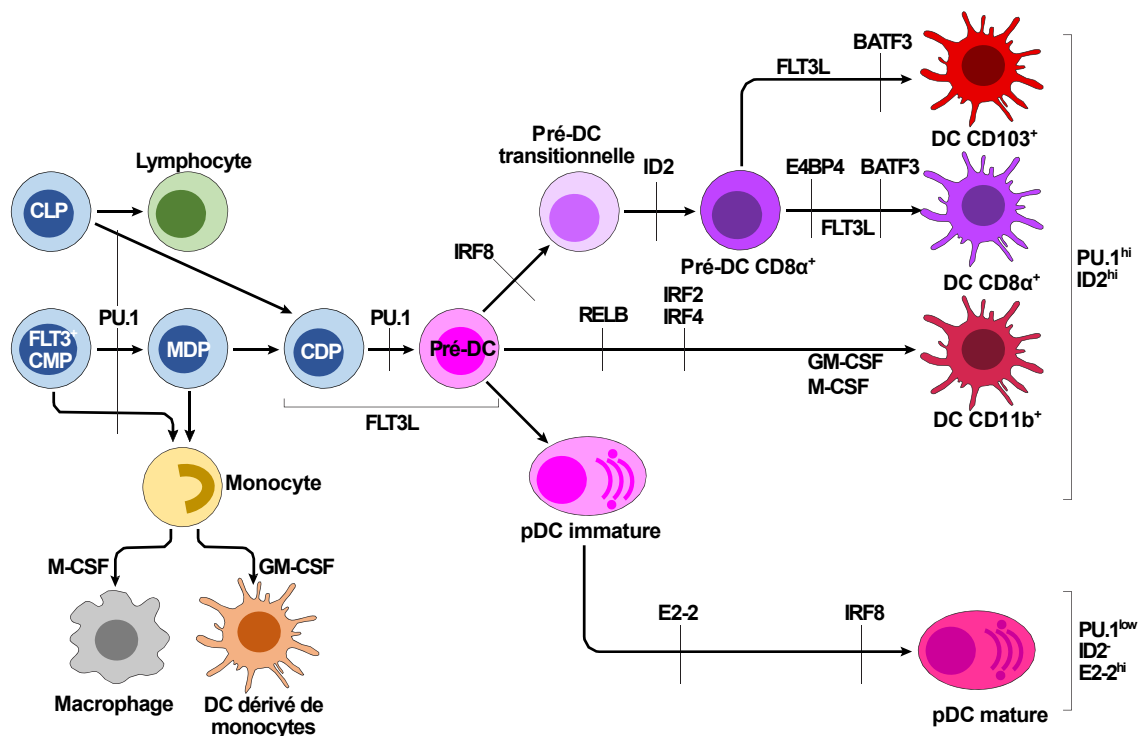
### 2.2.2.1.2. L'ontogénèse des DC

Contrairement aux autres sous-types de DC, les cellules de Langerhans dérivent d'une population locale de précurseurs myélomonocytiques Ly6c<sup>+</sup> de la peau et nous ne développerons pas les mécanismes du développement de ces cellules ici (293).

A l'exception des cellules de Langerhans, les DC dérivent des HSC de la moelle osseuse (292, 293). Une portion des HSC se différencie en progéniteurs myéloïdes communs (CMP) exprimant FLT3 (« fms-related tyrosine kinase 3 ») qui se différencie en progéniteurs des monocytes et des DC (MDP), un précurseur direct

des progéniteurs communs des DC (CDP). CDP se différencie d'une part directement en pDC qui représenterait l'étape finale de différenciation de ce sous-type de DC, et d'autre part en précurseurs des cDC (pré-DC), qui quittent la moelle osseuse pour se retrouver dans le sang. Pré-DC migrent ensuite vers les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes où ils poursuivent leur maturation en cDC. Finalement, les DC dérivés des monocytes proviendraient de monocytes, générés eux-mêmes à partir du CMP et/ou MDP, plutôt que de pré-DC, mais cela n'a pas encore été bien déterminé *in vivo*. Il est à noter qu'une proportion des DC pourrait aussi provenir de progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) de la moelle osseuse ainsi que de progéniteurs précoces des LT du thymus.

Plusieurs cytokines et facteurs de transcription clés contrôlent le développement des différents types de DC, mais il faut noter qu'il existe une certaine plasticité dans leur ontogénèse (voir **Figure 8**) (292, 293).



**Figure 8. Modèle des facteurs impliqués dans l'ontogénèse des DC.**

CLP : common lymphoid progenitor; CMP : common myeloid progenitor; MDP : macrophage and DC progenitor; CDP : common DC progenitor; FLT3(L) : fms-related tyrosine kinase 3 (ligand); (G)M-CSF : (granulocyte)-macrophage colony-stimulating factor; IRF : interferon-regulatory factor; ID2 : inhibitor of DNA binding 2; E4BP4 : E4 promoter-binding protein 4; BATF3 : basic leucine zipper transcription factor ATF-like 3; RELB : v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B; (p)DC : cellule dendritique (plasmacytoïde). D'après (293).

### 2.2.2.1.3. Les fonctions majeures des DC

Les DC jouent un rôle clé de sentinelle de l'organisme. Elles échantillonnent l'environnement dans lequel elles sont localisées pour aider à classer correctement les Ag dans la catégorie du « soi » ou du « non-soi » afin d'instruire le système immunitaire à y répondre adéquatement. Leurs fonctions peuvent se résumer globalement à la détection et la capture de l'Ag, son transport vers les organes lymphoïdes secondaires (dans le cas des DC migratoires) et sa présentation aux cellules de l'immunité adaptative, ce qui définit les DC comme étant les APC les plus puissantes de l'hôte (295-297).

Si on prend l'exemple d'une infection microbienne au niveau des tissus périphériques, suite à la reconnaissance des PAMP du pathogène par les PRR et à l'internalisation de l'étranger, la DC « immature » s'active et migre du tissu infecté vers les organes lymphoïdes secondaires. Au cours de sa migration, la cellule subit un processus de maturation caractérisé par une augmentation de l'expression de CCR7, des molécules du CMH, des molécules de co-stimulation CD40, CD80 et CD86 ainsi que par une sécrétion accrue de cytokines. Les Ag étrangers à l'intérieur de la cellule sont traités et apprêtés au niveau des molécules du CMH-I ou CMH-II, selon leur origine, afin d'être présentés aux LT des organes lymphoïdes secondaires (295-297). Brièvement, dans le cas d'Ag endogènes synthétisés à l'intérieur de la cellule, ceux-ci sont dégradés en peptides par les protéasomes dans le cytosol, puis transportés vers le réticulum endoplasmique grâce aux protéines de transport TAP (« transporters associated with antigen processing ») où ils s'associent aux molécules du CMH-I avant d'être exportés à la membrane plasmique pour être présentés aux LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Dans le cas d'Ag exogènes (comme ceux provenant de bactéries extracellulaires), ceux-ci sont internalisés et dégradés en peptides dans les compartiments endocytaires acides puis ils s'associent aux molécules du CMH-II, transportées dans des vésicules depuis le complexe de Golgi. Le complexe CMH-II-peptide est enfin exporté à la surface cellulaire pour interagir avec les LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires.

Tous ces processus permettent à la DC devenue mature d'activer efficacement et spécifiquement les LT naïfs suite à l'instauration d'une synapse immunologique entre les deux cellules mettant en jeu les interactions CMH-peptide/TCR et les molécules de co-stimulation B7/CD28 et CD40/CD40L (295-297). La production de cytokines par les DC constitue un troisième signal indispensable pour la différenciation finale des LT et, dans le cas des LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires, pour la polarisation de la réponse vers un profil de type Th (« T helper ») 1 (en présence d'IL-12p70 et IFN- $\gamma$ ), Th2 (en



présence d'IL-4), Th17 (en présence de TGF- $\beta$  et d'IL-6 ou d'IL-21) ou T régulateur (Treg) (en présence de TGF- $\beta$  et d'IL-10). Les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques activés participent alors à la résolution de l'infection, notamment de par leur fonction lytique, tandis que les LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires activent d'autres types cellulaires participant à la réponse immunitaire, incluant les macrophages, les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et les LB (295-297).

Comme mentionné plus haut, les DC migratoires sont aussi capables de migrer au niveau des organes lymphoïdes secondaires en condition homéostatique, et bien que les cellules puissent aussi subir un processus de maturation, il ne s'accompagne pas d'une production de cytokines pro-inflammatoires. Dans ce contexte, les DC n'activent pas les fonctions effectrices cytotoxiques et auxiliaires des LT, mais participent plutôt au phénomène de tolérance périphérique (292, 298). Finalement, les cDC résidentes des tissus lymphoïdes peuvent être activées par contact avec l'Ag étranger transporté dans le sang ou bien drainé au niveau des ganglions lymphatiques via les vaisseaux lymphatiques. Les DC migratoires activées en périphérie peuvent également transférer l'Ag aux cDC résidentes à leur arrivée au niveau des ganglions lymphatiques (292, 293).

Les fonctions majeures des différents sous-types de DC sont présentées dans le **Tableau IV**.

#### **2.2.2.1.4. Le rôle des DC dans les réponses humorales TD**

Comme décrit plus haut, les DC participent aux réponses humorales TD via l'activation des LT. L'engagement du CD40 par CD40L à la surface du LB activé, en présence de cytokines produites par les LT, induit la CSR et la différenciation finale des LB en plasmocytes (299, 300). L'implication des DC dans la réponse humorale TD ne se limite toutefois pas à recruter les LT activateurs des LB, et elles agissent aussi directement sur les LB.

De par leur capacité à ségréger les Ag internalisés dans des compartiments vésiculaires intracellulaires non dégradatifs avant leur recyclage à la surface, les DC peuvent présenter directement les Ag sous leur forme native au BCR des LB (301). Divers sous-types de DC optimisent aussi la CSR ainsi que la différenciation finale des LB activés par le CD40L en plasmocytes via la sécrétion de cytokines telles que les IFN de type I et IL-6 produites par les pDC, ou encore IL-12p70, IL-15, IL-6, IL-10 et TGF- $\beta$ , produites par les cDC non plasmacytoïdes (299, 300). En présence d'IFN de

type I générés par les pDC, du CD40L ou encore de ligands des TLR, les DC produisent aussi deux cytokines appartenant, tout comme CD40L, à la famille du TNF, à savoir BAFF et APRIL. En plus de promouvoir la maturation, la prolifération et la survie des LB activés par les LT, l'interaction de ces deux cytokines avec leurs récepteurs spécifiques exprimés à la surface des LB induit la CSR et la différenciation finale en plasmocytes en collaboration avec les cytokines dérivées des LT, incluant IL-4, IL-10 et TGF- $\beta$  (299, 300). Au niveau du LB, les voies de signalisation du CD40 et des récepteurs de BAFF/APRIL synergisent pour assurer une CSR optimale (271). Ainsi, l'interaction de divers sous-types de DC avec à la fois les LT et les LB garantit le développement optimal des réponses humorales TD.

Bien que l'activation directe des LB par les DC puisse être observée lors des réponses aux Ag TD, ces mécanismes d'interaction prennent toute leur importance dans les réponses TI.

#### **2.2.2.1.5. Le rôle des DC dans les réponses humorales TI**

La nécessité de la présence de cellules auxiliaires dans les réponses TI est soupçonnée depuis longtemps. Dès la fin des années 1970, une étude pionnière a démontré que les macrophages sont indispensables à la différenciation des LB stimulés *in vitro* avec du TNP-Ficoll en ASC spécifiques (302). Une diminution de la fonctionnalité des macrophages de la rate chez la souris âgée est corrélée à son incapacité à développer une réponse humorale CPS-spécifique adéquate après immunisation avec le Pneumovax, une préparation vaccinale composée des CPS purifiées de 23 sérotypes de *S. pneumoniae* (303). Etant donné leur capacité à exprimer un large panel de PRR spécifiques pour les saccharides des pathogènes, tels que SIGN-R1 (46) et MR (48), il n'est pas étonnant que certaines populations de macrophages localisées stratégiquement dans la MZ de la rate contribuent, tout comme les LB MZ, aux réponses humorales TI. Ainsi, la souris déficiente pour l'expression de deux récepteurs éboueurs macrophagiques MARCO (« macrophage receptor with a collagenous structure ») et SR-A (« scavenger receptor A »), impliqués dans l'intégrité structurale de la MZ, présente une réponse IgM et IgG3 anti-CPS clairement diminuée après immunisation avec le Pneumovax (304). Les macrophages péritonéaux, qui expriment aussi SIGN-R1 (305), peuvent également remplir cette fonction de cellules accessoires vis-à-vis des LB-1 dans la réponse Ac anti-PhC (306).

A côté des macrophages, de plus en plus de preuves expérimentales désignent les DC comme étant une autre population cellulaire impliquée crucialement dans les réponses humorales TI. Dans le modèle d'infection expérimentale par *S. pneumoniae*, une population de DC immatures CD11c<sup>low</sup> joue un rôle essentiel dans l'internalisation et le transport des Ag bactériens du sang vers la rate où elles y interagissent avec les LB MZ PhC-spécifiques (306). De plus, au niveau des foyers extracellulaires des « bridging channels », les LB PhC-spécifiques semblent s'associer préférentiellement avec un type de DC caractérisé par une expression élevée de CD11c plutôt qu'avec d'autres cellules myéloïdes, incluant les granulocytes ou les macrophages (306). Après immunisation des souris avec du NP-Ficoll, une telle association est également observée entre les plasmoblastes NP-spécifiques et les DC CD11c<sup>high</sup> (307).

Tout comme les macrophages, les DC sont dotées d'un répertoire de PRR spécifiques pour les saccharides microbiens et elles peuvent internaliser les Ag TI solubles comme les CPS de *S. pneumoniae* (308). Les DC sont aussi capables d'internaliser les Ag TI sous forme de complexes immuns via le récepteur au fragment constant (Fc) des Ig FcγRIIB et de les présenter intacts au BCR des LB (301). En plus de capturer, transporter et présenter les Ag TI directement aux LB, les DC interviennent dans les réponses TI en favorisant la CSR via la sécrétion de cytokines. Par exemple, les pDC humaines stimulées avec des ligands des TLR induisent l'activation et la différenciation *in vitro* des LB naïfs en plasmocytes sécréteurs d'IgM via la production d'IFN de type I et d'IL-6, et cela de façon totalement indépendante de la présence des LT (309). Il est à noter que dans cette expérience, le BCR des LB est engagé artificiellement par des Ac anti-IgM, et seulement une réponse Ac non spécifique est évaluée. Finalement, comme expliqué plus haut, parmi des cytokines produites par les DC non plasmacytoïdes, BAFF et APRIL jouent un rôle particulièrement crucial dans les réponses TI, ce que nous allons développer dans la section 2.3.1.2.

## 2.2.2.2. Les lymphocytes T (LT)

### 2.2.2.2.1. Le rôle des LT dans les réponses humorales TI face aux Ag solubles

Depuis les années 1970, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les LT exercent un rôle modulateur sur la réponse Ac dirigée contre divers Ag TI synthétiques et naturels solubles (251). Par exemple, la déplétion des splénocytes murins en LT provoque une diminution significative de la capacité du TNP-Ficoll à induire la différenciation des LB naïfs en ASC spécifiques (310). L'ajout exogène de cytokines communément sécrétées par les LT, telles que l'IL-2, l'IL-5 ou l'IFN- $\gamma$ , aux LB naïfs purifiés ou aux splénocytes totaux déplétés en LT aide aussi à la différenciation en ASC spécifiques (251). Finalement, bien qu'une réponse humorale contre TNP-Ficoll puisse se mettre en place chez la souris *nude*, le transfert de LT naïfs est associé à une réponse IgG spécifique plus rapide et de plus forte magnitude (311).

Plusieurs études ont investigué l'implication des sous-types de LT ainsi que les mécanismes moléculaires mis en jeu par ces cellules au cours du développement de la réponse humorale dirigée contre la CPS purifiée (non ZPS) de différents sérotypes de *S. pneumoniae*, incluant PS3. Un rôle activateur des LT CD4<sup>+</sup> a été démontré chez les souris transgéniques *scid* (« severe combined immune deficiency ») qui, comme les souris *rag*<sup>-/-</sup>, se caractérisent par une absence de LT et LB matures. Ces souris reconstituées avec des LB en association avec des LT CD4<sup>+</sup> naïfs montent une réponse IgM spécifique après immunisation avec la CPS de *S. pneumoniae* qui est plus élevée que celle observée chez les souris reconstituées avec des LB seulement. En ce qui concerne les mécanismes moléculaires, les interactions CD40/CD40L interviennent de façon cruciale dans la modulation de la réponse humorale contre la CPS de *S. pneumoniae*. L'administration d'agonistes du CD40 en association avec la CPS induit une augmentation de la réponse humorale primaire spécifique qui se caractérise par une hausse des titres d'IgM et d'IgG3 ainsi qu'une CSR vers IgG1, IgG2a et IgG2b, sans toutefois permettre de générer une réponse mémoire anti-CPS (312). A l'inverse, l'injection d'un antagoniste du CD40L résulte en une inhibition du développement des réponses IgG et IgM anti-CPS (313). Enfin, d'autres études utilisant diverses approches expérimentales ont confirmé le rôle important de l'interaction CD40/CD40L (313, 314). L'action des LT CD4<sup>+</sup> médiée par CD40L sur la réponse IgM anti-CPS ne s'exercerait pas directement sur les LB, mais indirectement

en recrutant d'autres types cellulaires, possiblement les DC et/ou les macrophages, qui, une fois stimulés, pourraient alors à leur tour induire l'activation des LB (314).

A côté du caractère stimulateur des LT CD4<sup>+</sup> sur la réponse Ac anti-CPS, plusieurs travaux ont établi que certaines populations de LT pourraient aussi exercer un effet suppresseur (313, 315, 316). Une étude a mis en évidence que les LT CD8<sup>+</sup> ont un effet suppresseur sur la réponse IgM anti-CPS *S. pneumoniae*, qui serait médié par CD40L. Il est connu que rapidement après avoir été activés, les LT expriment à leur surface le récepteur CTLA-4 (« cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 ») qui entre en compétition avec la molécule CD28 pour se fixer aux molécules B7 de l'APC et provoquer la régulation négative de cette dernière. Il a été démontré que l'ajout d'un antagoniste du récepteur CTLA-4 induit une augmentation de la réponse IgG dirigée contre la CPS de *S. pneumoniae* chez la souris (317). L'intervention d'une population de LTreg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, connue pour exprimer fortement CTLA-4, dans la modulation de la réponse anti-CPS *S. pneumoniae* reste toutefois à être mieux définie (318).

Les mécanismes du recrutement des LT dans la réponse humorale par les Ag TI sont encore très mal définis. Les CPS de *S. pneumoniae* utilisées dans les études décrites ci-dessus ne sont pas des ZPS et ne peuvent donc pas, par définition, être présentées aux LT par les APC au niveau des molécules du CMH-II (319). L'option d'une présentation de la CPS par la protéine CD1, qui est requise pour la présentation des lipides et glycolipides par les APC aux LT, a récemment été écartée (320). Bien qu'une reconnaissance directe de l'Ag TI par les LT, sans devoir être complexé aux molécules du CMH-II, ait déjà été suggérée, un mécanisme alternatif consisterait en l'implication d'un intermédiaire cellulaire comme les LB. Ces derniers, une fois activés par l'Ag TI, pourraient alors recruter les LT de façon indépendante de l'interaction classique TCR/CMH-II-peptide, mais via l'interaction entre les Ig sécrétées par le LB et les récepteurs Fc des LT, via l'établissement d'un réseau idiotypique, via la mise en jeu des interactions CD28/B7 et/ou CD40/CD40L, ou encore via la sécrétion de cytokines par exemple (251, 252).

Il est à noter que contrairement à la réponse humorale anti-CPS *S. pneumoniae*, les mécanismes de la modulation des LT sur la réponse Ac dirigée contre d'autres Ag TI, incluant d'autres CPS, ont été très peu explorés et pourraient être différents. Ainsi, même si la réponse IgM dirigée contre la CPS purifiée de GBS III est diminuée chez la souris *nude*, CD $\epsilon$ <sup>-/-</sup>, CMH-II<sup>-/-</sup>, CD40L<sup>-/-</sup> et B7<sup>-/-</sup> (321), l'aide potentielle

des LT dans la réponse Ac anti-TNP-FicolI semble être indépendante des interactions CD40/CD40L (314).

#### **2.2.2.2. Le rôle des LT dans les réponses humorales TI face à la bactérie entière**

Le rôle des LT dans la réponse humorale contre la CPS exprimée dans le contexte de la bactérie entière était très peu évalué au début de ce projet. Une série d'expériences a porté sur l'implication de ces cellules dans la réponse Ac dirigée contre la CPS de *S. pneumoniae* type 14 après immunisation avec la bactérie tuée chez la souris. Ces études démontrent que, contrairement à la réponse IgM anti-CPS qui conserve les caractéristiques d'une réponse TI, le développement de la réponse IgG anti-CPS primaire requiert l'aide des LT CD4<sup>+</sup>, est TCR-spécifique et met en jeu les molécules de co-stimulation CD40L et CD28 (322, 323). Toutefois, cette réponse conserve des caractéristiques d'une réponse TI avec une cinétique d'apparition plus rapide corrélée à une dépendance temporelle plus courte de l'aide des LT CD4<sup>+</sup> et une absence de maturation d'affinité en comparaison avec la réponse IgG dirigée contre une protéine de *S. pneumoniae*. De plus, aucune réponse Ac anti-CPS mémoire n'est détectée, ce qui peut s'expliquer par l'absence d'engagement de la protéine ICOS (« inductible T-cell costimulator »), une molécule de co-stimulation exprimée par les LT activés qui est impliquée dans la formation des centres germinatifs (322, 323). Les raisons pour lesquelles la réponse humorale dirigée contre la CPS exprimée dans le contexte d'une bactérie intacte conserve certaines caractéristiques d'une réponse TI ne sont pas totalement comprises, et ce point sera développé dans la discussion. Au début de ce projet, on ne savait pas non plus si la dualité de la nature TD/TI de la réponse humorale anti-CPS observée face à l'immunisation par *S. pneumoniae* était spécifique à cette bactérie ou bien si elle s'appliquait de façon plus générale aux bactéries encapsulées.

## **2.3. Les acteurs moléculaires de la réponse humorale anti-CPS**

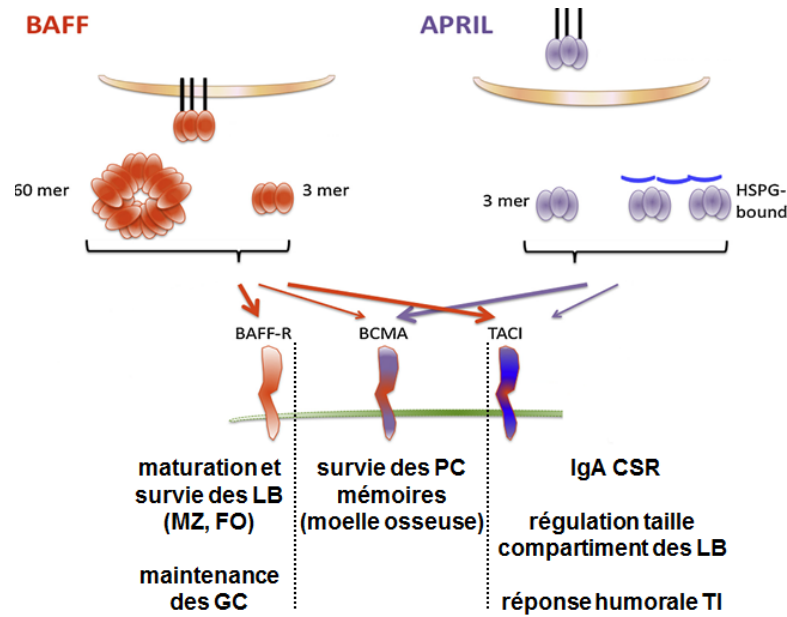
### **2.3.1. Le système BAFF/APRIL**

#### **2.3.1.1. Les membres du système BAFF/APRIL**

BAFF et APRIL sont deux protéines transmembranaires appartenant à la superfamille du TNF (324, 325). Elles sont produites principalement par les cellules myéloïdes telles que les monocytes, macrophages, DC et neutrophiles, mais aussi par les LT, les LB et les cellules stromales. Leur expression est augmentée en présence des IFN de type I, IFN- $\gamma$ , IL-10 et par divers PAMP via l'activation des TLR tels que TLR4 et TLR9. BAFF existe sous deux formes biologiquement actives, une forme membranaire en homotrimères et, après clivage protéolytique, sous une forme soluble en homotrimères qui peuvent s'associer pour former une structure en 60-mères. Contrairement à BAFF, APRIL se trouve principalement sous forme soluble en homotrimères mais peut aussi former des multimères en se fixant à la portion polysaccharidique des HSPG (« heparan sulfate proteoglycans »).

BAFF et APRIL sont les ligands des récepteurs BCMA (« B cell maturation antigen ») et TACI (« transmembrane activator and calcium modulator »), et BAFF se lie aussi à BAFF-R. Chez la souris, BAFF-R et TACI sont globalement exprimés par tous les LB matures, de hauts niveaux d'expression de TACI étant détectés particulièrement chez les LB MZ et les LB-1, tandis que l'expression de BCMA est restreinte aux ASC. BAFF-R et TACI peuvent aussi se retrouver chez d'autres types cellulaires, incluant les DC et les LT. L'ensemble des molécules BAFF/APRIL et de leurs récepteurs BAFF-R, TACI et BCMA peut être regroupé sous le terme de « système BAFF/APRIL ».

Le système BAFF/APRIL exerce divers rôles immunomodulateurs et en particulier dans l'activation, la prolifération, la survie et la différenciation des LB. Les fonctions majeures du système BAFF/APRIL sont résumées dans la **Figure 9**.



**Figure 9. Le système BAFF/APRIL.**

BAFF : B cell-activating factor of the TNF family; APRIL : a proliferation-inducing ligand; BAFF-R : BAFF receptor; BCMA : B cell maturation antigen; TACI : transmembrane activator and calcium modulator; HSPG : heparan sulfate proteoglycans; MZ : zone marginale; FO : folliculaire; GC : centre germinatif; PC : plasmocyte; CSR : commutation de classe; LB : lymphocyte B; TI : thymo-indépendant. *D'après (324, 326).*

### 2.3.1.2. Le rôle du système BAFF/APRIL dans les réponses humorales TI

Comme expliqué ci-dessus, les cytokines BAFF et APRIL interviennent dans les réponses humorales TD en optimisant certaines fonctions des LB, notamment la CSR, en collaboration avec CD40L et les cytokines sécrétées par les LT et les DC (271, 299, 300). En absence de LT, le système BAFF/APRIL prend toute son importance en jouant un rôle équivalent aux interactions CD40/CD40L des réponses TD. Les voies de signalisation en aval du CD40 et des récepteurs de BAFF/APRIL partagent d'ailleurs de nombreuses similarités, en recrutant par exemple les molécules TRAF pour activer la voie du NF- $\kappa$ B (267). Les premières études ayant mis en évidence le rôle du système BAFF/APRIL dans les réponses TI datent du début des années 2000. Chez la souris BAFF<sup>-/-</sup>, on observe une diminution des titres d'Ac après immunisation avec un Ag TD ou bien avec du NP-Ficoll (327). En concordance avec ces résultats, la co-administration de BAFF soluble avec le Pneumovax permet d'augmenter les réponses IgM et IgA anti-CPS chez la souris (328). Aussi, les souris



TACI<sup>-/-</sup> développent des réponses IgM anti-NP-Ficoll et anti-Pneumovax plus faibles (329), et la réponse Ac anti-NP-Ficoll est augmentée chez les souris surexprimant APRIL (330). L'incapacité des souris TACI<sup>-/-</sup> à développer une réponse Ac anti-CPS adéquate suite à l'immunisation avec le Pneumovax est responsable de leur plus forte susceptibilité face à un challenge par *S. pneumoniae* (331). Finalement, l'expression drastiquement plus faible de TACI chez les souris *xid* (332) ou encore chez les souris *xid* (333) est corrélée à une déficience dans la réponse Ac anti-NP-Ficoll. Le fait que les LB MZ et les LB-1, préférentiellement impliqués dans les réponses TI, présentent des niveaux d'expression de TACI particulièrement élevés étaye le rôle du système BAFF/APRIL dans les réponses TI (325). En particulier, quelques études réalisées ces deux dernières années pointent du doigt l'importance d'un système BAFF/APRIL fonctionnel au niveau des LB-1b dans les réponses Ac antibactériennes TI (331, 334).

Quelques travaux ont favorisé une meilleure compréhension des mécanismes du système BAFF/APRIL dans la réponse humorale TI. Dans un contexte non spécifique, l'ajout exogène de BAFF ou APRIL déclenche la CSR (notamment vers IgG) et la différenciation finale en ASC des LB naïfs cultivés seuls *in vitro*, et ces événements sont dépendants de TACI et BAFF-R (335-337). Il est à noter que dans ces expériences, BAFF et APRIL sont capables à eux seuls d'induire la différenciation finale des LB spléniques murins en ASC, alors que la présence de cytokines additionnelles et/ou l'agrégation artificielle du BCR sont requises dans le cas des LB sanguins humains. Grâce à l'utilisation de souris TACI<sup>-/-</sup> dont le répertoire des LB est artificiellement enrichi en clones spécifiques pour le NP-Ficoll, un groupe de recherche a établi que TACI n'intervient pas dans les premières étapes de l'activation ou de la prolifération des LB, mais plutôt dans l'engagement des plasmoblastes proliférant vers la voie plasmocytaire (338). En adéquation avec cette étude, la population de DC CD11c<sup>high</sup> qui est associée aux plasmoblastes PhC-spécifiques des foyers extrafolliculaires de la rate après immunisation avec *S. pneumoniae* fournirait des signaux de survie et de différenciation en plasmocytes de façon TACI-dépendante (269, 306, 339).

### **2.3.2. Les TLR et leurs ligands**

La participation des TLR dans les tous premiers moments de la réponse immunitaire peut se résumer au recrutement des leucocytes sur le site d'infection et au déclenchement de la réaction inflammatoire (294). En effet, de par leur capacité à moduler l'expression des molécules d'adhésion membranaires et la diffusion de

facteurs chemoattractants par les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les leucocytes eux-mêmes, les TLR sont impliqués dans les différentes étapes du processus d'extravasation des leucocytes vers le site d'infection. L'engagement des TLR conduit à l'activation des fonctions microbicides des cellules de l'immunité innée constituant l'infiltrat inflammatoire, ce qui assure une première ligne de défense rapide contre l'infection. Les réponses cellulaires activées par les TLR consistent aussi en la sécrétion de multiples cytokines qui entretiennent la réaction inflammatoire et qui initient la réponse immunitaire adaptative. Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous concentrer plus particulièrement sur la participation des TLR dans le développement de la réponse humorale.

### **2.3.2.1. Le rôle général des TLR et de leurs ligands dans les réponses humorales**

De par leur implication dans l'activation et la maturation des APC, les TLR jouent un rôle critique dans l'initiation et la polarisation des réponses adaptatives, et notamment des réponses humorales (295, 298, 340). La signalisation en aval de la majorité des TLR est traditionnellement considérée comme conduisant à une forte production d'IL-12p70 par les DC, orientant le développement des réponses immunitaires vers un profil de type Th1 (295, 298, 340). En adéquation avec ce dogme, les souris MyD88<sup>-/-</sup> présentent une déficience sévère dans la génération de réponses Th1 et ont plutôt tendance à monter des réponses de type Th2. Toutefois, suite à la stimulation par certains ligands du TLR2, comme l'Ag V de *Yersinia pestis* ou la phosphatidylsérine, les DC sont capables d'orienter les réponses immunes vers un profil de type Th2 (298). L'engagement du TLR2 n'est pas non plus restreint à l'induction de réponses Th2 et par exemple l'activation des DC par les lipoprotéines de *S. aureus* médiée par TLR2 est associée à des réponses Th1 (341). De nombreux autres paramètres entrent en compte dans la polarisation des réponses adaptatives induite par les TLR, incluant la dose du ligand ainsi que le type d'APC mis en jeu (298, 340). Le profil cytokinique ainsi généré oriente les LB à produire certaines sous-classes d'Ig, ce qui détermine le type de protection. Par exemple, chez la souris, IgG2b, IgG2c et IgG3 produites préférentiellement au cours des réponses Th1, sont particulièrement efficaces pour promouvoir la lyse bactérienne en déclenchant l'activation de la cascade du complément à la surface du pathogène et/ou en favorisant l'opsonophagocytose du microbe. En revanche, IgG1, générée surtout lors des réponses Th2, intervient plutôt dans la neutralisation des protéines du pathogène et active peu le complément ou l'inflammation (342, 343).

La reconnaissance des ligands des TLR par le LB lui-même entraîne sa prolifération, l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation ainsi que la sécrétion de diverses cytokines qui interviennent, tout comme celles produites par les DC, dans la polarisation de la réponse humorale. L'engagement des TLR est impliqué aussi dans les phénomènes de migration contrôlée des LB, d'inhibition de l'apoptose, de différenciation terminale en ASC et dans la CSR (260, 344). Ces effets sont dépendants à la fois du type de TLR et du sous-type de LB mis en jeu. Finalement, l'engagement des TLR par d'autres leucocytes, incluant les LT et les granulocytes, et par d'autres cellules non hématopoïétiques, comme les cellules épithéliales, influence aussi le déroulement de la réponse humorale (300, 345).

Le rôle des TLR dans les réponses humorales TD est bien établi (271, 344). L'engagement des TLR par les APC induit leur maturation, leur conférant ensuite l'habileté de recruter les LT, et l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation par les LB médiée par les TLR assure à ces dernières de recevoir l'aide adéquate des LT. Aussi, les ligands des TLR, comme par exemple le LPS, favorisent la migration et l'accumulation des LB au niveau de la zone sombre des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires (346). Les TLR contribuent alors potentiellement au déroulement des réactions du centre germinatif résultant en la différenciation plasmocytaire, aux phénomènes d'hypermutations somatiques et de CSR, ainsi qu'à la génération des LB mémoires. Bien que les ligands des TLR optimisent incontestablement les réponses humorales TD, leur rôle n'y serait toutefois indispensable que lorsque la stimulation du BCR et/ou du CD40 est sous-optimale (347, 348).

### **2.3.2.2. Le rôle des TLR et de leurs ligands dans les réponses humorales TI**

Un premier indice du rôle des TLR et de leurs ligands dans les réponses humorales TI est la plus grande capacité des LB MZ et des LB-1, comparativement aux LB FO, à subir la CSR et à se différencier *in vitro* en ASC après stimulation par différents types de ligands des TLR. Cette aptitude est liée à leur programme génétique pré-orienté vers une différenciation rapide vers la voie plasmocytaire (259, 344). Une coopération capitale dans les réponses TI est celle qui s'opère entre les TLR et le système BAFF/APRIL. Tout d'abord, comme décrit plus haut, l'engagement des TLR à la surface des APC entraîne la production des cytokines BAFF et APRIL qui sont

impliquées dans l'activation et la différenciation des LB en ASC (324). Aussi, au niveau des LB, l'engagement des TLR régule l'expression de BAFF-R et TACI (325, 332-334). Il a récemment été prouvé que la stimulation de TACI induit le recrutement de MyD88, déclenchant une cascade de signalisation aboutissant à l'activation de NF- $\kappa$ B et à la CSR (349). L'engagement conjoint de TACI et des TLR conduit à une production plus forte d'IgG par les LB *in vitro*, suggérant l'existence d'une synergie dans les voies de signalisation de ces deux types de récepteurs. Finalement, en plus de provoquer la différenciation en ASC et la sécrétion d'Ac, les TLR contribuent au recrutement des LB-1 et des LB MZ au niveau des sites effecteurs de la réponse immune (344).

Alors que ces études établissent un rôle théorique évident des TLR dans les réponses Ac humorales lorsque les LT sont absents, la majorité d'entre elles sont réalisées dans un contexte non spécifique. Le rôle des TLR dans la réponse Ac anti-CPS reste encore controversé. D'un point de vue génétique, la plus forte susceptibilité aux infections bactériennes encapsulées des patients présentant une déficience congénitale pour des molécules participant à la signalisation des TLR, telles que MyD88 et IRAK4, laisse présager que les TLR seraient impliqués dans les réponses Ac anti-CPS (349-351). Ceci est corroboré par le fait que la plupart de ces individus développent une faible réponse Ac anti-CPS après immunisation avec le Pneumovax. Toutefois, la réponse Ac contre le NP-Ficoll demeure globalement inchangée chez la souris déficiente pour toutes les voies de signalisation connues des TLR (347).

Les études *in vivo* évaluant l'effet adjuvant des ligands des TLR sur la réponse humorale anti-CPS chez la souris génèrent aussi des résultats contradictoires. D'un côté, une étude a démontré que la capacité du Pneumovax à induire une réponse Ac anti-CPS est liée à la présence de ligands de TLR contaminant la préparation vaccinale (352). En revanche, la co-administration du même ligand avec la CPS purifiée d'*H. influenzae* type b (353) ou le Pneumovax (354) n'amplifie pas la réponse Ac anti-CPS. Si nous prenons par contre le TNP-Ficoll comme Ag modèle, la co-administration de CpG permet d'augmenter les réponses IgM, IgG1 et IgG2a anti-TNP-Ficoll.

Le rôle des TLR dans les réponses Ac anti-CPS dans le contexte d'un challenge bactérien reste aussi encore très indéfini. Par exemple, suite à l'injection de *S. pneumoniae* chez la souris, alors qu'une première étude atteste du rôle indispensable de TLR2 dans le développement d'une réponse IgG anti-CPS (355), une autre étude indique que ce récepteur ne contribue pas à la défense anti-bactérienne de l'hôte infecté (356).

### 2.3.3. Le système du complément

Le contrôle de l'immunité humorale TD par le système du complément est bien documenté et met en jeu la molécule C3d (un des produits de dégradation de C3) et CR2 exprimé majoritairement par les LB, en particulier les LB MZ, et les DC folliculaires (54). L'interaction entre CR2 et l'Ag opsonisé par C3d régule la réponse humorale par trois mécanismes principaux. Tout d'abord, à la surface du LB, le co-engagement de CR2 et du BCR par l'Ag étranger lié à C3d induit une redistribution de ce complexe de récepteurs au niveau des radeaux lipidiques, conduisant à une amplification de la signalisation intracellulaire, ce qui permet de réduire le seuil d'activation nécessaire pour stimuler la prolifération des LB. Il a également été démontré que les DC folliculaires peuvent fixer l'Ag opsonisé par C3d au niveau de CR2 et le présenter au BCR des LB des centres germinatifs durant les processus de maturation d'affinité, de CSR ainsi que de différenciation en plasmocytes et en LB mémoires. Finalement, un dernier mécanisme consiste au transfert du complexe Ag-C3d des macrophages au CR2 des LB à la périphérie des follicules, ces derniers transportant alors l'Ag à l'intérieur du follicule pour le présenter aux DC folliculaires (54).

Le rôle du système de complément dans les réponses humorales TI est illustré par la diminution de la réponse Ac spécifique chez la souris déficiente pour l'expression de C3 ou CR2 après immunisation avec le TNP-FicolI (276) ou avec la CPS purifiée de GBS type III (357). Cette altération de la réponse Ac est associée à une réduction de l'interaction de ces Ag avec les LB MZ et/ou les DC folliculaires (276, 357). Aussi, l'opsonisation de la CPS de *S. pneumoniae* type 4 avec C3d s'accompagne d'une augmentation de la réponse Ac anti-CPS chez la souris qui peut être corrélée à la reconnaissance du complexe CPS-C3d par le CR2 à la surface des LB (358).

Dans le cadre de ce projet de thèse, le rôle du complément n'a pas été abordé et ne fera donc pas l'objet d'une description plus détaillée.

- Les expériences de ces 15 dernières années ont ainsi permis d'améliorer la compréhension du déroulement de la réponse humorale TI grâce à une meilleure identification des cellules et des molécules mises en jeu. Toutefois, ces travaux ont été réalisés en grande majorité dans des conditions artificielles, avec des Ag TI synthétiques ou encore en activant le LB via la stimulation du BCR avec des Ac anti-Ig, ne permettant pas d'évaluer les mécanismes de la réponse Ac spécifique. Les quelques études portant sur les mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse Ac anti-CPS se sont concentrées quasi-exclusivement sur un seul type de CPS, à savoir la CPS de *S. pneumoniae*.
- Du fait de leur incapacité à se complexer aux molécules du CMH-II, les Ag TI, comme les CPS, sont ainsi moins aptes à recruter les LT dans le déroulement de la réponse humorale anti-CPS, résultant en la génération d'une réponse Ac de plus faible amplitude, de plus faible affinité et de profil isotypique plus restreint. La conjugaison de la CPS à une protéine porteuse est une stratégie, utilisée entre autres dans les essais vaccinaux contre GBS, qui permet d'améliorer l'immunogénicité de la CPS en « convertissant » la réponse anti-CPS TI en une réponse TD (30). Il n'en demeure pas moins que la CPS, outre sa capacité à protéger la bactérie de l'opsonisation et de l'internalisation par les phagocytes de l'hôte, posséderait des propriétés immunomodulatrices intrinsèques susceptibles d'influencer le bon déroulement de la réponse Ac anti-CPS. Cet aspect de la glycoimmunologie était relativement mal connu au début de ce projet de thèse, et les connaissances que nous avons à ce sujet vont être maintenant relatées.

## **2.4. Les effets immunomodulateurs des CPS**

### **2.4.1. La diversité immunogénique des CPS**

Comme évoqué précédemment, la grande diversité biochimique des CPS est associée à une diversité immunogénique notable. L'influence des différences dans la composition et/ou la structure, même minimales, sur l'activation du système immunitaire de l'hôte est très bien illustrée par exemple pour les CPS de GBS types Ia et Ib. Ces deux molécules sont identiques à l'exception de la position d'un seul lien glycosidique

. Du fait de cette petite variation, l'administration de chacune de ces CPS chez l'hôte conduit au développement d'une réponse Ac distincte qui n'induit pas de protection croisée (359). Un autre exemple concerne les CPS de *N. meningitidis* groupes B et C qui sont des homopolymères du même acide sialique mais où les sucres sont liés entre eux par des liaisons ( $\alpha$ 2-8) et ( $\alpha$ 2-9), respectivement. Tandis que la CPS du groupe C est une molécule immunogénique, la CPS du groupe B est incapable de provoquer une bonne réponse Ac chez l'homme (30).

Malgré ces considérations, très peu d'études se sont penchées sur les mécanismes immunomodulateurs sous-jacents, ni même sur la comparaison, au sein d'une même expérience, de l'interaction de CPS biochimiquement différentes avec les cellules immunitaires. L'évaluation de la réponse inflammatoire suite à l'injection chez l'animal et/ou à la stimulation *in vitro* des cellules du système immunitaire inné avec la CPS purifiée de *S. pneumoniae* ou de *N. meningitidis* démontre que la CPS est une molécule relativement peu immunoactivatrice (308, 360, 361). Un petit nombre d'études laissent même suggérer que les CPS induiraient un certain état d'inhibition des leucocytes de l'hôte.

#### **2.4.2. Les effets immunosuppresseurs des CPS**

Chez l'homme, la pré-immunisation avec la CPS purifiée de *N. meningitidis* groupe C ou le Pneumovax résulte en une moins bonne réponse Ac anti-CPS face à une seconde immunisation avec la même préparation (362, 363). Chez l'animal, les souris prétraitées avec de fortes doses de la CPS de *C. neoformans* présentent des titres d'Ac plus faibles que les souris non prétraitées suite à une immunisation subséquente avec la même CPS, et ceci est corrélé à une diminution drastique de la génération d'ASC dans la rate (364). Aussi, la co-administration de CPS libres à des préparations vaccinales à base de CPS de *S. pneumoniae* types 4 et 6B conjuguées à une protéine porteuse exerce un effet inhibiteur dose-dépendant sur la capacité de ces vaccins à induire une réponse humorale chez la souris (365, 366).

Alors qu'un mécanisme rétro-inhibiteur médié par les Ac générés au cours de la réponse primaire peut empêcher la réactivation des LB mémoires, comme cela a été montré lors de la réponse au NP-Ficolin (286), la CPS exercerait un effet immunosuppresseur en interagissant directement sur les cellules du système immunitaire de l'hôte susceptibles d'être impliquées dans le développement des réponses humorales.

#### 2.4.2.1. Les mécanismes immunosuppresseurs médiés par les CPS

Un premier mécanisme qui a été suggéré est la capacité de la CPS à induire la mort cellulaire des leucocytes. Par exemple, l'incubation des macrophages avec la CPS de *C. neoformans* s'accompagne d'une augmentation de l'expression de Fas ligand par les cellules qui, à leur tour, provoquent l'apoptose des LT activés exprimant Fas (367). La CPS microbienne peut également inhiber l'activité inflammatoire et/ou la maturation des macrophages et des DC. L'interaction de la CPS de *C. neoformans* avec les monocytes/macrophages entraîne une diminution de l'expression des molécules du CMH-II ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'IL-10 (44, 368). Le sucre glucuronoxylomannane de la CPS de *C. neoformans* serait responsable de son pouvoir inhibiteur, incluant sa capacité à réduire la réponse inflammatoire médiée par le LPS (368). La suppression du pouvoir immunostimulateur du LPS/LOS par deux autres CPS bactériennes a aussi été rapportée. La CPS purifiée de *N. meningitidis* groupe C inhibe la capacité du LOS à induire l'activation de la voie des MAPK, l'expression des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CMH-II, ainsi que la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 par les macrophages et/ou les DC (361). Enfin, l'ajout de la CPS purifiée de *S. pneumoniae* sérotype 14 ou 19F aux DC cultivées en présence de LPS conduit à une augmentation de la sécrétion d'IL-10 (308).

Bien que de nombreuses stratégies développées par les pathogènes pour subvertir les défenses immunitaires de l'hôte aient été identifiées (369, 370), les mécanismes à l'origine des effets inhibiteurs médiés par la CPS sur les cellules impliquées dans le développement de la réponse humorale sont très largement méconnus. Néanmoins, quelques preuves expérimentales suggèrent que la CPS pourrait exploiter les voies de signalisation en aval des PRR afin de moduler les fonctions leucocytaires de l'hôte. Ainsi, certains effets immunosuppresseurs du glucuronoxylomannane (367) et de la CPS de *N. meningitidis* groupe C (361) pourraient être dus à leur interaction avec TLR4 et CD14, respectivement. Si on prend l'exemple des CLR, la liaison du lipoarabinomannane de la paroi de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* à DC-SIGN et à MR délivre un signal inhibiteur résultant en l'augmentation de la sécrétion d'IL-10 et en la réduction d'IL-12 par des DC stimulées avec le LPS (371, 372). On peut noter cependant que l'immunomodulation exercée par la CPS de *S. pneumoniae* sur les DC de l'hôte semble être indépendante de son interaction avec DC-SIGN (47). De plus, les souris déficientes pour l'expression de SIGN-R1 développent une réponse Ac dirigée contre la CPS de *S. pneumoniae* type 3 ou 14 similaire aux souris WT après immunisation avec le Pneumovax (373).



Une autre famille de récepteurs susceptibles d'être détournée de leur fonction première par les CPS microbiennes sont les Siglecs, et nous allons y revenir dans la section suivante.

Finalement, un dernier point à noter est que certains polysaccharides purifiés sont capables d'interférer avec la fonction de présentation d'Ag TD (protéiques) des APC et donc de moduler l'activation subséquente des cellules du système immunitaire adaptatif (374, 375). Les mécanismes d'inhibition demeurent mal connus mais seraient liés à la rétention et l'accumulation du polysaccharide à l'intérieur des vésicules des APC. Des études avec le Ficoll, le dextrane ou encore l'arabinomannane et l'arabinogalactane purifiés de *M. tuberculosis* démontrent que les polysaccharides pourraient interférer lors de l'interaction intracellulaire entre les peptides protéiques et les molécules du CMH-II (374-376). A cet égard, les lysosomes des macrophages péritonéaux contenant du dextrane seraient moins aptes à fusionner avec des endosomes contenant des molécules récemment endocytées (376). En utilisant un large éventail de polysaccharides, une étude a établi une association entre certains critères biochimiques de ces sucres et leur capacité à inhiber la présentation de l'Ag par les APC aux LT (376). La charge nette du polysaccharide semble être impliquée, la PS3 anionique étant plus inhibitrice que le Ficoll neutre. De plus, bien que la masse moléculaire ne soit pas un facteur déterminant, les dextranses à structure ramifiée sont plus inhibiteurs que les dextranses linéaires. Toutefois, aucun motif saccharidique précis, que ce soit d'un point de vue de la composition ou de la structure, n'a pu être directement corrélé au potentiel immunosuppresseur de ces sucres. Enfin, ces polysaccharides exercent leur pouvoir modulateur préférentiellement sur les macrophages par rapport aux DC et aux LB (376). L'expression différentielle de récepteurs à la surface de ces cellules et des différences concernant l'activité endocytique ainsi que la machinerie et les voies de dégradation intracellulaires pourraient expliquer cette sélectivité, mais ces hypothèses restent à être démontrées.

#### **2.4.2.2. L'acide sialique : un sucre potentiellement immunosuppresseur**

Comme évoqué précédemment, les bactéries ont développé la capacité d'incorporer des molécules d'acide sialique dans plusieurs de leurs structures, incluant la CPS. Ce mimétisme moléculaire représente une stratégie efficace pour subvertir les défenses immunitaires de l'hôte. Un premier mécanisme d'échappement des pathogènes conféré par l'acide sialique consiste à détourner les facteurs de régulation

de la voie alterne du complément. Chez les eucaryotes, la reconnaissance du facteur H sérique par l'acide sialique endogène est un mécanisme de protection constitutif permettant d'empêcher l'activation du complément à la surface des cellules. La capacité du LOS sialylé de *N. gonorrhoeae* à fixer le facteur H lui permet de résister *in vitro* à l'élimination par le complément (377). La faculté de l'acide sialique des CPS bactériennes à fixer le facteur H reste toutefois encore très controversée (26).

Au début de ce projet de thèse, quelques études ont proposé que certains pathogènes sont capables d'exploiter la fonction des Siglecs afin de moduler, voire même d'échapper au système immunitaire de l'hôte, via l'expression d'une forte densité de ligands sialylés susceptibles de fournir des signaux d'inhibition plus forts que ceux délivrés par les propres molécules sialylées de l'hôte. Par exemple, la reconnaissance de la séquence Neu5Ac( $\alpha$ 2-3)Gal des mucines de *T. cruzi* par Siglec-E des DC s'accompagnerait d'une diminution de la production d'IL-12 et de l'activation subséquente des LT et serait corrélée à la virulence du parasite dans les modèles d'infection chez la souris (378). L'importance de la spécificité de reconnaissance d'un Siglec pour le type de lien que forme l'acide sialique dans l'induction des réponses biologiques subséquentes a été illustrée quelque temps après par la polarisation différentielle de la réaction immunitaire par Neu5Ac exprimé au niveau du LOS de la bactérie *Campylobacter jejuni*, selon qu'il forme une liaison ( $\alpha$ 2-3) ou ( $\alpha$ 2-8). Alors que la forme Neu5Ac( $\alpha$ 2-3) du LOS, qui est reconnue préférentiellement par Siglec-1, déclenche une réponse de type Th2 par les leucocytes humains, la forme Neu5Ac( $\alpha$ 2-8), qui est reconnue préférentiellement par Siglec-7, entraîne une réponse de type Th1 (379). De façon intéressante, ces deux types de LOS sont associés à des formes différentes du syndrome de Guillain-Barré. Finalement, bien qu'une étude *in vitro* ait indiqué que l'engagement de CD22 à la surface des LB par un Ag synthétique sialylé inhibe leur activation (380), la modulation des fonctions biologiques des LB par un composant microbien sialylé demeure largement inexplorée.

Ces études suggèrent donc que l'expression de molécules d'acide sialique similaires aux cellules eucaryotes permettrait aux pathogènes de moduler activement la fonction des cellules du système immunitaire inné, et aussi potentiellement du système immunitaire adaptatif, de l'hôte qu'ils infectent. Toutefois, au début de ce projet, très peu d'études avaient évalué l'effet immunomodulateur de l'acide sialique capsulaire, et notamment dans le contexte du développement de la réponse adaptative, incluant la réponse humorale.

## **III – MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS**

## ARTICLE I

# **Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* capsular polysaccharides induce chemokine production by dendritic cells via Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent and -independent pathways**

Cynthia Calzas<sup>a</sup>, Guillaume Goyette-Desjardins<sup>a</sup>, Paul Lemire<sup>a</sup>, Fleur Gagnon<sup>b</sup>, Claude Lachance<sup>a</sup>, Marie-Rose Van Calsteren<sup>b</sup>, Mariela Segura<sup>b</sup>

Laboratory of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada<sup>a</sup>; Food Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada<sup>b</sup>

Publié dans: *Infect Immun.* **2013.** 81(9):3106-18.  
doi: 10.1128/IAI.00113-13.

### Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

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

## Abstract

*Streptococcus agalactiae* (also known as Group B *Streptococcus* [GBS]) and *Streptococcus suis* are encapsulated streptococci causing severe septicemia and meningitis. Bacterial capsular polysaccharides (CPSs) are poorly immunogenic, but anti-CPS antibodies are essential to the host defense against encapsulated bacteria. The mechanisms underlying anti-CPS antibody responses are not fully elucidated, but the biochemistry of CPSs, particularly the presence of sialic acid, may have an immunosuppressive effect. We investigated the ability of highly purified *S. suis* and GBS native (sialylated) CPSs to activate dendritic cells (DCs), which are crucial actors in the initiation of humoral immunity. The influence of CPS biochemistry was studied using CPSs extracted from different serotypes within these two streptococcal species, as well as desialylated CPSs. No interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-12p70, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) or IL-10 production was observed in *S. suis* or GBS CPS-stimulated DCs. Moreover, these CPSs exerted immunosuppressive effects on DC activation, as a diminution of gamma interferon (IFN- $\gamma$ )-induced B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) expression was observed in CPS-pretreated cells. However, *S. suis* and GBS CPSs induced significant production of CCL3, via partially Toll-like receptor 2 (TLR2)- and myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-dependent pathways, and CCL2, via TLR-independent mechanisms. No major influence of CPS biochemistry was observed on the capacity to induce chemokine production by DCs, indicating that DCs respond to these CPSs in a patterned way rather than a structure-dedicated manner.

## Introduction

*Streptococcus agalactiae* (also known as Group B *Streptococcus* [GBS]) is a major cause of life-threatening invasive bacterial infections in pregnant women and neonates, as well as in the elderly and immunocompromised individuals (1, 2). Clinical manifestations are mainly pneumonia, septicemia, and meningitis. Among 10 GBS serotypes identified, type III is one of the major serotypes associated with invasive neonatal infection and is the most common type in GBS meningitis (2). In addition, GBS type V is emerging as a leading cause of invasive disease in adults (3). *Streptococcus suis* is an important swine pathogen and an emerging zoonotic pathogen in humans that is able to induce septicemia with sudden death, meningitis, endocarditis, pneumonia, and arthritis (4, 5). Of the 35 serotypes, type 2 is the most virulent and frequently isolated from both swine and humans (6) and type 14 is also emerging as a zoonotic threat (7). For both pathogens, the capsular polysaccharide (CPS), which defines the serotype, is considered the major virulence factor (8, 9). The structures of type III and V GBS CPSs are formed by different arrangements of the monosaccharides glucose, galactose, and *N*-acetylglucosamine into unique repeating units that contain a side chain terminated by sialic acid (*N*-acetylneuraminic acid [Neu5Ac]). The structures of type 2 and 14 *S. suis* CPSs are composed of the monosaccharides glucose, galactose, *N*-acetylglucosamine, and rhamnose (for type 2 only) arranged into a unique repeating unit that also contains a side chain terminated by sialic acid. In fact, these streptococci are the sole Gram-positive bacteria possessing sialic acid in their capsules (8, 10, 11). However, despite similarities in the compositions of the CPSs of these two bacterial species, each CPS is composed of a unique arrangement of these sugars conferring a distinct antigenicity. Moreover, sialic acid forms an  $\alpha$ -2,6 linkage with the adjacent galactose in *S. suis*, in contrast to the  $\alpha$ -2,3 linkage in GBS. Interestingly, the interplay of CPS with components of the immune system, including antigen-presenting cells (APCs), seems to differ radically. Experiments using non-encapsulated mutants have shown that *S. suis* type 2 CPS has a strong anti-phagocytic effect, in contrast to GBS type III CPS, and severely interferes with the release of most of the cytokines produced by *S. suis*-infected APCs. In the case of GBS type III, cytokine production is only partially modified or unaltered by the presence of its CPS (12-15).

Sialic acid of bacterial polysaccharides has been suggested to be involved in immune evasion via several mechanisms. For example, sialic acid of GBS type III CPS interferes with the immune response by molecular mimicry (8) and inhibition of

complement activation (16). Some receptors expressed on the surfaces of leukocytes have a distinct preference for specific types of linkage of sialic acid to subterminal sugars. As these binding preferences are likely related to their biological functions, differences in sialic acid linkage in *S. suis* versus GBS might differentially modulate host immune responses (17). However, knowledge on the specific contributions of sialic acid to the interactions of these two pathogens with the immune system is restricted by the fact that deletion of genes involved in sialic acid synthesis results in considerable or complete loss of CPS expression at the bacterial surface (18, 19).

Dendritic cells (DCs), the most powerful APCs, express a wide variety of pattern-recognition receptors (PRRs) that enable them to detect the presence of several pathogens through the recognition of pathogen-associated molecular patterns. Among these PRRs, toll-like receptors (TLRs) are important for the initiation of the immune response as well as the shaping of adaptive immunity (20). The interactions between DCs and pathogens can strongly influence the magnitude and phenotype of the ensuing cellular and humoral adaptive immune responses, notably via the release of cytokines (21). Purified bacterial CPSs are classically reported to be T cell-independent (TI) antigens which are consequently weak stimulators of the host immune response (22, 23). However, several *in vitro* studies have demonstrated the ability of bacterial CPSs to interact with APCs, resulting in the production of cytokines and chemokines (24-28). The adaptor molecule myeloid differentiation factor 88 (MyD88), which is involved in intracellular events downstream of TLR signaling, and TLR2 have been suspected to be involved in the interactions of bacterial CPSs with DCs and/or macrophages (25, 27). Nevertheless, the potential role of pure carbohydrates as ligands for TLRs, and more globally for PRRs, remains largely uninvestigated.

Recent reports have shown that DCs play an important role in TI responses and, more precisely, in the development of the humoral response, via the release of B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF). BAFF is able to enhance B cell proliferation, immunoglobulin (Ig) class switching, and Ig secretion (29, 30). These critical signals are particularly interesting in the context of infection by encapsulated bacteria, where antibodies (Abs) against the CPS have been proven to be essential to the host defense (23). As such, we hypothesized that intra- and interspecies structural differences in CPS might differently modulate DC release of cytokines and chemokines. The goal of this study was thus to evaluate and compare the effect of highly purified CPS preparations from *S. suis* types 2 and 14 as well as GBS types III and V on DC activation and, more specifically, on the capacity to induce

cytokines essential for the development of an effective humoral immune response. The influence of sialic acid was analyzed using chemically desialylated CPS preparations.



## Materials and Methods

### *Native CPS purification*

The reference strains of *S. suis* serotype 2 S735 (ATCC 43765), isolated from a pig with meningitis (31), and of *S. suis* serotype 14 DAN13730, isolated from a human with meningitis (32), were grown in 150 ml of Todd-Hewitt broth (THB) (Oxoid, Thermo Fisher Scientific) at 37°C for 16 h, diluted to 6 liters in fresh THB, and grown to an optical density at 540 nm ( $OD_{540}$ ) of 0.8. The cells were pelleted by centrifugation at  $10,000 \times g$  for 40 min, suspended by repeated pipetting in 33 mM phosphate-buffered saline (PBS) pH 8.0, and chilled. The CPSs were then purified as previously described (10, 11).

GBS serotype III strain COH-1, isolated from an infant with bacteremia (33), and GBS serotype V strain CJB111 (ATCC BAA-23), isolated from a neonate with septicemia, were used in this study. GBS CPSs were prepared as previously reported (34) with some modifications. Briefly, bacteria were grown in 200 ml THB at 37°C for 16 h, diluted to 8 liters in fresh THB, and grown to an  $OD_{540}$  of 0.8. The cells were pelleted by centrifugation at  $10,000 \times g$  for 40 min, washed in PBS pH 7.3, and treated with 1 N NaOH at 37°C overnight. After neutralization and dialysis, proteins were digested by treatment with 1 mg/ml pronase (Sigma-Aldrich) at 37°C overnight, followed by dialysis. The CPSs were then subjected to re-*N*-acetylation with 0.8 M acetic anhydride (Sigma) in 5 N NaOH and finally purified by gel filtration on Sephacryl S-300 (GE Healthcare) using 50 mM  $NH_4HCO_3$  as the eluent.

### *CPS desialylation*

Highly purified native CPSs were desialylated by mild acid hydrolysis as described previously (10). Briefly, the CPS (8 mg) was heated in 1 ml of 70 mM HCl at 60°C for 250 min, neutralized with 2 M  $NH_4OH$ , dialyzed against deionized water for 48 h at 4°C with a Spectra/Por membrane (molecular size cutoff of 3,500 Da; Spectrum Laboratories), and freeze-dried.

### *CPS quality controls*

Each purified CPS was subjected to rigorous quality control tests as previously described (10). Nucleic acids were quantified using an ND 1000 spectrometer (Nanodrop). The absorbance was measured at 230 and 260 nm. Calculations were

done with the Nanodrop software. According to the manufacturer, results are reproducible between 2 and 100 ng/μl. Proteins were quantified by use of a modified Lowry protein assay kit from Pierce on 1-mg/ml CPS samples, using a standard curve prepared with diluted albumin standards from 1 to 1,000 μg/ml. The calculated limit of detection ( $P \leq 0.05$ ) was 0.7-1.3 μg/ml. Each CPS was analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) as described below. The monosaccharide composition of polysaccharides was confirmed by methanolysis followed by acetylation and analysis by gas chromatography (GC) either with flame ionization detection or coupled to mass spectrometry as previously described (10). The weight-average molecular weight ( $M_w$ ) of each CPS was determined by size-exclusion chromatography coupled with multiangle light scattering (SEC-MALS) as described below. The presence (native CPS) or absence (desialylated CPS) of sialic acid was verified by NMR and by an enzyme-linked lectin assay (ELLA) as described below.

#### *Nuclear magnetic resonance assay*

*S. suis* native CPSs were exchanged in phosphate buffer (p<sup>2</sup>H 8.0) in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99.9 atom% <sup>2</sup>H), freeze dried, and dissolved in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99.96 atom% <sup>2</sup>H) to a final phosphate concentration of 33 mM. The other CPSs were exchanged in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99.9 atom% <sup>2</sup>H), freeze dried, and dissolved in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99.96 atom% <sup>2</sup>H). NMR spectra were acquired on CPS samples at concentrations of circa 1%–2%. Conventional <sup>1</sup>H spectra were acquired at 14 T on Bruker Avance spectrometers equipped with either a 5 mm TCI CryoProbe at 50°C or a 5 mm PABBO BB inverse gradient probe at 75°C or at 11.75 T on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a 5 mm triple-resonance TBI probe at 60–80°C using standard Bruker pulse sequences.

#### *M<sub>w</sub> characterization of native and desialylated CPSs*

The  $M_w$  of CPSs were characterized by SEC-MALS. Chromatographic separation was performed with two 8-mm by-300 mm Shodex OHpak gel filtration columns connected in series (SB 806 and SB 804), preceded by an SB 807G guard column (Showa Denko). Elution was done with a Waters 510 pump (Waters) using a 0.1 M NaNO<sub>3</sub> mobile phase filtered through a 0.02 μm membrane (Whatman), at a flow rate of 0.5 ml/min. Samples were dissolved in the SEC eluent at a concentration of 0.7-1.0 mg/ml for the native CPS and 2.0-3.5 mg/ml for the desialylated CPS, and injected with a 100 or 200 μl sample loop. Molecular masses were determined with a Dawn EOS MALS detector (Wyatt). A differential refractometer model RI 410 (Waters) was

used as a concentration detector. A refractive index increment ( $dn/dc$ ) of 0.137 ml/g was calculated for 690 nm using data for xanthan at 436 and 546 nm (35), and the second virial coefficient ( $A_2$ ) was taken as zero. Calculations were performed with the ASTRA software version 6.0.0.108 (Wyatt).

### ELLA

In order to verify the presence or absence of sialic acid in the purified native and desialylated CPSs, an ELLA test was carried out based on a previously described technique (36), which was adapted to the CPSs. Briefly, 200 ng of sample (native or desialylated CPS) was added to wells of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate (Nunc-Immuno Polysorp). After overnight coating at 4°C, the wells were washed and blocked by the addition of Carbo-Free solution 1X (Vector Labs). After washings, the wells were incubated 1 h with biotinylated *Sambucus nigra* agglutinin (SNA-I) (Vector Labs), which specifically recognizes sialic acid as Neu5Ac $\alpha$ -2,6-Galp/GalpNAc (37), or biotinylated *Maackia amurensis* leucoagglutinin (MAL-I) (Vector Labs) recognizing sialic acid as Neu5Ac $\alpha$ -2,3-Gal $\beta$ -1,4-GlcNAc (38). Then, horseradish peroxidase (HRP)-labeled Avidin D (Vector Labs) and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine were added. In some experiments, HRP-conjugated *Limax flavus* agglutinin (LFA) (Vector Labs), which recognizes Neu5Ac (39), was used. The enzyme reaction was stopped with the addition of 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the absorbance was read at 450 nm with an ELISA plate reader.

### Dot-ELISA

Ten  $\mu$ l of purified native or desialylated CPS (each at 1 mg/ml) or 10  $\mu$ l of heat-killed whole bacteria were blotted on a PVDF Western blotting membrane (Roche). Heat-killed bacteria were obtained after incubating bacteria at 60°C for 45 min and were adjusted to 10<sup>9</sup> CFU/ml. The membrane was blocked for 1 h with a solution of Tris-buffered saline (TBS) containing 2% casein, followed by a 2 h incubation with either the mouse monoclonal Ab (mAb) Z3 which specifically recognizes the sialic acid moiety of *S. suis* type 2 CPS (40), mono-specific polyclonal rabbit sera against *S. suis* type 2 (41) or *S. suis* type 14 (32), or commercial rabbit sera against GBS type III or GBS type V CPS (Denka Seiken). The membrane was washed and the appropriate anti-rabbit or anti-mouse HRP-conjugated Ab (Jackson) was added for 1 h. The membrane was washed 3 times with TBS and revealed with a 4-chloro-1-naphthol solution (Sigma).

### *Mouse strains and generation of bone marrow-derived dendritic cells*

Six- to eight-week-old mice originating from Jackson Laboratory including wild type (WT) C57BL/6, MyD88<sup>-/-</sup> (B6.129P2-Myd88<sup>tm1Defr/J</sup>), and TLR2<sup>-/-</sup> (B6.129-Tlr2<sup>tm1Kir/J</sup>) mice were used. All experiments involving mice were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals by the Animal Welfare Committee of Université de Montréal. Bone marrow-derived DCs were produced according to a technique previously described (13, 42) and cultured in complete medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 50 µM 2-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin-streptomycin and 20 µg/ml gentamycin. All reagents were from Gibco (Invitrogen). Cell purity was routinely ≥ 86-90% CD11c<sup>high</sup> and F4/80<sup>-dim</sup> cells as determined by FACS analysis, values that were in agreement with those reported in other studies (43-45).

### *In vitro DC stimulation assay*

DCs were resuspended at 10<sup>6</sup> cells/ml in complete medium and stimulated with native or desialylated CPS (5, 50, 100, 200 µg/ml). At 6 and 24 h, supernatants were collected for cytokine quantification by ELISA and cells were harvested for analysis of BAFF expression by reverse transcriptase-quantitative PCR (RT-qPCR). Cells stimulated with 1 µg/ml ultra-purified *Escherichia coli* O55:B5 lipopolysaccharide (LPS) (Apotech Corporation) or 10 ng/ml recombinant mouse IFN-γ (R&D Systems) served as positive control for cytokine production and BAFF expression, respectively. Non-stimulated cells served as negative control. In some experiments, DCs were pre-stimulated with CPS (at 200 µg/ml) for 6 h prior to incubation with 10 ng/ml IFN-γ for 24 h. Cells were then harvested for BAFF expression analysis. DCs pre-incubated in complete medium before addition of IFN-γ served as control. All solutions and CPSs were tested for the absence of endotoxin using a *Limulus* amoebocyte lysate gel-clot test (Pyrotell, STV) with a sensitivity limit of 0.03 EU/ml. Otherwise, absence of endotoxin contamination during cell stimulation was controlled by parallel assays with polymyxin B sulfate (Sigma) at 20 µg/ml.

### *Cytokine quantification by ELISA*

Levels of IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF-α, CCL2 (MCP-1) and CCL3 (MIP-1α) in cell culture supernatants were measured by sandwich ELISA using pair-matched

Abs from R&D Systems according to the manufacturer's recommendations. Two-fold dilutions of recombinant mouse cytokines were used to generate standard curves. Sample dilutions giving OD readings in the linear portion of the appropriate standard curve were used to quantify the levels of each cytokine.

#### *Analysis of BAFF gene expression by real time RT-qPCR*

Total RNA was isolated from  $10^6$  DCs with the Trizol reagent (Invitrogen). After elimination of genomic DNA, 800 ng of total RNA was reverse-transcribed with the QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen). The cDNA was amplified using the SsoFast™ EvaGreen® Supermix kit (Bio-Rad). The PCR amplification program for all cDNA consisted of an enzyme activation step of 3 min at 98°C, followed by 40 cycles of a denaturing step of 2 s at 98°C and an annealing/extension step of 5 s at 56°C. ATP synthase subunit beta (ATP5B) and cytochrome c1 (CYC1) were used as normalizing genes to compensate for potential differences in cDNA amounts. The primers used for amplification of the different target cDNA are listed in Table S1 and were all tested to achieve an amplification efficiency between 98.5% and 100%. The primer sequences were all designed from the NCBI GenBank mRNA sequence using the web-based software primerquest from Integrated DNA technologies. The Bio-Rad CFX-96 sequence detector was used for amplification of cDNA, and quantitation of differences between the different groups was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (46). Non-stimulated DCs were used as the calibrator reference in the analysis.

#### *Statistical analysis*

All data are expressed as mean  $\pm$  standard errors of the mean (SEM). Data were analyzed for significance using analysis of variance (ANOVA). Significance is denoted in the figures as follow:\*,  $P < 0.05$ ; and \*\*,  $P < 0.001$ . All experiments were repeated at least three times.

## Results

### *S. suis* and GBS CPS purification, desialylation and quality control tests

On average, from a 6-liter of *S. suis* type 2 or *S. suis* type 14 culture, 150 mg of crude capsule was obtained, to afford around 30 mg of purified CPS after gel filtration (average yield of 5 mg CPS/liter of culture). From 8 liters of GBS type III or type V culture, 360 mg or 600 mg initial crude capsule was obtained, respectively, to afford around 30 mg of purified CPS after gel filtration (average yield of 3.75 mg CPS/liter of culture). GC and NMR analyses of purified CPSs gave sugar compositions and structures in accord with previous findings (8, 10, 11) (Fig. S1 and S2; Table 1). Each repeating unit is composed of the same four sugars (with an additional rhamnose in *S. suis* type 2 CPS), with sialic acid located at the terminal side chain. The ratios of the four common sugars are similar in *S. suis* types 2 and 14 CPSs, whereas they are different between GBS type III and V CPSs. In comparison with *S. suis* CPSs, the repeating unit of GBS type III and V CPSs has one less galactose, and GBS type V CPS has two additional glucose residues. Indeed, the glucose:galactose:*N*-acetylglucosamine:*N*-acetylneuraminic acid:rhamnose sugar ratio for each repeating unit of *S. suis* type 2, *S. suis* type 14, GBS type III and GBS type V CPSs is 1:3:1:1:1, 1:3:1:1:0, 1:2:1:1:0 and 3:2:1:1:0, respectively (Fig. S1 and S2; Table 1). One of the problems encountered in purifying GBS CPSs is contamination with group B antigen, as the CPS is covalently linked to the cell wall in this bacterial species (47). The absence of rhamnose (a sugar present in group B antigen but not in GBS CPSs) in purified GBS CPS preparations confirmed the absence of contamination with this cell wall antigen. No protein was found above the limit of detection, indicating that there was less than 1.3% (wt/wt protein) in all purified CPSs, and DNA and RNA contamination was less than 1% (wt/wt) (Table 1). SEC-MALS showed that native *S. suis* types 2 and 14 CPSs had similar  $M_w$ , which was 480 and 500 kDa, respectively. Native GBS type III and V CPSs had comparable  $M_w$ , which were almost 4-fold lower than that of native *S. suis* CPSs. Desialylation induced a larger  $M_w$  decrease in *S. suis* CPSs than in GBS CPSs, with the highest diminution for desialylated *S. suis* type 2 CPS (96% of the initial  $M_w$ ) (Table 1). This could be explained by the presence of rhamnose in the backbone of *S. suis* type 2 CPS, which forms a linkage more susceptible to acid hydrolysis with the adjacent sugar.

### *S. suis* and GBS CPS recognition by specific sera and sialic acid-binding lectins

Dot-ELISA experiments on native CPSs showed that recognition of the CPS epitope of each CPS preparation was conserved after purification (Fig. 1). Whereas the native *S. suis* type 2 CPS was well recognized by mAb Z3, which is specific for the sialic acid part of the capsule, the negative reaction of the desialylated *S. suis* type 2 CPS attested the absence of sialic acid in the latter (Fig. 1A, left). Desialylation of *S. suis* type 2 CPS resulted in reduced recognition by specific polyclonal Abs (Fig. 1A, right), whereas recognition of desialylated preparations of *S. suis* type 14 CPS was unaltered (Fig. 1B). The capacity of specific polyclonal Abs to react with the desialylated GBS type III CPS was almost completely lost compared to that with native CPS (Fig. 1C). In contrast, native and desialylated preparations of GBS type V CPS were similarly recognized by specific polyclonal Abs (Fig. 1D). These data suggest that there are intra- and interspecies variations in the immunogenic properties exerted by the sialic acid moiety (48-50).

To further confirm the presence or absence of sialic acid in native and desialylated CPSs, an ELLA test was performed. Recognition of native *S. suis* and GBS CPSs by LFA, which is specific for Neu5Ac, confirmed the integrity of sialic acid in these preparations, whereas the absence of reaction with desialylated preparations demonstrated the absence of this sugar after desialylation by mild acid hydrolysis (Fig. 2A). Recognition of native *S. suis* CPSs by SNA-I and of native GBS CPSs by MAL-I validated that sialic acid forms an  $\alpha$ -2,6 and an  $\alpha$ -2,3 links, respectively, with the adjacent galactose (Fig. 2B and C). In the case of desialylated *S. suis* type 14 CPS, a positive reaction was observed with both SNA-I and MAL-I. Similarly, a positive reaction was observed for desialylated GBS type III CPS with MAL-I (Fig. 2B and C). Because negative reactions with LFA and NMR analysis (Fig. S1, S2 and 2A) clearly demonstrated the absence of sialic acid in these desialylated preparations, the positive reaction with SNA-I can be explained by the non-specific binding of the lectin to D-galactose (37). Recognition of Gal $\beta$ -1,4-GlcNAc epitope of desialylated *S. suis* type 14 and GBS type III CPSs by MAL-I can explain the unspecific reaction of this lectin with these two preparations (51).

### *S. suis* and GBS CPSs induce the release of chemokines by DCs

The levels of several cytokines and chemokines in the supernatants of DCs incubated with *S. suis* type 2 or 14 or GBS types III or V CPS (each at 200  $\mu$ g/ml) were measured at 24 h after stimulation. No significant difference in pro- or anti-inflammatory

cytokine production was observed between DCs incubated with the different CPSs and those incubated with medium alone (Fig. 3). Similar results were obtained at 6 h after stimulation (data not shown). The presence of sialic acid did not influence the release of these cytokines, as no significant difference was observed between native and desialylated CPSs (Fig. 3).

In contrast, *S. suis* and GBS CPSs induced significant release of the chemokines CCL2 and CCL3 at 24 h (Fig. 4). CCL3 production was induced similarly by all CPS preparations (Fig. 4A). On the other hand, CCL2 production was significantly higher when DCs were activated with *S. suis* CPSs ( $P < 0.001$ ; Fig. 4B). In the case of *S. suis*, more CCL2 production was observed for DCs stimulated with *S. suis* type 14 CPS than for those stimulated with *S. suis* type 2 CPS ( $P < 0.001$ ). Sialic acid plays a partial inhibitory role in the production of CCL2 for *S. suis* type 2 CPS only ( $P < 0.001$ ). To explore more precisely the characteristics of CCL2 and CCL3 production, dose- and time-response analyses were performed. CCL2 release induced by *S. suis* type 2 CPS was shown to be directly proportional to the CPS concentration and the time of incubation, with maximum release obtained at 24 h when using a concentration of 200  $\mu\text{g/ml}$  CPS (Fig. 5). Similar results were obtained with *S. suis* type 14, GBS types III and V CPSs, for both CCL2 and CCL3 production (data not shown).

#### *Involvement of PRRs in chemokine release by DCs stimulated with S. suis and GBS CPSs*

Previous *in vitro* studies have demonstrated that well-encapsulated *S. suis* type 2 induces TLR2 mRNA expression by human monocytes (52) and porcine DCs (15) and stimulates cytokine and chemokine production by murine macrophages and DCs in a TLR2- and MyD88-dependent manner (52, 53). Moreover, the release of cytokines by *S. suis*-stimulated human monocytes was significantly reduced by Ab-mediated blocking of TLR2 but not TLR4 (52). In the case of GBS type III, the killed bacterium induces TLR2 mRNA expression and TLR2-dependent expression of certain cytokines and chemokines by murine macrophages (54). Killed GBS type III stimulates TNF- $\alpha$  release in a TLR2-independent but MyD88-dependent way by those cells (55). As earlier studies have shown that PRRs like TLRs are involved in cytokine production by APCs stimulated with purified CPSs from several different bacteria (25, 27, 56), we aimed to evaluate the implication of these receptors in the production of chemokines by DCs activated with our CPSs. Therefore, CCL2 and CCL3 release was compared between WT and TLR2<sup>-/-</sup> or MyD88<sup>-/-</sup> DCs incubated with *S. suis* or GBS CPSs (at 200  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 h. As shown in Figs. 6A and 7A, no significant difference in CCL2



production was observed between WT and TLR2<sup>-/-</sup> or between WT and MyD88<sup>-/-</sup> DCs for either *S. suis* or GBS CPSs. On the other hand, TLR2<sup>-/-</sup> DCs activated with either GBS type III or type V CPS showed a partial reduction of CCL3 production compared to their WT DC counterparts ( $P < 0.05$ ). In the case of *S. suis*, a significant effect of TLR2 on CCL3 production was only observed for native *S. suis* type 2 CPS, indicating the involvement of other receptors (Fig. 6B). Indeed, a significant impairment of CCL3 production by MyD88<sup>-/-</sup> DCs incubated with all four *S. suis* or GBS CPSs was observed, with decreases varying between 40 and 50% ( $P < 0.001$ ) (Fig. 7B). In general, the presence of sialic acid did not seem to significantly modulate the interactions between either GBS or *S. suis* CPSs with the TLR/MyD88 pathway (Fig. 6 and 7).

#### *Modulation of BAFF gene expression by DCs incubated with S. suis and GBS CPSs*

In contrast to the numerous studies that have focused on the effect of BAFF on B cell physiology, there is a relative paucity of evidence concerning BAFF production by DCs. A recent study has shown that the prototype TI antigen NP-Ficoll is able to induce the release of BAFF by murine DCs, which is essential for the development of Ab response (57). To analyze whether *S. suis* and GBS CPSs modulate BAFF mRNA expression levels, DCs were stimulated with native CPSs at 6 and 24 h. IFN- $\gamma$  (10 ng/ml), known to stimulate BAFF synthesis by monocytes, macrophages and DCs (29, 58, 59), was used as positive control. As shown in Fig. 8, no significant difference in BAFF expression levels was observed between CPS-activated DCs and control non-stimulated cells, either at 6 or 24 h. Only a slight up-regulation (less than 2-fold increase) of BAFF mRNA expression was observed at 6 h for all native CPS preparations. As sialic acid has been shown to inhibit B cell activation (60), we wanted to know if this sugar could be involved in the inhibition of BAFF expression as well. Sialic acid did not significantly modulated BAFF expression by DCs (Fig. 8).

To further evaluate the capacity of GBS and *S. suis* CPSs to inhibit BAFF expression by DCs, we evaluated the impact of DC pre-incubation with CPS on IFN- $\gamma$ -induced BAFF. To this end, DCs were pre-cultured with the different CPSs for 6 h prior to stimulation with IFN- $\gamma$  for 24 h. Diminutions of BAFF mRNA expression ranging from 20 to 40% were observed when DCs were pre-incubated with either *S. suis* or GBS CPSs in comparison with non-pretreated cells, confirming the inhibitory effect of these bacterial CPSs on BAFF expression (Fig. 9).

## Discussion

CPS is a crucial component for both *S. suis* and GBS. In addition to forming the basis for serotype designation and being the major virulence factor, it has, as an immunogen, a high protective potential in the fight against infections by these two streptococci. Indeed, as shown with other encapsulated bacteria like *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*, the specific anti-CPS humoral response could play a decisive role in host survival to *S. suis* or GBS infections. Previous studies have demonstrated that mouse or pig anti-*S. suis* type 2 CPS Abs have a protective role in homologous opsonophagocytosis *in vitro* assays (40, 61, 62), or during *in vivo* challenge (40, 63). Finally, Abs raised against several GBS CPS serotypes, including serotypes Ia, Ib, II, III and V, are protective against neonatal infections in both animals and humans and exhibit opsonophagocytosis ability *in vitro* (64).

However, *S. suis* and GBS CPSs are poorly immunogenic molecules because they cannot recruit T cell help for B cell functions. Mothers of neonates developing GBS type III disease have low concentrations of anti-CPS Abs in sera at delivery (65), and very few anti-CPS Abs can be detected in pigs infected with *S. suis* type 2 (61, 63). To counter the low immunogenicity of CPSs, researchers have developed conjugate vaccine composed of CPS linked to a carrier protein, as it is the case for GBS. However, efficacy of in-trial GBS conjugate vaccines depends on the CPS serotype included in the preparation. Indeed, CPSs of types Ia, Ib, II and III induce strong protective IgG responses, whereas GBS type V CPS promotes higher concentrations of specific IgM relative to IgG (64). This suggests that composition and/or structure of CPS could influence its immunogenicity. Certain structural features of CPSs, such as variations in repeating unit composition or glycosidic linkage positions, are susceptible to produce different immune responses (66-68).

Despite these observations, very few studies have been dedicated to the characterization of CPS activity on APCs and to the corresponding signaling mechanisms. Some bacterial CPS motifs, including sialic acid, are very similar to molecules expressed by human cells or tissues, which could result in immune evasion through molecular mimicry (68). Therefore, chemical alteration of sialic acid of *N. meningitidis* type B CPS by de-*N*-acetylation or deletion of this sugar in GBS type V CPS improved the immunogenicity of these two CPSs (49, 69). However, the consequences of capsular sialic acid manipulation on the capacity of CPS to activate

the immune system have been only evaluated in the context of Ab production. The mechanisms underlying this effect, such as the modulation of the function of APCs, are poorly known.

In this article, we analyzed the ability of *S. suis* and GBS CPSs to activate DCs as determined by production of cytokines and chemokines susceptible to be involved in TI responses. Mouse-origin DCs were used because mouse models are well described for both pathogens and because *in vitro* interactions of GBS or *S. suis* with mouse, human and/or swine origin cells showed similar results (12, 14, 15, 52, 53, 70, 71). We used native and desialylated CPSs isolated from two of the most virulent and frequently isolated serotypes in humans for each bacterial species, in order to examine the role of CPS composition in modulation of DC activation. The capsular preparations underwent a series of rigorous physicochemical and immunologic control quality tests, which attested the high purity of the CPSs, the preservation of epitope recognition, as well as the absence of sialic acid in the desialylated preparations. Our results demonstrated that native *S. suis* types 2, 14 and GBS types III and V CPSs do not induce the release of key pro-inflammatory cytokines, which confirms the poor immunogenic nature of these molecules. This is in accordance with previous experiments where *S. suis* type 2 CPS did not induce the production of either IL-1 $\beta$ , IL-6 or TNF- $\alpha$  by human monocytes or murine macrophages (52, 72). However, our results are in contradiction with earlier studies which showed that GBS type III CPS stimulated the production of TNF- $\alpha$  and IL-6 by human cord blood monocytes (73, 74). This difference could be explained by the use of different cells or by variations in the purification method. Nevertheless, the authors indicated that GBS type III CPS was a poor stimulator compared to other bacterial cell wall components (73, 74). Other studies using CPS purified from other bacterial species have concluded likewise, that such a molecule is a poor activator of the immune system. *S. pneumoniae* CPS incubated with human monocyte-derived DCs produced no or very small amounts of IL-12 or IL-10 (75). Similarly, *N. meningitidis* type C CPS was unable to induce production of IL-6 and TNF- $\alpha$  by human monocytes or macrophages (76). By using desialylated CPSs, we demonstrated for the first time that sialic acid does not seem to play an inhibitory role in the release of pro-inflammatory cytokines by DCs. The presence of sialic acid has been linked to production of the regulatory cytokine IL-10 (77, 78). However, sialic acid in either GBS CPSs or *S. suis* CPSs did not result in increased IL-10 production by DCs. Thus, an imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokine profiles cannot explain the poorly DC-stimulatory properties of either GBS or *S. suis* CPSs.

Interestingly, *S. suis* and GBS CPSs remarkably stimulated DC production of two members of the CC family of chemokines, i.e., CCL2 and CCL3. These two chemokines are known to play a major role in the selective recruitment of monocytes, macrophages, DCs and lymphocytes to sites of inflammation (79, 80). High levels of CCL2 in the central nervous system is a characteristic of patients with bacterial meningitis (81). Systemic production of this chemokine, as well as its expression in the brain, are features of *S. suis* type 2 infected mice (82), and CCL2 has been associated to clinical signs of GBS sepsis in neonates (83). Recently, whole *S. suis* type 2 has been shown to induce CCL2 production by murine DCs (12) and CCL3 production by total mouse splenocytes (unpublished data). Similarly, studies have shown that whole GBS type III stimulates CCL2 and CCL3 secretion by murine macrophages and/or DCs (84, 85). Our observations with purified CPSs allow a better interpretation of previous data showing different patterns of chemokine production obtained with total leukocytes, monocytes and/or DCs cultured in presence of whole *S. suis* type 2 or GBS types III and V, and their respective non-encapsulated mutants. Indeed, in these studies, production of CCL2 and/or CCL3 was significantly diminished with bacteria lacking CPS (52, 71, 85), suggesting an important role of CPS in contributing to the production of these chemokines. Our observations are analogous to those antecedent studies where *S. suis* type 2 CPS was able to induce the expression of CCL2 mRNA in a porcine whole-blood culture system and the release of this chemokine by human monocytes and murine macrophages (52, 71). Other studies have reported that purified CPSs from *N. meningitidis*, *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides fragilis* stimulate liberation of chemokines by murine macrophages or DCs (25-27). Surprisingly, differences in composition or structure between *S. suis* and GBS CPSs, or presence of sialic acid, did not deeply influence the release of chemokine by DCs.

It is well known that PRRs, including TLRs, are involved in the activation of immune cells by encapsulated bacteria and/or their purified CPSs (27, 56, 86). Our results indicates that the production of CCL2 by native or desialylated *S. suis* or GBS CPSs was independent of TLR2 or MyD88-related pathways. Similarly, production of CCL2 by murine macrophages incubated with *S. suis* type 2 CPS has been previously shown to be TLR2- and MyD88-independent (52). Macrophage expression of CCL2 induced by whole GBS type III has also been reported to be TLR2-independent (54).

Albeit CCL2 and CCL3 are two members of the CC family of chemokines presenting similarities in the regulation of their synthesis as well as in their biological

functions, CCL3 production induced by *S. suis* or GBS CPSs was significantly diminished with MyD88<sup>-/-</sup> DCs and partially affected with TLR2<sup>-/-</sup> DCs. Interestingly, and in contrast to CCL2, macrophage expression of CCL3 induced by whole GBS type III has been reported to be TLR2-dependent (54). While differential expression of these two chemokines has been reported in other systems (87), the underlying regulatory mechanisms are unknown. Nevertheless, the partial inhibition of CCL3 production in TLR2<sup>-/-</sup> or MyD88<sup>-/-</sup> DCs suggests that other TLRs as well as MyD88-independent pathways may be implicated in chemokine release by *S. suis* or GBS CPSs. The concept of direct interaction of CPSs with TLRs is still controversial. Although we used highly purified CPS material undergoing strict quality controls, the possibility of undetected contamination by traces of lipoproteins cannot be excluded. Cells deficient in TLR2 might also fail to express adequate levels of a receptor that may be relevant for CPS recognition. Members of the large family of lectin receptors are other possible receptor candidates (77, 88) and warrants further investigations.

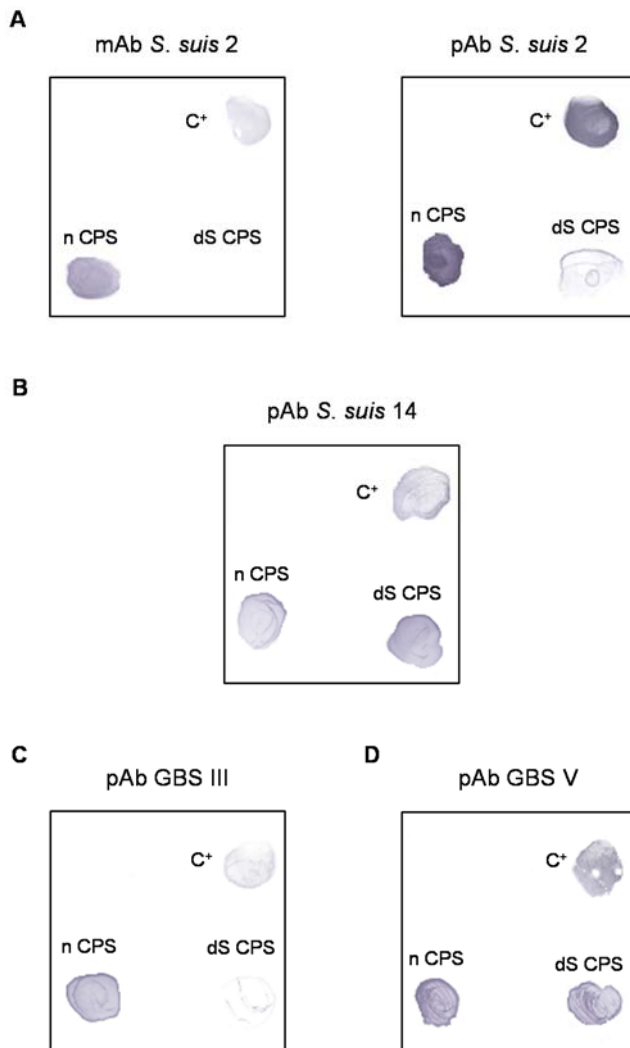
CPS antigens are, with few exceptions, considered as TI antigens. It is well known that the TNF family member BAFF plays a crucial role in the immune response against these antigens. Whereas several studies have shown that TLR ligand LPS, or the prototype TI antigen NP-Ficoll, stimulates expression or production of BAFF by total splenocytes, macrophages or DCs (29, 57, 59, 89), there is a relative paucity of evidence concerning BAFF induction by CPSs. In our study, we observed that *S. suis* and GBS CPSs were unable to induce a significant expression of BAFF by DCs in comparison with unstimulated cells. This is in accordance with a previous study where *N. meningitidis* type C and GBS type V CPSs did not promote the release of BAFF by murine DCs (57), and it confirms the poor immunogenicity of CPSs. We observed that CPSs presented a suppressive effect on the capacity of IFN- $\gamma$  to induce BAFF expression, and some CPSs were able to provoke an inhibition of up to 40%. Similarly, *N. meningitidis* type C and GBS type V CPSs have been shown to inhibit intracellular and extracellular levels of IFN- $\gamma$ -induced BAFF in murine DCs (57). We evaluated for the first time the influence of sialic acid on this effect. However, sialylation did not play a major role in modulation of BAFF expression. The negative regulatory function of CPSs is not observed only on BAFF mRNA synthesis. The presence of CPS impairs cytokine release by DCs and macrophages activated by *S. suis* (12, 15, 52, 70). The inhibitory effect of CPS is not specific to cytokine expression but affects other cell functions, such as the expression of co-stimulatory molecules and major histocompatibility complex class II by DCs (15). *S. suis* type CPS has been shown to downmodulate phagocytosis by destabilizing lipid microdomains and inhibiting

activation of signaling pathways involved in phagocytosis (90, 91), whereas GBS type III CPS impairs bactericidal functions of neutrophils (77).

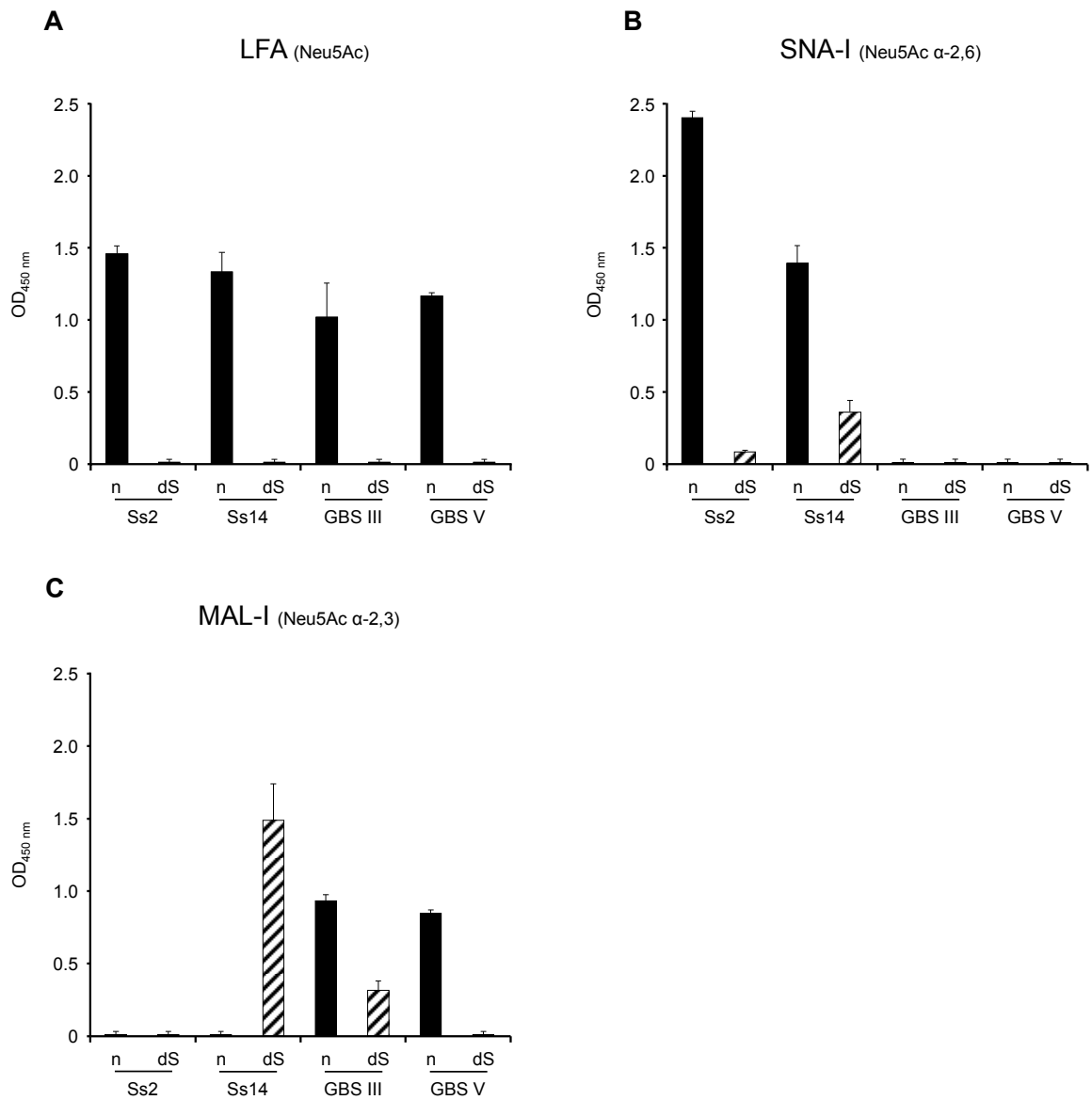
In conclusion, we found that highly purified CPSs isolated from two distinct serotypes from two different Gram-positive streptococci, *S. suis* and GBS, were principally poor immunogenic antigens. However, they were able to specifically induce production of CCL2 and CCL3 by DCs. TLR2 and other MyD88-dependent pathways are partially involved in recognition of these CPSs, which might also implicate a more complex cross talk with other receptors. Interestingly, the effect of CPS composition (including sialic acid) and structure on DC function was less marked than that previously reported for B cell activation (67, 68) or than the observed variations in CPS recognition by specific sera in our dot-ELISA analysis. Thus, DCs seem to recognize and respond to these CPSs in a “patterned” way rather than in a structure-dictated manner, which is in agreement with the role of the innate immune system. Further studies on the impact of DC activation status on B cell responses to these TI antigens are guaranteed.

### **Acknowledgments**

This work was mainly supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through a grant to MS (#342150-07) and in part by a Canadian Institutes of Health Research grant and by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT)–New Initiatives program to MS and MRVC.

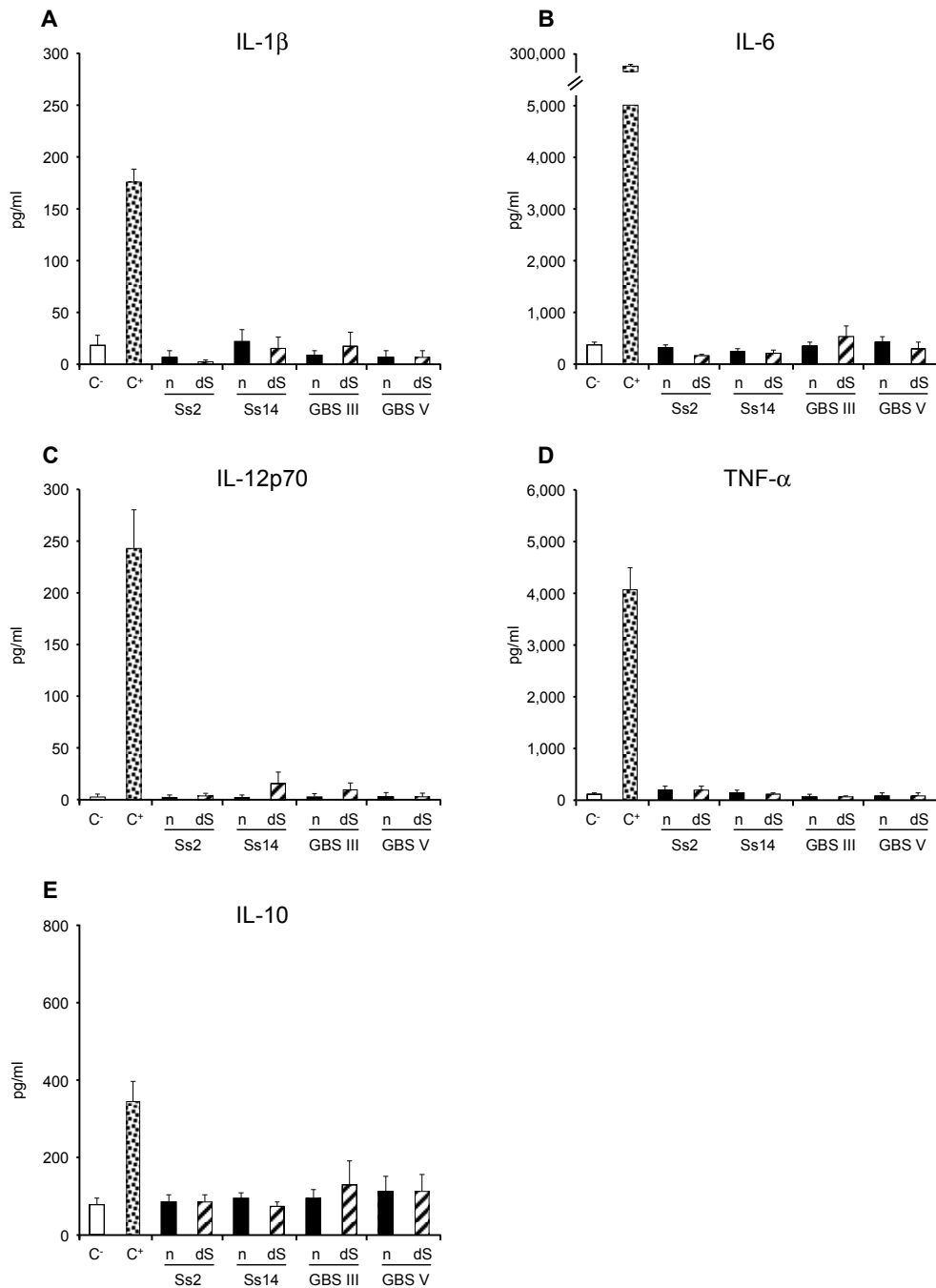


**Figure 1. Recognition of *S. suis* and GBS CPSs by dot-ELISA.** *S. suis* type 2 (A), *S. suis* type 14 (B), GBS type III (C) or GBS type V (D) whole bacteria (positive control C<sup>+</sup>) (10<sup>7</sup> CFU) or their respective purified native (n) or desialylated (dS) CPS (10 µg) were incubated with a monoclonal antibody (mAb) directed against the sialic acid moiety of *S. suis* type 2 CPS (A, left) or with mono-specific polyclonal sera (pAb) against *S. suis* type 2 (A, right), *S. suis* type 14 (B), GBS type III CPS (C) or GBS type V CPS (D).

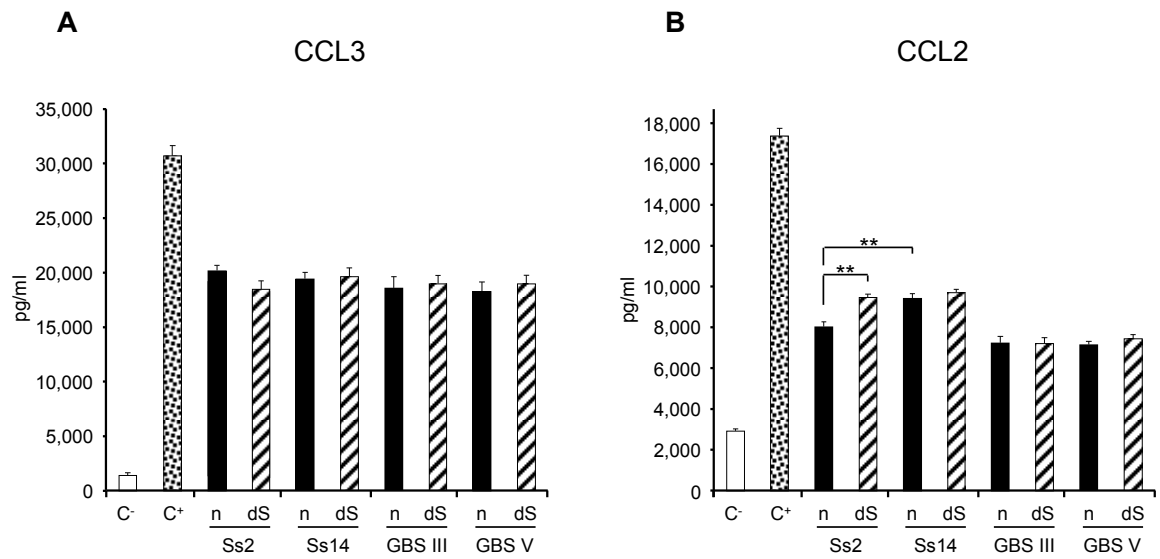


**Figure 2. Recognition of *S. suis* and GBS CPSs by ELLA.** Native (n) or desialylated (dS) *S. suis* type 2 (Ss2), *S. suis* type 14 (Ss14), GBS type III or GBS type V CPS (each at 2  $\mu$ g/ml) was incubated with *Limax flavus* agglutinin specific for Neu5Ac (LFA) (A), *Sambucus nigra* agglutinin specific for Neu5Ac  $\alpha$ -2,6 links (SNA-I) (B) or *Maackia amurensis* leucoagglutinin specific for Neu5Ac  $\alpha$ -2,3 links (MAL-I) (C). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (optical density OD<sub>450 nm</sub>) from at least three experiments with at least three technical replicates and are corrected for reaction of dilution buffer with the corresponding lectin.

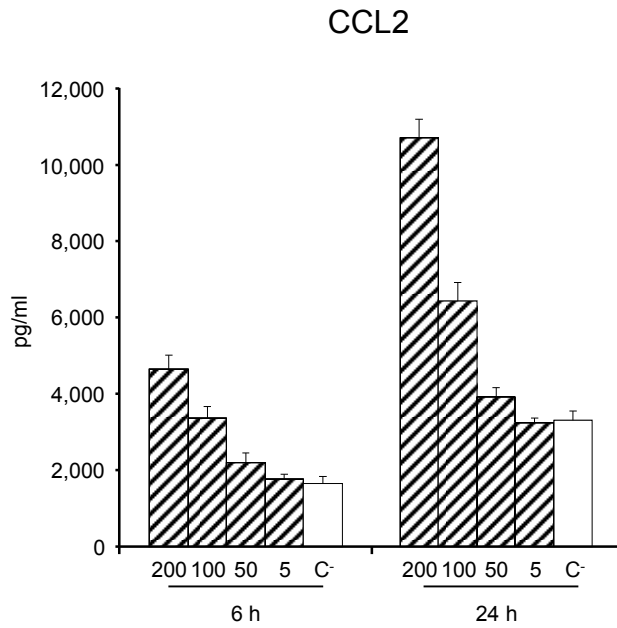




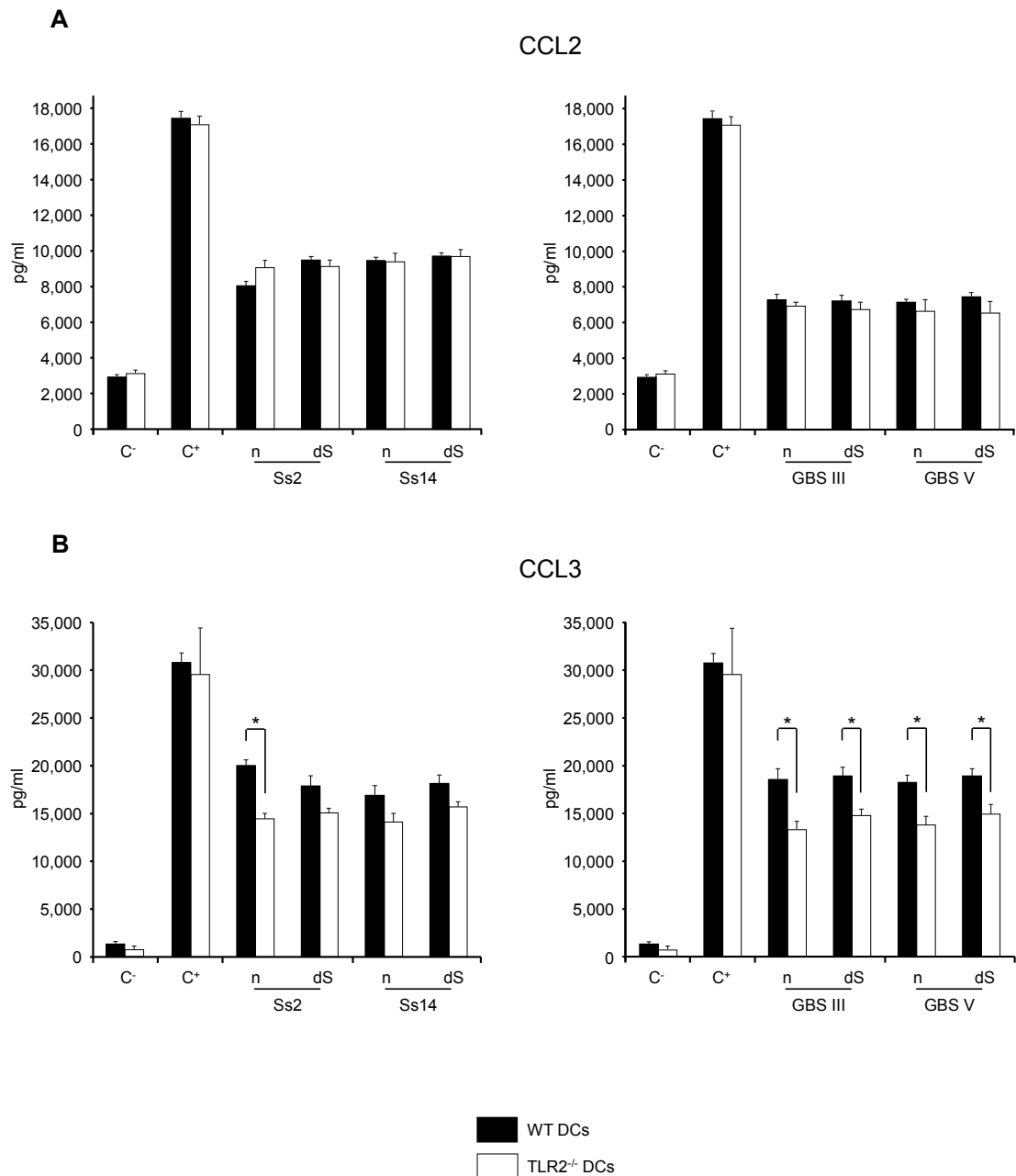
**Figure 3. Pro- and anti-inflammatory cytokine production by DCs in response to stimulation by *S. suis* or GBS CPSs for 24 h.** Native (n) or desialylated (dS) *S. suis* type 2 (Ss2), *S. suis* type 14 (Ss14), GBS type III or GBS type V CPS (each at 200  $\mu$ g/ml) was incubated with DCs ( $10^6$  cells/ml). After 24 h, supernatants were collected and IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), IL-12p70 (C), TNF- $\alpha$  (D) and IL-10 (E) levels were quantified by ELISA. Cells stimulated with medium alone or LPS (1  $\mu$ g/ml) served as negative (C<sup>-</sup>) and positive (C<sup>+</sup>) control, respectively. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (pg/ml) from at least three experiments with at least three technical replicates.



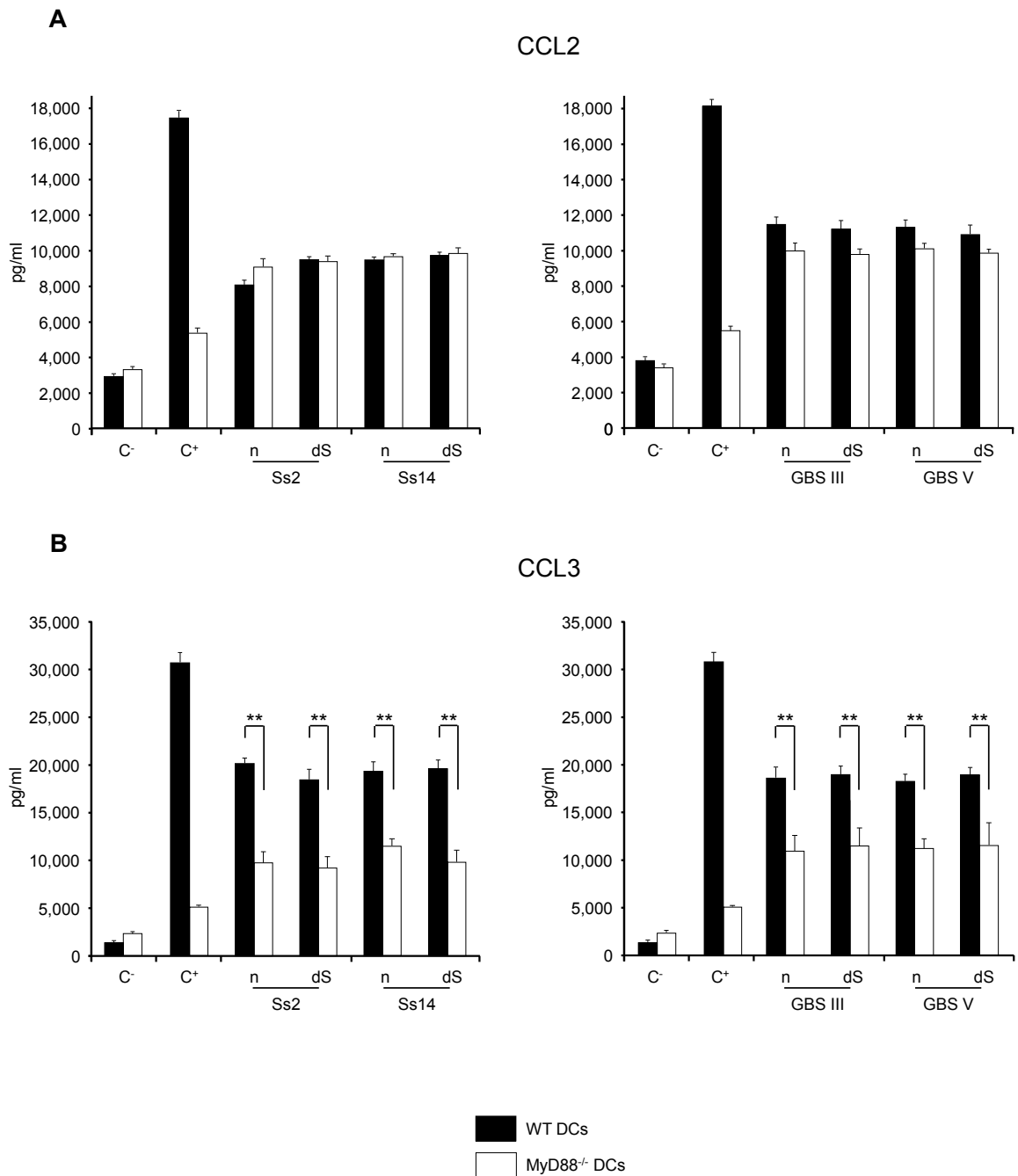
**Figure 4. Chemokine production by DCs in response to stimulation by *S. suis* or GBS CPSs for 24 h.** Native (n) or desialylated (dS) *S. suis* type 2 (Ss2), *S. suis* type 14 (Ss14), GBS type III or GBS type V CPS (each at 200  $\mu\text{g/ml}$ ) was incubated with DCs ( $10^6$  cells/ml). After 24 h, supernatants were collected and CCL3 (A) and CCL2 (B) levels were quantified by ELISA. Cells stimulated with medium alone or LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) served as negative (C-) and positive (C+) control, respectively. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (pg/ml) from at least three experiments with at least three technical replicates. \*\*,  $P < 0.001$ .



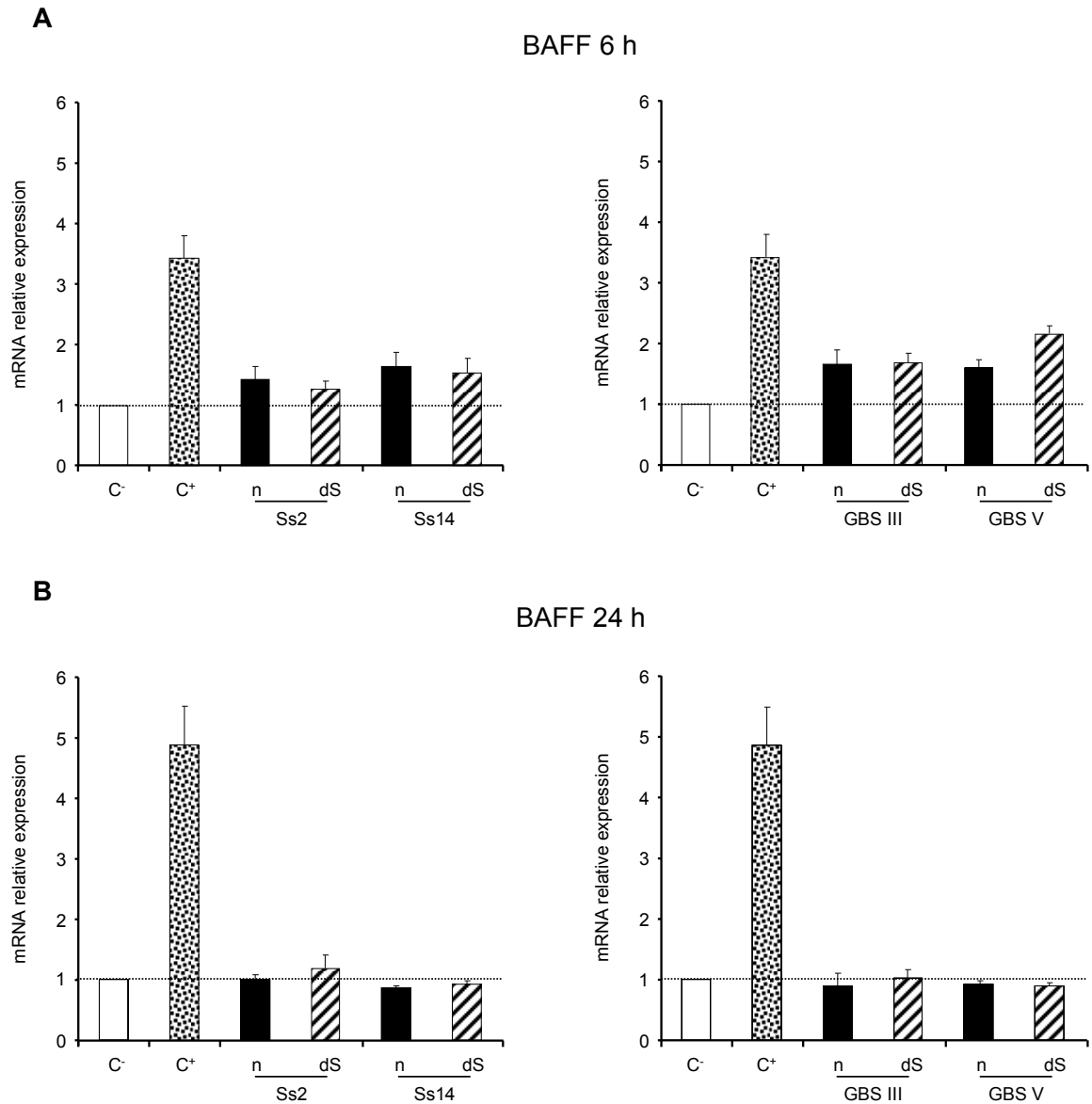
**Figure 5. CCL2 production by DCs in response to stimulation by *S. suis* type 2 CPS is dose and time dependent.** Native *S. suis* 2 CPS (200, 100, 50, 5 µg/ml) was incubated with DCs ( $10^6$  cells/ml). After 6 or 24 h, supernatants were collected and CCL2 levels were quantified by ELISA. Cells stimulated with medium alone served as negative control (C<sup>-</sup>). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (pg/ml) from at least three experiments with at least three technical replicates.



**Figure 6. Role of TLR2 in chemokine production by DCs in response to stimulation by *S. suis* or GBS CPSs for 24 h.** Native (n) or desialylated (dS) *S. suis* type 2 (Ss2), *S. suis* type 14 (Ss14), GBS type III or GBS type V CPS (each at 200  $\mu$ g/ml) was incubated with WT (black bars) or TLR2<sup>-/-</sup> (white bars) DCs (10<sup>6</sup> cells/ml). After 24 h, supernatants were collected and CCL2 (A) and CCL3 (B) levels were quantified by ELISA. Cells stimulated with medium alone or LPS (1  $\mu$ g/ml) served as negative (C<sup>-</sup>) and positive (C<sup>+</sup>) control, respectively. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (pg/ml) from at least three experiments with at least three technical replicates. \*,  $P < 0.05$ .

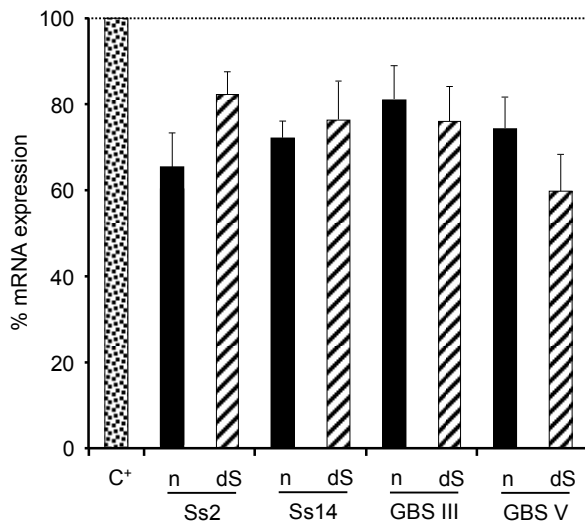


**Figure 7. Role of MyD88 in chemokine production by DCs in response to stimulation by *S. suis* or GBS CPSs for 24 h.** Native (n) or desialylated (dS) *S. suis* type 2 (Ss2), *S. suis* type 14 (Ss14), GBS type III or GBS type V CPS (each at 200  $\mu$ g/ml) was incubated with WT (black bars) or MyD88<sup>-/-</sup> (white bars) DCs (10<sup>6</sup> cells/ml). After 24 h, supernatants were collected and CCL2 (A) and CCL3 (B) levels were quantified by ELISA. Cells stimulated with medium alone or LPS (1  $\mu$ g/ml) served as negative (C<sup>-</sup>) and positive (C<sup>+</sup>) control, respectively. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (pg/ml) from at least three experiments with at least three technical replicates. \*\*,  $P < 0.001$ .



**Figure 8. Relative expression of BAFF mRNA by DCs in response to stimulation by *S. suis* or GBS CPSs for 24 h.** Native (n) or desialylated (dS) *S. suis* type 2 (Ss2), *S. suis* type 14 (Ss14), GBS type III or GBS type V CPSs (each at 200  $\mu\text{g/ml}$ ) was incubated with DCs ( $10^6$  cells/ml). After 6 h (A) or 24 h (B) of incubation, cells were collected and BAFF mRNA expression was determined by RT-qPCR. Cells stimulated with IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) served as positive control (C<sup>+</sup>). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM from at least three experiments and are relative to DCs stimulated with medium alone (C<sup>-</sup>) whose value was arbitrarily fixed to 1.

### BAFF 30 h



**Figure 9. Effect of pre-incubation of DCs with *S. suis* or GBS CPSs on IFN- $\gamma$ -induced expression of BAFF mRNA.** DCs ( $10^6$  cells/ml) were pre-stimulated with native (n) or desialylated (dS) *S. suis* type 2 (Ss2), *S. suis* type 14 (Ss14), GBS type III or GBS type V CPS (each at 200  $\mu$ g/ml) for 6 h prior to incubation with IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) for 24 h. Cells were then collected and BAFF mRNA expression was determined by RT-qPCR. Cells pre-stimulated with medium alone before addition of IFN- $\gamma$  served as positive control (C<sup>+</sup>). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM from at least three experiments and are relative to C<sup>+</sup> whose value was arbitrarily fixed to 100%.

**TABLE I. Quality control tests of purified *S. suis* and GBS CPSs<sup>f</sup>.**

| CPS <sup>a</sup>            | Sugar composition <sup>b</sup> | $M_w$ <sup>c</sup> | % (wt/wt) nucleic acids <sup>d</sup> | % (wt/wt) protein <sup>e</sup> |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| <i>S. suis</i> type 2 (n)   | 1:2.6:0.9:1.0:0.9              | 480                | 0.8                                  | NS                             |
| <i>S. suis</i> type 2 (dS)  | 1:2.6:0.9:1.0:0.9              | 21                 | 0.8                                  | NS                             |
| <i>S. suis</i> type 14 (n)  | 1:2.5:0.8:1.0:0.0              | 500                | 0.7                                  | NS                             |
| <i>S. suis</i> type 14 (dS) | 1:2.5:0.8:1.0:0.0              | 176                | 0.7                                  | NS                             |
| GBS type III (n)            | 1:1.5:1.0:0.9:0.0              | 108                | 0.8                                  | NS                             |
| GBS type III (dS)           | 1:1.5:1.0:0.9:0.0              | 59                 | 0.8                                  | NS                             |
| GBS type V (n)              | 3:1.5:0.8:0.8:0.0              | 128                | 0.9                                  | NS                             |
| GBS type V (dS)             | 3:1.5:0.8:0.8:0.0              | 91                 | 0.9                                  | NS                             |

<sup>a</sup> n, native; dS, desialylated.

<sup>b</sup> Determined by GC after methanolysis and acetylation and shown in the order glucose: galactose:*N*-acetylglucosamine:*N*-acetylneuraminic acid:rhamnose.

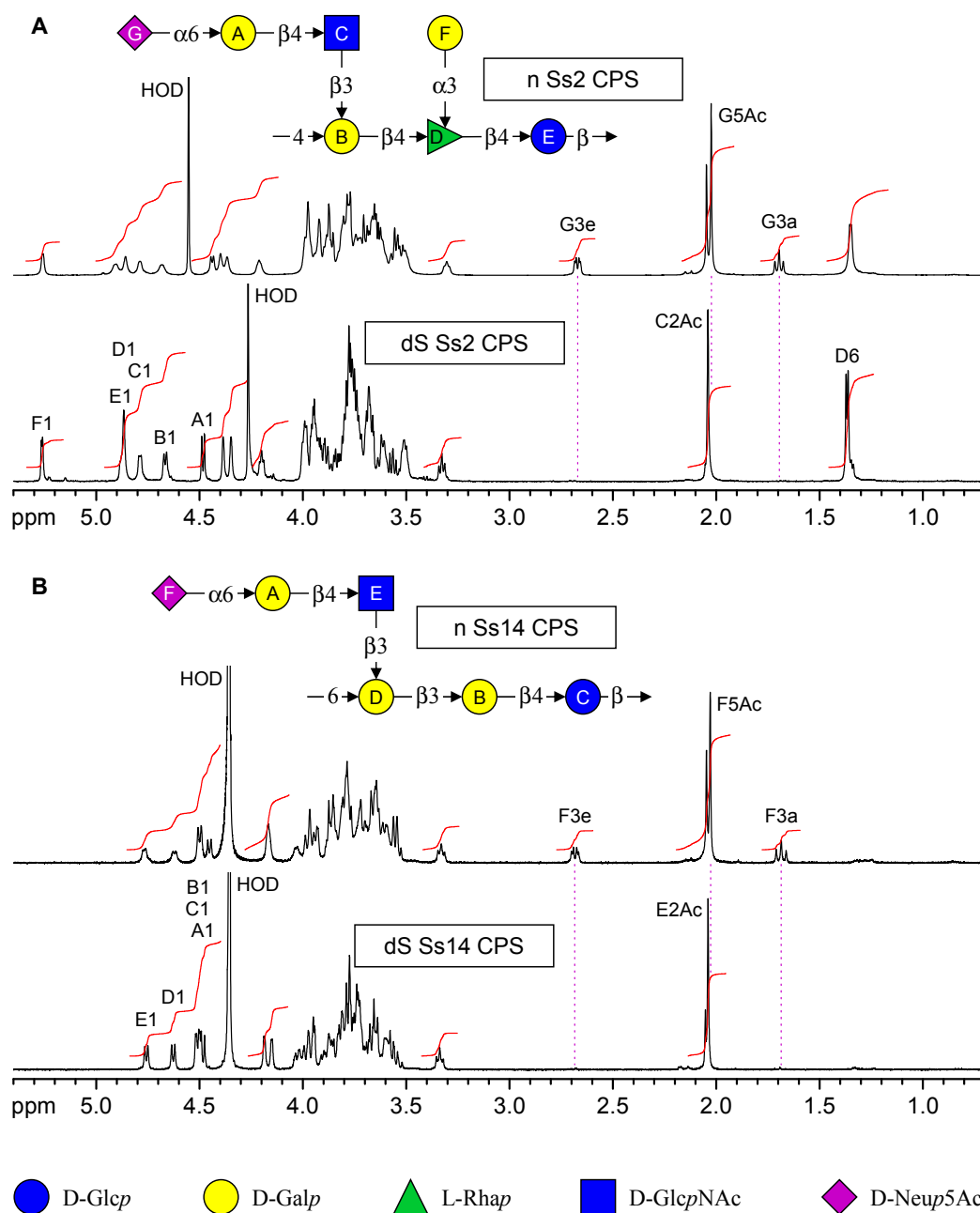
<sup>c</sup> Determined by SEC-MALS (expressed in kg/mol).

<sup>d</sup> Determined by spectrophotometry at 230 and 260 nm.

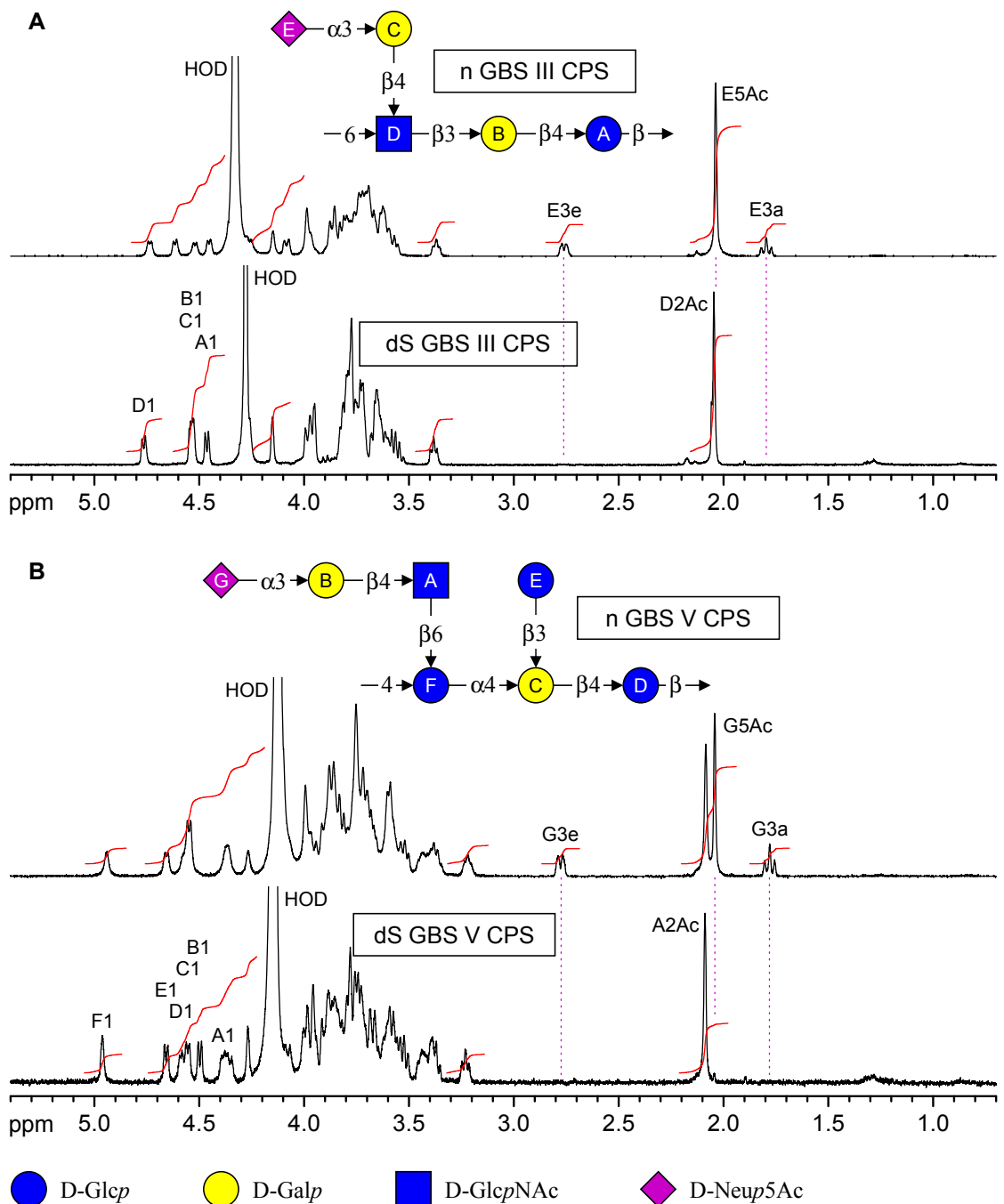
<sup>e</sup> Determined by spectrophotometry at 750 nm. NS, nonsignificant (under the limit of detection).

<sup>f</sup> See Materials and Methods for more details.





**Figure S1. Nuclear magnetic resonance spectra of native and desialylated *S. suis* capsular polysaccharides.** 600-MHz  $^1\text{H}$  NMR spectra of native *S. suis* type 2 (n Ss2) CPS (top) and desialylated *S. suis* type 2 (dS Ss2) CPS (bottom) (A). 500-MHz  $^1\text{H}$  NMR spectra of native *S. suis* type 14 (n Ss14) CPS (top) and desialylated *S. suis* type 14 (dS Ss14) CPS (bottom) (B). See Materials and Methods section for more details.



**Figure S2. Nuclear magnetic resonance spectra of native and desialylated GBS capsular polysaccharides.** 500-MHz  $^1\text{H}$  NMR spectra of native (n) GBS type III CPS (top) and desialylated (dS) GBS III CPS (bottom) (A). 500-MHz  $^1\text{H}$  NMR spectra of native (n) GBS type V CPS (top) and desialylated (dS) GBS V CPS (bottom) (B). See Materials and Methods section for more details.

**TABLE SI. Sequences of murine-specific real-time PCR primers.**

| Name  | Accession number | Forward               | Reverse              |
|-------|------------------|-----------------------|----------------------|
| BAFF  | NM_033622        | TGACCCTGTTCCGATGTATTC | TCCAGCAAGTGAGTTACAGC |
| ATP5B | NM_016774        | ACCAGCCCACCCTAGCCACC  | TGCAGGGGCAGGGTCAGTCA |
| CYC1  | NM_025567        | CGTATTTTCCCTGCTCACTG  | GCGACATCCTTAGCTACTTG |

<sup>a</sup> Oligonucleotide primers were from Integrated DNA Technologies.

## References

1. **Edwards MS, Baker CJ.** 2005. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin. Infect. Dis.* **41**:839-847.
2. **Koenig JM, Keenan WJ.** 2009. Group B *Streptococcus* and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatr. Clin. North Am.* **56**:689-708.
3. **Blumberg HM, Stephens DS, Modansky M, Erwin M, Elliot J, Facklam RR, Schuchat A, Baughman W, Farley MM.** 1996. Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. *J. Infect. Dis.* **173**:365-373.
4. **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.
5. **Segura M.** 2009. *Streptococcus suis*: an emerging human threat. *J. Infect. Dis.* **199**:4-6.
6. **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.
7. **Kerdsin A, Oishi K, Sripakdee S, Boonkerd N, Polwichai P, Nakamura S, Uchida R, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S.** 2009. Clonal dissemination of human isolates of *Streptococcus suis* serotype 14 in Thailand. *J. Med. Microbiol.* **58**:1508-1513.
8. **Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, Rodrigues S, Fahey J, Wessels MR, Rubens CE.** 2005. Structural and genetic diversity of group B *Streptococcus* capsular polysaccharides. *Infect. Immun.* **73**:3096-3103.
9. **Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M.** 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol.* **7**:259-279.
10. **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.
11. **Van Calsteren MR, Calzas C, Goyette-Desjardins G, Okura M, Takamatsu D, Gottschalk M, Segura M.** 2013. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 14 capsular polysaccharide. *Biochem. Cell. Biol.* **91**:49-58.
12. **Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, Segura M.** 2011. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J. Infect. Dis.* **204**:919-929.
13. **Lemire P, Houde M, Lecours MP, Fittipaldi N, Segura M.** 2012. Role of capsular polysaccharide in group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells. *Microbes Infect.* **14**:1064-1076.
14. **Segura MA, Cleroux P, Gottschalk M.** 1998. *Streptococcus suis* and group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **21**:189-195.
15. **Lecours MP, Segura M, Lachance C, Mussa T, Surprenant C, Montoya M, Gottschalk M.** 2011. Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. *Vet. Res.* **42**:72.
16. **Takahashi S, Aoyagi Y, Adderson EE, Okuwaki Y, Bohnsack JF.** 1999. Capsular sialic acid limits C5a production on type III group B streptococci. *Infect. Immun.* **67**:1866-1870.
17. **Crocker PR, Paulson JC, Varki A.** 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:255-266.
18. **Chaffin DO, Mentele LM, Rubens CE.** 2005. Sialylation of group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by *cpsK* and is required for optimal capsule polymerization and expression. *J. Bacteriol.* **187**:4615-4626.
19. **Lecours MP, Fittipaldi N, Takamatsu D, Okura M, Segura M, Goyette-Desjardins G, Van Calsteren MR, Gottschalk M.** 2012. Sialylation of *Streptococcus suis* serotype 2 is essential for capsule expression but is not responsible for the main capsular epitope. *Microbes Infect.* **14**:941-950.
20. **Takeuchi O, Akira S.** 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**:805-820.
21. **Steinman RM.** 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:271-296.

22. **Mond JJ, Vos Q, Lees A, Snapper CM.** 1995. T cell independent antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **7**:349-354.
23. **Weintraub A.** 2003. Immunology of bacterial polysaccharide antigens. *Carbohydr. Res.* **338**:2539-2547.
24. **Simpson SQ, Singh R, Bice DE.** 1994. Heat-killed pneumococci and pneumococcal capsular polysaccharides stimulate tumor necrosis factor- $\alpha$  production by murine macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **10**:284-289.
25. **Wang Q, McLoughlin RM, Cobb BA, Charrel-Dennis M, Zaleski KJ, Golenbock D, Tzianabos AO, Kasper DL.** 2006. A bacterial carbohydrate links innate and adaptive responses through Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* **203**:2853-2863.
26. **d'Empaire G, Baer MT, Gibson FC 3rd.** 2006. The K1 serotype capsular polysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* elicits chemokine production from murine macrophages that facilitates cell migration. *Infect. Immun.* **74**:6236-6243.
27. **Zughaier SM.** 2011. *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharides induce inflammatory responses via TLR2 and TLR4-MD-2. *J. Leukoc. Biol.* **89**:469-480.
28. **Soell M, Diab M, Haan-Archipoff G, Beretz A, Herbelin C, Poutrel B, Klein JP.** 1995. Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. *Infect. Immun.* **63**:1380-1386.
29. **Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A.** 2002. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat. Immunol.* **3**:822-829.
30. **Craxton A, Magaletti D, Ryan EJ, Clark EA.** 2003. Macrophage- and dendritic cell-dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF. *Blood* **101**:4464-4471.
31. **Jacques M, Gottschalk M, Foiry B, Higgins R.** 1990. Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J. Bacteriol.* **172**:2833-2838.
32. **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.
33. **Kuypers JM, Heggen LM, Rubens CE.** 1989. Molecular analysis of a region of the group B *Streptococcus* chromosome involved in type III capsule expression. *Infect. Immun.* **57**:3058-3065.
34. **Michon F.** June 2001. Procedures for the extraction and isolation of bacterial capsular polysaccharides for use as vaccines or linked to proteins as conjugate vaccines. US patent 6,248,570 B1.
35. **Brandrup J, Immergut EH, Grulke EA.** 2005. Polymer handbook, 4th ed. John Wiley & Sons, New York, NY.
36. **Gornik O, Lauc G.** 2007. Enzyme linked lectin assay (ELLA) for direct analysis of transferrin sialylation in serum samples. *Clin. Biochem.* **40**:718-723.
37. **Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans WJ.** 1987. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac( $\alpha$ 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J. Biol. Chem.* **262**:1596-1601.
38. **Geisler C, Jarvis DL.** 2011. Effective glycoanalysis with *Maackia amurensis* lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology* **21**:988-993.
39. **Miller RL, Collawn JF Jr, Fish WW.** 1982. Purification and macromolecular properties of a sialic acid-specific lectin from the slug *Limax flavus*. *J. Biol. Chem.* **257**:7574-7580.
40. **Charland N, Jacques M, Lacouture S, Gottschalk M.** 1997. Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 1/2. *Microbiology* **143**:3607-3614.
41. **Higgins R, Gottschalk M.** 1990. An update on *Streptococcus suis* identification. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2**:249-252.
42. **Segura M, Su Z, Piccirillo C, Stevenson MM.** 2007. Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: a potential mechanism for nematode-induced immunosuppression. *Eur. J. Immunol.* **37**:1887-1904.
43. **van den Berg TK, Kraal G.** 2005. A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. *Trends Immunol.* **26**:506-509.
44. **MacDonald AS, Straw AD, Bauman B, Pearce EJ.** 2001. CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. *J. Immunol.* **167**:1982-1988.

45. **Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G.** 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* **223**:77-92.
46. **Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* **25**:402-408.
47. **Deng L, Kasper DL, Krick TP, Wessels MR.** 2000. Characterization of the linkage between the type III capsular polysaccharide and the bacterial cell wall of group B *Streptococcus*. *J. Biol. Chem.* **275**:7497-7504.
48. **Gonzalez-Outeirino J, Kadirvelraj R, Woods RJ.** 2005. Structural elucidation of type III group B *Streptococcus* capsular polysaccharide using molecular dynamics simulations: the role of sialic acid. *Carbohydr. Res.* **340**:1007-1018.
49. **Guttormsen HK, Paoletti LC, Mansfield KG, Jachymek W, Jennings HJ, Kasper DL.** 2008. Rational chemical design of the carbohydrate in a glycoconjugate vaccine enhances IgM-to-IgG switching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:5903-5908.
50. **Jennings HJ, Lugowski C, Kasper DL.** 1981. Conformational aspects critical to the immunospecificity of the type III group B streptococcal polysaccharide. *Biochemistry* **20**:4511-4518.
51. **Knibbs RN, Goldstein IJ, Ratcliffe RM, Shibuya N.** 1991. Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leucoagglutinating lectin from *Maackia amurensis*. Comparison with other sialic acid-specific lectins. *J. Biol. Chem.* **266**:83-88.
52. **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.
53. **Lecours MP, Segura M, Fittipaldi N, Rivest S, Gottschalk M.** 2012. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS One* **7**:e44746.
54. **Draper DW, Bethea HN, He YW.** 2006. Toll-like receptor 2-dependent and -independent activation of macrophages by group B streptococci. *Immunol. Lett.* **102**:202-214.
55. **Henneke P, Takeuchi O, van Strijp JA, Guttormsen HK, Smith JA, Schromm AB, Espevik TA, Akira S, Nizet V, Kasper DL, Golenbock DT.** 2001. Novel engagement of CD14 and multiple toll-like receptors by group B streptococci. *J. Immunol.* **167**:7069-7076.
56. **Um SH, Rhee DK, Pyo S.** 2002. Involvement of protein kinase C and tyrosin kinase in tumoricidal activation of macrophage induced by *Streptococcus pneumoniae* type II capsular polysaccharide. *Int. Immunopharmacol.* **2**:129-137.
57. **Kanswal S, Katsenelson N, Allman W, Uslu K, Blake MS, Akkoyunlu M.** 2011. Suppressive effect of bacterial polysaccharides on BAFF system is responsible for their poor immunogenicity. *J. Immunol.* **186**:2430-2443.
58. **Kim HA, Jeon SH, Seo GY, Park JB, Kim PH.** 2008. TGF- $\beta$ 1 and IFN- $\gamma$  stimulate mouse macrophages to express BAFF via different signaling pathways. *J. Leukoc. Biol.* **83**:1431-1439.
59. **Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, Moore PA, Olsen HS, Migone TS, Sosnovtseva S, Carrell JA, Feng P, Giri JG, Hilbert DM.** 2001. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood* **97**:198-204.
60. **Courtney AH, Puffer EB, Pontrello JK, Yang ZQ, Kiessling LL.** 2009. Sialylated multivalent antigens engage CD22 *in trans* and inhibit B cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:2500-2505.
61. **Elliott SD, Clifton-Hadley F, Tai J.** 1980. Streptococcal infection in young pigs. V. An immunogenic polysaccharide from *Streptococcus suis* type 2 with particular reference to vaccination against streptococcal meningitis in pigs. *J. Hyg. (Lond)* **85**:275-285.
62. **Baums CG, Kock C, Beineke A, Bennecke K, Goethe R, Schroder C, Waldmann KH, Valentin-Weigand P.** 2009. *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9. *Clin. Vaccine Immunol.* **16**:200-208.
63. **del Campo Sepulveda EM, Altman E, Kobisch M, D'Allaire S, Gottschalk M.** 1996. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. *Vet. Microbiol.* **52**:113-125.

64. **Heath PT.** 2011. An update on vaccination against group B *Streptococcus*. *Expert. Rev. Vaccines* **10**:685-694.
65. **Baker CJ, Kasper DL.** 1976. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *N. Engl. J. Med.* **294**:753-756.
66. **Avci FY, Kasper DL.** 2010. How bacterial carbohydrates influence the adaptive immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **28**:107-130.
67. **Wessels MR, Paoletti LC, Rodewald AK, Michon F, DiFabio J, Jennings HJ, Kasper DL.** 1993. Stimulation of protective antibodies against type Ia and Ib group B streptococci by a type Ia polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *Infect. Immun.* **61**:4760-4766.
68. **Finne J, Leinonen M, Makela PH.** 1983. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* **2**:355-357.
69. **Moe GR, Bhandari TS, Flitter BA.** 2009. Vaccines containing de-N-acetyl sialic acid elicit antibodies protective against *Neisseria meningitidis* groups B and C. *J. Immunol.* **182**:6610-6617.
70. **Meijerink M, Ferrando ML, Lammers G, Taverne N, Smith HE, Wells JM.** 2012. Immunomodulatory effects of *Streptococcus suis* capsule type on human dendritic cell responses, phagocytosis and intracellular survival. *PLoS One* **7**:e35849.
71. **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.
72. **Segura M, Stankova J, Gottschalk M.** 1999. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infect. Immun.* **67**:4646-4654.
73. **Vallejo JG, Baker CJ, Edwards MS.** 1996. Roles of the bacterial cell wall and capsule in induction of tumor necrosis factor alpha by type III group B streptococci. *Infect. Immun.* **64**:5042-5046.
74. **Vallejo JG, Baker CJ, Edwards MS.** 1996. Interleukin-6 production by human neonatal monocytes stimulated by type III group B streptococci. *J. Infect. Dis.* **174**:332-337.
75. **Meltzer U, Goldblatt D.** 2006. Pneumococcal polysaccharides interact with human dendritic cells. *Infect. Immun.* **74**:1890-1895.
76. **Kocabas C, Katsenelson N, Kanswal S, Kennedy MN, Cui X, Blake MS, Segal DM, Akkoyunlu M.** 2007. *Neisseria meningitidis* type C capsular polysaccharide inhibits lipooligosaccharide-induced cell activation by binding to CD14. *Cell. Microbiol.* **9**:1297-1310.
77. **Carlin AF, Uchiyama S, Chang YC, Lewis AL, Nizet V, Varki A.** 2009. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood* **113**:3333-3336.
78. **Ando M, Tu W, Nishijima K, Iijima S.** 2008. Siglec-9 enhances IL-10 production in macrophages via tyrosine-based motifs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**:878-883.
79. **Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE.** 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J. Interferon Cytokine Res.* **29**:313-326.
80. **Maurer M, von Stebut E.** 2004. Macrophage inflammatory protein-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**:1882-1886.
81. **Lahrtz F, Piali L, Spanaus KS, Seebach J, Fontana A.** 1998. Chemokines and chemotaxis of leukocytes in infectious meningitis. *J. Neuroimmunol.* **85**:33-43.
82. **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.
83. **Okazaki K, Kondo M, Kato M, Nishida A, Takahashi H, Noda M, Kimura H.** 2008. Temporal alterations in concentrations of sera cytokines/chemokines in sepsis due to group B *Streptococcus* infection in a neonate. *Jpn. J. Infect. Dis.* **61**:382-385.
84. **Fan H, Williams DL, Zingarelli B, Breuel KF, Teti G, Tempel GE, Spicher K, Boulay G, Birnbaumer L, Halushka PV, Cook JA.** 2007. Differential regulation of lipopolysaccharide and Gram-positive bacteria induced cytokine and chemokine production in macrophages by Gα<sub>i</sub> proteins. *Immunology* **122**:116-123.

85. **Lemire P, Houde M, Segura M.** 2012. Encapsulated group B *Streptococcus* modulates dendritic cell functions via lipid rafts and clathrin-mediated endocytosis. *Cell Microbiol.* **14**:1707-1719.
86. **Mogensen TH, Paludan SR, Kilian M, Ostergaard L.** 2006. Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *J. Leukoc. Biol.* **80**:267-277.
87. **Mitchell D, Olive C.** 2010. Regulation of Toll-like receptor-induced chemokine production in murine dendritic cells by mitogen-activated protein kinases. *Mol. Immunol.* **47**:2065-2073.
88. **Zamze S, Martinez-Pomares L, Jones H, Taylor PR, Stillion RJ, Gordon S, Wong SY.** 2002. Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *J. Biol. Chem.* **277**:41613-41623.
89. **Moon EY, Lee JH, Oh SY, Ryu SK, Kim HM, Kwak HS, Yoon WK.** 2006. Reactive oxygen species augment B-cell-activating factor expression. *Free Radic. Biol. Med.* **40**:2103-2111.
90. **Segura M, Gottschalk M, Olivier M.** 2004. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infect Immun* **72**:5322-5330
91. **Houde M, Gottschalk M, Gagnon F, Van Calsteren MR, Segura M.** 2012. *Streptococcus suis* capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition. *Infect Immun* **80**:506-517.



## ARTICLE II

# Antibody response specific to the capsular polysaccharide is impaired in *Streptococcus suis* serotype 2-infected animals

Cynthia Calzas<sup>a</sup>, Paul Lemire<sup>a</sup>, Gael Auray<sup>a</sup>, Volker Gerdt<sup>b</sup>, Marcelo Gottschalk<sup>a</sup>, Mariela Segura<sup>b</sup>

Laboratory of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada<sup>a</sup>; Vaccine and Infectious Disease Organization (VIDO) and Department of Veterinary Microbiology, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatchewan, Canada<sup>b</sup>

Publié dans: *Infect Immun.* **2015.** 83(1):441-53.

doi: 10.1128/IAI.02427-14.

### Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

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

## Abstract

*Streptococcus suis* serotype 2 is an extracellular encapsulated bacterium that causes severe septicemia and meningitis in swine and humans. Albeit crucial in the fight against encapsulated bacteria, the nature of the capsular polysaccharide (CPS)-specific antibody (Ab) response during *S. suis* type 2 infection is unknown. We compared for the first time the features of CPS-specific *versus* protein-specific Ab responses during experimental infections with live virulent *S. suis* type 2 in mice. The primary protein-specific Ab response was dominated by both type 1 and 2 IgG subclasses, whereas IgM titers were more modest. The secondary protein-specific Ab response showed all the features of a memory response with faster kinetics and boosted the titers of all Ig isotypes. In contrast, the primary CPS-specific Ab response was either inexistent or had titers only slightly higher than those in noninfected animals and was essentially composed of IgM. A poor CPS-specific memory response was observed, with only a moderate boost in IgM titers and no IgG. Both protein- and CPS-specific Ab responses were Toll-like receptor 2-independent. By using *S. suis* type 2 strains of European or North American origin, the poor CPS-specific Ab response was demonstrated to be independent of the genotypic/phenotypic diversity of the strain within serotype 2. Finally, the CPS-specific Ab response was also impaired and lacked isotype switching in *S. suis*-infected pigs, the natural host of the bacterium. The better resistance of pre-infected animals to re-infection with the same strain of *S. suis* type 2 might thus be more likely be related to the development of a protein- rather than CPS-Ab response.

## Introduction

*Streptococcus suis* is an encapsulated extracellular bacteria that causes severe septicemia with sudden death, meningitis, endocarditis, pneumonia, and arthritis in pigs and thus is responsible for important economic losses in the swine industry. It is also an emerging zoonotic pathogen in humans, with deadly outbreaks reported in Asian countries (1, 2). Of the 35 capsular types described, type 2 is the most virulent and is frequently isolated from both swine and humans (3). The capsular polysaccharide (CPS) is considered a critical virulence factor through its strong anti-phagocytic effect (4-7). The structure of *S. suis* type 2 CPS is composed of the monosaccharides glucose, galactose, *N*-acetylglucosamine and rhamnose arranged into a unique repeating unit that contains a side chain terminated by sialic acid (8). Albeit there is a common CPS structure within serotype 2 strains, very distinct genotypic/phenotypic differences are observed in subcapsular components in terms of the geographic origin of the strains, mainly between Eurasian and North American strains (3).

Adaptive immunity to encapsulated extracellular bacteria is mediated largely by humoral response (9, 10). The efficacy of protection of the different immunoglobulin (Ig) classes during bacterial infection is depending on the specificity and affinity with the targeted antigen and on their biological functions. In mice, IgG2b, IgG2c and IgG3, called “type 1 IgG subclasses” because they are associated with gamma interferon (IFN- $\gamma$ )-dominant Th1 immune responses, are particularly effective at mediating bacterial lysis by triggering the complement cascade directly at the surface of the pathogen or by favoring bacterial opsonophagocytosis (11-14). In contrast, IgG1 (called the “type 2 IgG subclass”) elicited during IL-4-dominant Th2 immune responses, usually has a less protective potential. Although the concept of type 1 or type 2 IgG subclasses is not well documented for pigs, recent studies have showed that porcine IgG2 had greater complement-activating capacity than IgG1 (15, 16).

Even if both protein- and CPS-specific antibodies (Abs) are known to participate in protection against extracellular encapsulated bacteria (9, 10), features of the Ab responses specific to these two different antigens have been mainly elucidated by studies using isolated, purified molecules. In contrast to protein-specific response, the CPS-specific Ab response is more rapid, shows limited generation of memory or affinity maturation, and presents a more restricted Ig isotype profile (17). However, the characteristics of the CPS-specific response to whole encapsulated bacteria, where

CPS is associated with surface components of the bacteria, such as cell wall polysaccharides, proteins and lipids, are not well known and seem to differ between pathogens. *In vivo* immunization experiments in mice have revealed that the primary CPS-specific Ab response against intact *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* or *Group B Streptococcus* (GBS) comprised IgM as well as all four IgG subclasses. However, kinetics of the response was faster with *S. pneumoniae* and GBS than with *N. meningitidis*. Moreover, in contrast to *N. meningitidis* and GBS, no memory anti-CPS IgG response was observed after a second immunization with *S. pneumoniae* (18-20). Thus, it was proposed that differences in underlying subcapsular bacterial domains differentially regulate the CPS-specific Ab response (19, 20). Nevertheless, killed (18-20) or non-lethal (21) doses of live bacteria were used in those studies, which did not allow conclusions to be drawn about the features of Ab responses during a clinical infection.

Previous reports have demonstrated that specific humoral response could play an important role in host survival to *S. suis* type 2 infection. Passive transfer with pig or rabbit hyperimmune sera allowed protection of pigs and mice against homologous *S. suis* type 2 challenge (22-24). However, the specific contribution of Abs directed against CPS or other bacterial components in protection remains unclear. Others studies have shown that the CPS had, as an immunogen, a high protective potential in the fight against infection by *S. suis* type 2. Mouse or pig polyclonal sera against *S. suis* type 2 CPS had a protective role in opsonophagocytosis *in vitro* assays (25-27), and passive transfer of anti-*S. suis* type 2 CPS monoclonal Ab allowed mice to resist against *in vivo* challenge (27). However, the kinetics and nature of the anti-CPS or the anti-protein specific response during *S. suis* clinical infection have never been characterized (28).

Toll-like receptors (TLRs) play a crucial role in detecting the presence of pathogens and are important for the initiation of the immune response as well as the shaping of adaptive immunity (29). Among TLRs, TLR2 is mainly involved in immune responses against cell-wall components derived from Gram-positive bacteria (30), but some experiments have demonstrated its role in immune responses against CPS as well (31-34). Whereas involvement of TLR2 in innate immune response against bacteria is well established (35, 36), few studies have proven its participation in adaptive humoral response. Immunization experiments of mice with glycoconjugate vaccine derived from *Haemophilus influenzae* established a role of the receptor in mediating both CPS- and protein-specific Ab responses (37), and mice genetically

deficient in TLR2 elicited lower protein- and CPS-specific type 1 IgG responses relative to control mice during primary and/or secondary immunizations with whole killed *S. pneumoniae* (18).

Earlier reports have concluded that TLR2 plays a dominant role in the induction of innate immunity in response to *S. suis* type 2. *In vitro* interactions of the bacteria with mouse, swine or human cells induced production of cytokines, chemokines and expression of costimulatory molecules and major histocompatibility complex class II in a TLR2-dependent manner (7, 38, 39). Moreover, the *in vivo* contribution of TLR2 to the expression and production of cytokines and chemokines has been recently observed in a mouse model of *S. suis* type 2 experimental infection (40). However, the contribution of TLR2 to the adaptive immunity and in particular to the humoral response against *S. suis* type 2 has never been studied. Several components from Gram-positive bacteria, such as lipoproteins, lipoteichoic acid and CPS, are known to be perceived by TLR2 (33, 34, 41) and are expressed by *S. suis* type 2 (42). Whereas chemokine production by murine DCs stimulated with highly purified *S. suis* type 2 CPS has been demonstrated to be partially TLR2-dependent (34), the involvement of non-capsular antigens in *S. suis* type 2 recognition by TLR2 is still unknown. Yet, recent studies have determined that cell wall components and lipoproteins (39, 43, 44) may be such candidates.

The main goal of this study was thus to evaluate for the first time the kinetics, magnitude and isotype profile of CPS-specific Ab responses during primary and secondary experimental infections with live cells of virulent strains of *S. suis* type 2. In addition, the influence of distinct underlying subcapsular bacterial domains on the anti-CPS response was evaluated using two phenotypically very different serotype 2 strains. The features of the antiprotein responses were also analyzed and compared to those of the anti-CPS response. Finally, the involvement of TLR2 in the primary anti-*S. suis* adaptive response was evaluated using mice genetically deficient for this receptor. Features of the specific Ab responses obtained in mice were compared to those obtained after experimental infection in pigs, the *S. suis* natural host.

## Materials and Methods

### *S. suis* strains and growth conditions

Encapsulated *S. suis* type 2 strains P1/7 (45) and 89-1591 (46), isolated from pigs with meningitis in Europe (United Kingdom) and North America (Canada), respectively, were used for experimental infections. Non-encapsulated mutant  $\Delta cpsF$  derived from P1/7 (5) and M2 derived from 89-1591 (46) were used as coating for ELISA evaluation of non-capsular, mainly protein-specific Ab response (see below). Bacteria were grown as previously described (47). Briefly, bacteria were grown overnight (O/N) onto sheep blood agar plates at 37°C and isolated colonies were cultured in 5 ml of Todd-Hewitt broth (THB; Becton Dickinson) for 8 h at 37°C. Then, 10  $\mu$ l of 1/1000 dilutions of 8 h-cultures were transferred into 30 ml of THB and incubated for 16 h at 37°C. Stationary phase bacteria were washed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.3). Bacterial pellet was then resuspended in vehicle solution and adjusted to the desired concentrations. Aliquots of final bacterial suspension were plated using an Autoplate 4000 automated spiral plater (Spiral Biotech) onto sheep blood agar plates and colonies were accurately counted after O/N incubation at 37°C.

### *Mice and experimental infections*

Wild type (WT) 5-week-old female C57BL/6J mice or TLR2<sup>-/-</sup> (B6.129-*Tlr2*<sup>tm1Kir/J</sup>) mice from Jackson Laboratory were acclimatized to standard laboratory conditions with free access to water and rodent chow. The study was conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* by the Animal Welfare Committee of the Université de Montréal. For the study of primary adaptive immune responses, WT and TLR2<sup>-/-</sup> mice were infected with 1 ml of a suspension of 2 x 10<sup>7</sup> CFU live *S. suis* type 2 strain P1/7 administrated by intraperitoneal (i.p.) injection at day 0. Negative control mice were injected with vehicle solution (sterile THB). Optimal bacterial dose was determined in standardization pre-trials in WT mice (data not shown) and based on previous studies with TLR2<sup>-/-</sup> mice (40). At days 7, 14 and 21 post-infection mice were euthanized and sera collected and frozen at -80°C for ELISA Ig titration. For the study of memory adaptive immune responses, WT mice received an i.p. injection of 1 ml of a suspension of 2 x 10<sup>7</sup> CFU live *S. suis* type 2 strain P1/7 at day 0. Surviving mice were challenged i.p. with 1 ml of 5 x 10<sup>7</sup> CFU at day 21. Negative control mice were similarly injected with vehicle solution. Challenge control

mice (no primary infection) received THB at day 0 and 1 ml of  $5 \times 10^7$  CFU at day 21. Mortality levels were recorded during the first week post-challenge. At days 28, 35 and 42, surviving mice were euthanized and sera were frozen after collection. In some experiments, primary and memory responses were evaluated in WT mice infected with live *S. suis* type 2 strain 89-1591 following the same protocol described above. ELISA Ig titration was performed from blood samples collected from the tail vein of each mouse. Numbers of animals included in experimental groups are detailed in figure legends.

#### *Measurement of blood bacteremia and clinical parameters of disease in mice*

Infected mice were monitored three times daily for mortality, clinical signs of systemic disease, such as rough hair coat, swollen/closed eyes, ocular oedema, hunchback, depression, lethargy; and symptoms of meningitis such as spatial disorientation, hyperexcitation/opisthotonos or circular walk with head towards one side. Blood bacterial loads were assessed in WT and TLR2<sup>-/-</sup> mice by collecting a 5 µl blood sample from the tail daily up to day 4 post-infection. Proper dilutions were plated and bacterial numbers counted as described above.

#### *Pigs and experimental infection*

Five-week old Dutch Landrace pigs were purchased from porcine reproductive and respiratory syndrome virus-free herds from Prairie Swine Center, University of Saskatchewan. The herd was considered free from endemic diseases caused by *S. suis*. *S. suis* serotype 2 could not be detected by PCR from nasal swabs of any of the animals used (48). The study was conducted in accordance with the ethical guidelines of the University of Saskatchewan and the Canadian Council of Animal Care. One hour after the nasal cavity was treated with a 1% acetic acid solution, animals were infected intranasally with 2 ml equivalent to  $4 \times 10^9$  CFU of live *S. suis* strain 89-1591. Negative control pigs were administered with vehicle solution (sterile PBS). Optimal route of infection and bacterial dose were determined in standardization pre-trials (data not shown). Clinical signs (fever, attitude, locomotion, lameness) and mortality were monitored throughout the experiment. At days 7, 21 and 35 post-infection, a serum sample was collected from each animal and frozen at -80°C for ELISA Ig titration. The animals were euthanized on day 35 post-infection. Numbers of animals included in experimental groups are detailed in figure legends.

### *Titration of protein- and CPS-specific Abs of mice and pigs.*

Specific Ab titers were determined by indirect ELISA as described below.

**I. Titration of protein-specific Abs.** Polysorb immunoplates (Nunc) were coated with 100  $\mu$ l/well of non-encapsulated mutants  $\Delta$ *cpsF* or M2 ( $10^7$  CFU/ml in water) for titration of Abs in animals infected with strain P1/7 and 89-1591, respectively. Albeit a response to other cell wall components might be detected, proteins are the dominant antigens present at the surface of non-encapsulated mutants and thus the detected response in the ELISA is labelled as “anti-protein” throughout the study for matter of simplicity. Plates were dried during 2 days, and 50  $\mu$ l per well of 100% methanol were added. After evaporation of methanol, plates were stored at room temperature (RT) until utilization. For titration of pig Abs, after washes with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T), the plates were blocked with 2% skim milk in PBS-T for 1 h at RT. Mouse or pig sera were then serially diluted (two-fold) in PBS-T (starting with a dilution of 1/50) and incubated 1 h at RT. Plates were then washed in PBS-T. For titration of mouse Abs, plates were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse total Ig [IgG+IgM] (Jackson ImmunoResearch), IgM, IgG1, IgG2b, IgG2c or IgG3 (Southern Biotech) Abs for 1 h at RT. For titration of pig total Ig [IgG+IgM] or IgM, plates were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-pig total Ig [IgG+IgM] (Jackson ImmunoResearch) or IgM (Serotec) Abs 1 h at RT. For pig IgG1 or IgG2 detection, mouse anti-pig IgG1 or IgG2 (Serotec) was added 1 h at RT. After washing, peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Serotec) Abs was added 1 h at RT. Plates were developed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate and the enzyme reaction was stopped by addition of 0.5 M  $H_2SO_4$ . Absorbance was read at 450 nm with an ELISA plate reader. The reciprocal of the last serum dilution that resulted in an optical density ( $OD_{450\text{ nm}}$ ) equal or lower of 0.2 (cutoff) was considered the titer of that serum. When the  $OD_{450\text{ nm}}$  of the first dilution of a serum was lower than the cutoff, its titer was arbitrary fixed to 50.

**II. Titration of CPS-specific Abs.** Polysorb immunoplates were coated with highly purified CPS produced as previously described from *S. suis* type 2 reference strain S735 (ATCC 43765) (34). A solution of 2  $\mu$ g/ml of CPS in carbonate buffer 0.1 M, pH 9.6 (100  $\mu$ l/well) was added O/N at 4°C. Free sites were then blocked 1 h at RT with 1% BSA in PBS or 2% skim milk in PBS-T before addition of mouse or pig serum dilutions, respectively. CPS-specific Ab titers were determined as described above.



To control inter-plate variations, we added an internal reference positive control to each plate. For titration of mouse Abs, this control was a pool of sera from mice hyperimmunized with  $10^9$  CFU of killed *S. suis* type 2 in TiterMax® Gold adjuvant (Sigma). For titration of pig Abs, this control was a serum of a pig hyperimmunized with  $10^8$  CFU of live *S. suis* type 2 strain 89-1591. Reaction in TMB was stopped when an  $OD_{450\text{ nm}}$  of 1 was obtained for the positive control. Optimal dilutions of the coating antigen (bacteria or CPS), the positive internal control sera and the peroxidase conjugated anti-mouse or anti-pig Abs were determined during preliminary standardizations.

### *Statistical analysis*

Ab titer data were analyzed for significance using analysis of variance (ANOVA). The Kaplan-Meier method and log-rank Mantel-Cox tests were used to compare the survival rates of the studied groups. Correlation analyses were performed by the Spearman test. All analyses were done using the Sigma Plot System (v11.0; Systat Software). A  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

## Results

### *Different features of protein- and CPS-specific Ab responses of WT mice after primary infection with S. suis type 2*

In a first set of experiments, we infected WT mice ( $n = 62$ ) with *S. suis* type 2 European strain P1/7 to examine the features of the anti-protein and anti-CPS humoral responses specific to an intact, live extracellular bacteria. As shown in Fig. 1A, mortality of 40% was observed during the first 3 days post-infection and was associated with clinical signs of sepsis. The appearance of clinical signs of meningitis was observed in 14% of remaining infected mice between days 3 and 7 post-infection. The disease evolution was thus similar to previous studies (40, 47, 49). Blood bacterial loads were determined at days 1, 2, 3 and 4 post-infection. Bacteremia levels remained high between days 1 and 3, and started to decrease at day 4 post-infection (Fig. 1B).

The surviving mice were evenly distributed into three groups and euthanized at days 7, 14 and 21 post-infection for titration of specific serum Abs. This distribution was made based on bacteremia levels. That is mice with different levels of bacteremia were randomly euthanized at each time point to avoid interference of this parameter with kinetics of Ab levels. To study the potential differences in the characteristics of CPS- and protein-specific Ab responses to whole *S. suis* type 2, we have chosen purified CPS and whole non-encapsulated mutant of *S. suis* type 2 as representative target antigens. As shown in Fig. 2, there was a significant induction of total Ig [IgG+IgM] anti-protein response in infected mice as soon as day 7 post-infection and this response increased over time until day 21 ( $P < 0.05$  in comparison with day 7). When the nature of the different Ig isotypes and IgG subclasses induced by primary *S. suis* infection was explored in more details, a weak anti-protein IgM response was observed. In contrast, a significant increase of IgG1, IgG2b and IgG2c anti-protein titers was observed in infected *versus* non-infected mice. Finally, levels of IgG3 were also significantly higher than those of controls, yet titers were slightly lower than the other three IgG subclasses. Kinetics analysis showed that Ig class switching occurred early after infection, and the levels of the different IgG subclasses remained high over the 3 week-period.

Concerning CPS-specific Ab response (Fig. 3), infected mice presented a very weak increase in total Ig [IgG+IgM] titers in comparison with non-infected mice at day 14 and titers decreased at day 21 post-infection. Moreover, magnitude of total Ig [IgG+IgM] anti-CPS response in infected mice was 2-log fewer than anti-protein

counterpart. Indeed, whereas there was a 400-fold difference in peak of total Ig [IgG+IgM] anti-protein titers between infected mice and non-infected mice, an only 4-fold difference in CPS-specific Ab titers was observed between the two mouse groups. Finally, in terms of the difference of the protein-specific response, the CPS-specific response in infected mice was mainly composed of IgM, whose kinetics and magnitude were similar to those of the total Ig [IgG+IgM] anti-CPS response, as neither IgG1, IgG2b, IgG2c nor IgG3 was detected between days 7 and 21 post-infection (results not shown).

We also investigated if there was a correlation between Ab titers and bacteremia. Interestingly, there was a positive correlation between total Ig [IgG+IgM] anti-protein titers from day 7 to day 21 and bacteremia obtained at day 1 post-infection (Fig. 4). Similar results were obtained when bacteremia was correlated with total Ig [IgG+IgM] anti-protein titers of days 7, 14 or 21 taken separately. A positive correlation with bacteremia was obtained, at 6, 12 h and 48 h post-infection as well (data not shown). No correlation was found between anti-CPS Ab titers and bacteremia (data not shown).

In order to evaluate if the features of the anti-CPS Ab response observed during infection with *S. suis* type 2 strain P1/7 were specific of this strain or a more global pattern of the serotype 2, we have conducted experimental infections with *S. suis* type 2 North American strain 89-1591 in WT mice. Mortality of 50% was observed during the first week post-infection and was associated with clinical signs of sepsis or meningitis (Fig. 5A). High and globally homogenous blood bacteremia levels were detected in surviving mice during the first two days post-infection, and then decreased at day 3 post-infection (Fig. 5B). There was a significant induction of total Ig [IgG+IgM] anti-protein response in mice as soon as day 7 and until day 21 post-infection. This response was composed of low levels of IgM and high levels of both the type 1 and 2 IgG subclasses as shown for strain P1/7 (Fig. 5C and data not shown). In contrast to the anti-protein Ab response, and similar to what was shown after the P1/7 infection, we obtained very low IgM or IgG anti-CPS titers between days 7 and 21 post-infection (Fig. 5D). Thus, the low levels of CPS-specific Ab response observed after *S. suis* type 2 primary infection in mice seem to be independent of the bacterial strain used.

*Poor memory CPS-specific Ab response of WT mice after secondary infection with S. suis type 2*

In a second set of experiments, we aimed to determine the characteristics of specific Ab responses after secondary infection with *S. suis* type 2. WT mice were infected with  $2 \times 10^7$  CFU/ml of *S. suis* type 2 strain P1/7 and the surviving mice were challenged 3 weeks later with  $5 \times 10^7$  CFU/ml of the same strain. One day before challenge infection, total Ig [IgG+IgM] anti-protein and anti-CPS Abs were titrated from blood samples collected from the tail (this procedure does not require mouse euthanasia). The titers were similar to those obtained at day 21 during the first set of experiments described above (data not shown). As shown in Fig. 6, mice pre-infected with *S. suis* type 2 showed a significant increase in resistance to a second infection (mortality of 23%) in comparison with control mice (mortality of 70%). Of mice surviving to challenge infection, 27, 26 and 26 mice were euthanized for titration of specific serum Abs at days 28, 35 and 42, respectively. As shown in Fig. 2, the secondary protein-specific Ab response to *S. suis* type 2 in challenged mice showed features of a memory response. Indeed, titers of total Ig [IgG+IgM], IgM and all four IgG subclasses were induced more rapidly than after primary infection, with a peak at day 28 (that is only 1 week post-challenge infection). Moreover, at this time, the levels of total Ig [IgG+IgM], IgM and IgG subclasses were 10 to 20-fold higher than those obtained during primary response and remained significantly higher up to day 42.

Concerning CPS-specific Ab response after secondary infection, total Ig [IgG+IgM] titers of infected mice peaked at day 28 and remained constant up to day 42 in challenged mice (Fig. 3). An approximately 2-fold increase was observed between primary and secondary total Ig [IgG+IgM] anti-CPS titers. However, this secondary response was only constituted of IgM, which followed same kinetics and magnitude as secondary total Ig [IgG+IgM] anti-CPS response (Fig. 3). Indeed, neither type 1 nor type 2 anti-CPS IgG subclasses could be detected from days 28 to 42 in challenged mice. Similarly, whereas the secondary protein-specific Ab response to *S. suis* type 2 strain 89-1591 presented a faster kinetics with boosted titers of both IgM and type 1 and 2 IgG subclasses, the secondary CPS-specific Ab response showed only a moderate boost in IgM titers with no isotypic switching (Fig. 5C and 5D and data not shown).

To evaluate the role of TLR2 in specific humoral responses against *S. suis* type 2, mice ( $n = 50$ ) genetically deficient for this receptor were infected with *S. suis* type 2 strain P1/7 in parallel to the above described studies with WT mice. Mortality of 24% was observed during the first 4 days post-infection and was associated with clinical signs of sepsis. The appearance of clinical signs of meningitis was observed in 16% of remaining infected mice between days 6 to 7 post-infection. The absence of TLR2 improved protection against *S. suis* type 2 infection early during infection (until 5 days post-infection) as a statistically better survival was observed in TLR2<sup>-/-</sup> versus WT mice (Fig. 1A). There was no statistical difference in bacterial loads at 1, 2, 3 or 4 days post-infection between WT and TLR2<sup>-/-</sup> mice (Fig. 1B). These results are in accordance with a previous study (40). Based on bacteremia levels, surviving TLR2<sup>-/-</sup> mice were evenly distributed in three groups and euthanized at days 7, 14 and 21 post-infection for titration of specific serum Abs. Overall the nature of the protein-specific Ab response in TLR2<sup>-/-</sup> mice was similar to the observed response in WT mice in terms of Ab levels, kinetics and isotype switching (Fig. S1A).

Concerning the CPS-specific Ab response in TLR2<sup>-/-</sup> mice, the overall response was similar to that observed in WT mice, with a weak total Ig [IgG+IgM] response mainly composed of IgM as any of the four IgG subclasses could be measured from days 7 to 21 in TLR2<sup>-/-</sup> mice. No statistical difference in CPS-specific Ab response was observed between WT and TLR2<sup>-/-</sup> mice during the infection time (Fig. S1B).

As no role of TLR2 was observed during the course of a primary *S. suis* infection, the memory response was not evaluated in TLR2<sup>-/-</sup> mice.

*The CPS-specific Ab response after primary infection with S. suis type 2 is also impaired in the natural host, the pig*

In a last set of experiments, we aimed to determine if features of protein- and CPS-specific Ab responses to *S. suis* type 2 infection in mice were similarly observed in swine, the natural host of the bacterium. To this aim, pigs ( $n = 13$ ) were experimentally infected with *S. suis* type 2 strain 89-1591. Most animals developed fever. More than 60% of animals showed locomotion impairment and 30% of animals died or had to be euthanized due to very high clinical scoring. Blood samples were collected from 9 surviving infected pigs at days 7, 21 and 35 post-infection for titration

of specific Abs in serum. As shown in Fig. 7, there was an increase in total Ig [IgG+IgM] anti-protein titers at day 21 in infected *versus* non-infected pigs, which remained statistically higher up to day 35 post-infection. This response was composed of both IgG1 and IgG2 subclasses, with a significant increase compared to non-infected pigs at day 21 and day 35, respectively. No anti-protein specific Ab of the IgM isotype was observed in infected pigs. It should be noted that a high non-specific IgM background was observed in placebo-administrated (control) pigs. This background is probably due to cross-reactions with proteins expressed in non-serotype 2 *S. suis* strains or other species of streptococci probably present in the upper respiratory tract of these animals. Yet, the presence of cross-reactive proteins in the herd (and thus of potential cross-reactive memory B cells) does not seem to influence the features of the anti-protein Ab responses against *S. suis* type 2, as antiprotein IgG responses took at least 21 days before reaching significant titers compared to controls. This kinetics better embodies a primary response than a memory response.

Concerning CPS-specific Ab response, a statistically significant induction of total Ig [IgG+IgM] titers was observed in infected pigs at day 35 (Fig. 8). However, the magnitude of this response was very weak compared to non-infected animals, and neither IgG1 nor IgG2 could be detected. Indeed, this weak anti-CPS Ab response was mainly composed of the IgM isotype.

## Discussion

Humoral immunity is largely known to be the main mechanism of adaptive immunity for host protection against infections with extracellular bacteria. Via their biological functions of opsonophagocytosis and/or opsonolysis, specific Abs allow clearance of bacteria by the innate immune system. This is the rationale for the development of effective vaccines in humans against *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* and *H. influenza* in humans.

*S. suis* is one of the most important bacterial causes of septicemia and meningitis in swine worldwide. Moreover, due to an increase in the incidence and severity of *S. suis* infections in humans during the last decade, this pathogen is considered an important threat to human health, especially in Asia. However, no efficient vaccine against this extracellular bacterium is currently available. The vaccines used in the field are whole cell killed bacterins, and they provide limited protection. Live non-virulent mutants have been used with contradictory results (50). Although protein sub-unit vaccine candidates have been proposed, the high phenotypic and genotypic variation among strains in different parts of the world may preclude their use.

Host protection against infection caused by *S. suis* is known to be mediated primarily by opsonophagocytosis/killing (27, 51-53). Whereas published studies have evidenced the essential contribution of specific humoral immunity to the fight against *S. suis* (22-27, 54), no study has focused on the precise characteristics of protein- and CPS-specific responses after an infection with live *S. suis* type 2. Our study is thus the first to describe in details the kinetics, magnitude and isotype composition of protein- and CPS-specific Ab responses after primary and secondary infections with virulent strains of *S. suis* type 2. First, we have conducted experimental infections in mice, since the mouse model is well known to reproduce the clinical characteristics of infection observed in pigs (47, 49, 55). The protein-specific Ab response to *S. suis* type 2 showed typical features of a T-cell dependent response, similarly to what was observed after immunization with intact *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* and GBS cells (18-20). Indeed, the primary response was dominated by the IgG isotype, including both type 1 and 2 IgG subclasses, whereas IgM titers were more modest. The secondary IgG response showed all features of a memory response, with faster kinetics and 10 to 20-fold boosted titers of IgM and all four IgG subclasses. At the opposite end of the protein-specific response, CPS-specific Ab response to *S. suis* type 2 showed features of a T-

cell independent response. The primary CPS-specific Ab response was either nonexistent or had titers only slightly higher than those of the non-infected animals and was essentially composed of IgM. A modest memory anti-CPS IgM response was observed in *S. suis*-infected mice, yet no isotype switching was observed (see Table I for a summary). In contrast to our observations, other studies noticed an induction of CPS-specific IgG response after mouse immunization with killed *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* and GBS cells (18-20). Whereas the kinetics was faster after immunization with *S. pneumoniae* and GBS in comparison with *N. meningitidis*, the primary CPS-specific IgG response against the three bacteria was composed of both type 1 and type 2 IgG isotypes, with titers in the same range as those observed for the protein-specific IgG response (18-20). Moreover, a memory CPS-specific IgG response was observed after a second immunization with *N. meningitidis* and GBS, with faster kinetics and higher titers than during primary exposition to those pathogens.

Difference in the features of CPS-specific Ab response directed against whole *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, GBS and *S. suis* cells can be explained first by differences in immunostimulatory properties intrinsic to CPS due to differences in the biochemistry of CPS (56), such as variations in the structure (57, 58), molecular weight (59), charge characteristics (60) and ability to bind to specific receptors (61-63). The presence of sialic acid may also have a potential impact as this sugar is well known to interfere with the immune system by molecular mimicry and inhibition of complement activation (64, 65), and/or by interaction with the inhibitory CD22 receptor on B cells (66). It should be noted that in GBS CPS, sialic acid is  $\alpha$ 2,3 linked to adjacent galactose but in *S. suis* CPS is found in  $\alpha$ 2,6 linkage (34). CD22 binding affinity is  $\alpha$ 2,6-dependent. In this regard, no difference in primary and secondary CPS-specific IgG responses was observed after mouse immunization with mutant strain of GBS type III expressing desialylated CPS or with the WT strain (20). The different dynamics of infection in the mouse models used for each pathogen can also account for the observed differences.

In addition to CPS itself, it has been suggested that differences observed in CPS-specific Ab responses between encapsulated bacteria are due to variations in the underlying subcapsular bacterial domains when mice are immunized with killed bacteria (20). Our work used a clinical infection with live bacteria instead of killed bacteria, and thus our model also takes into account the influence of secreted components as well as antigens selectively expressed *in vivo*, which might have immunomodulatory properties. In this context, we have observed that CPS-specific Ab



responses after mouse infection with two different virulent strains of *S. suis* type 2 present similar features with a primary response characterized by low or absent Ab titers, the absence of an isotypic switch and a low or absent of memory response.

Interestingly, the characteristics of the primary *S. suis* CPS-specific Ab response observed in pigs were very similar to those obtained in mice, although the pigs presented lower Ab titers (Table I). Differences in the injection methods of the bacteria between mouse and pig models might have affected the kinetics of the Ab response; however the influence of the experimental administration route of *S. suis* on the humoral response has never been evaluated. Whereas the swine protein-specific response was mainly composed of both IgG1 and IgG2 subclasses, indicating a clear isotype switching, as observed in mice, the CPS-specific Ab response was extremely low and characterized by the lack of isotype switching. Similarly to our study, very weak total Ig [IgG+IgM] anti-CPS titers could be detected after primary as well as secondary infection of pigs with live virulent European reference strain S735 of *S. suis* type 2 (28). Thus, the present study suggests that *in vivo* CPS-specific Ab response to virulent *S. suis* type 2, in both mice and pigs, is independent of the genotypic/phenotypic diversity of the strain used during infection. In other words, concerning *S. suis* strains within serotype 2, the features of the Ab response specifically directed against CPS are not influenced by the composition and/or architecture of the bacterial subcapsular domain. In the light of this observation, it is very noteworthy that no primary CPS-specific Ab response was observed in mice after clinical infection with a live virulent strain of *S. suis* serotype 14, which also possesses an  $\alpha$ 2,6 sialylated CPS (data not shown). These observations are in accordance with previous studies reflecting the poor immunogenic nature of *S. suis* type 2 CPS. *In vitro* studies using either non-encapsulated mutants or highly purified *S. suis* type 2 CPS have shown that this molecule severely interferes with the activation of the host innate immune system (5-7, 34, 39, 67). *In vivo* immunization experiments in pigs showed that repeated injections of purified CPS (25) or whole-killed *S. suis* type 2 cells (26, 68, 69) resulted in no or very low induction in CPS-specific Ab titers in comparison with protein-specific Ab titers.

TLR2 has been implicated as an important innate recognition receptor for *S. suis* type 2 and both *in vitro* and *in vivo* studies have highlighted its role in induction of an inflammatory response (38-40). Thus, the better protection observed in TLR2<sup>-/-</sup> mice is likely due to a reduction of the inflammatory response (40). As TLRs have also been implicated in the regulation of protein- and/or CPS-specific Ab responses during

immunization with encapsulated bacteria (18, 19), we aimed to analyze its implication in the development of specific humoral response against *S. suis* type 2. No effect of TLR2 was observed in protein-specific or CPS-specific Ab response after primary infection with *S. suis* type 2. Comparable with our results, no difference in IgG titers directed against whole-protein extract was observed between WT and TLR2<sup>-/-</sup> mice after infection with *Borrelia burgdorferi* (70). Whereas TLR4 was implicated in a CPS-specific IgG or IgM response to killed *N. meningitidis*, no implication of TLR2 was observed (19). On the other hand, even if TLR2 played only a modest role in CPS-specific IgM response to immunization with killed *S. pneumoniae* cells, its presence was crucial for the development of CPS-specific IgG type 1 response (18). The absence of implication of TLR2 in specific humoral response to *S. suis* type 2 could be explained, at least in part, by the fact that the levels of expression of splenic IFN- $\gamma$  and IL-6, known to be critical in promoting type 1 and type 2 adaptive immune responses (71, 72), were either similar or only partially reduced in TLR2<sup>-/-</sup> versus WT mice (40). Implication of other receptors in the specific Ab response to *S. suis*, including members of the large family of lectin receptors, which are susceptible to recognize CPS of the bacteria (61, 62), needs further investigations.

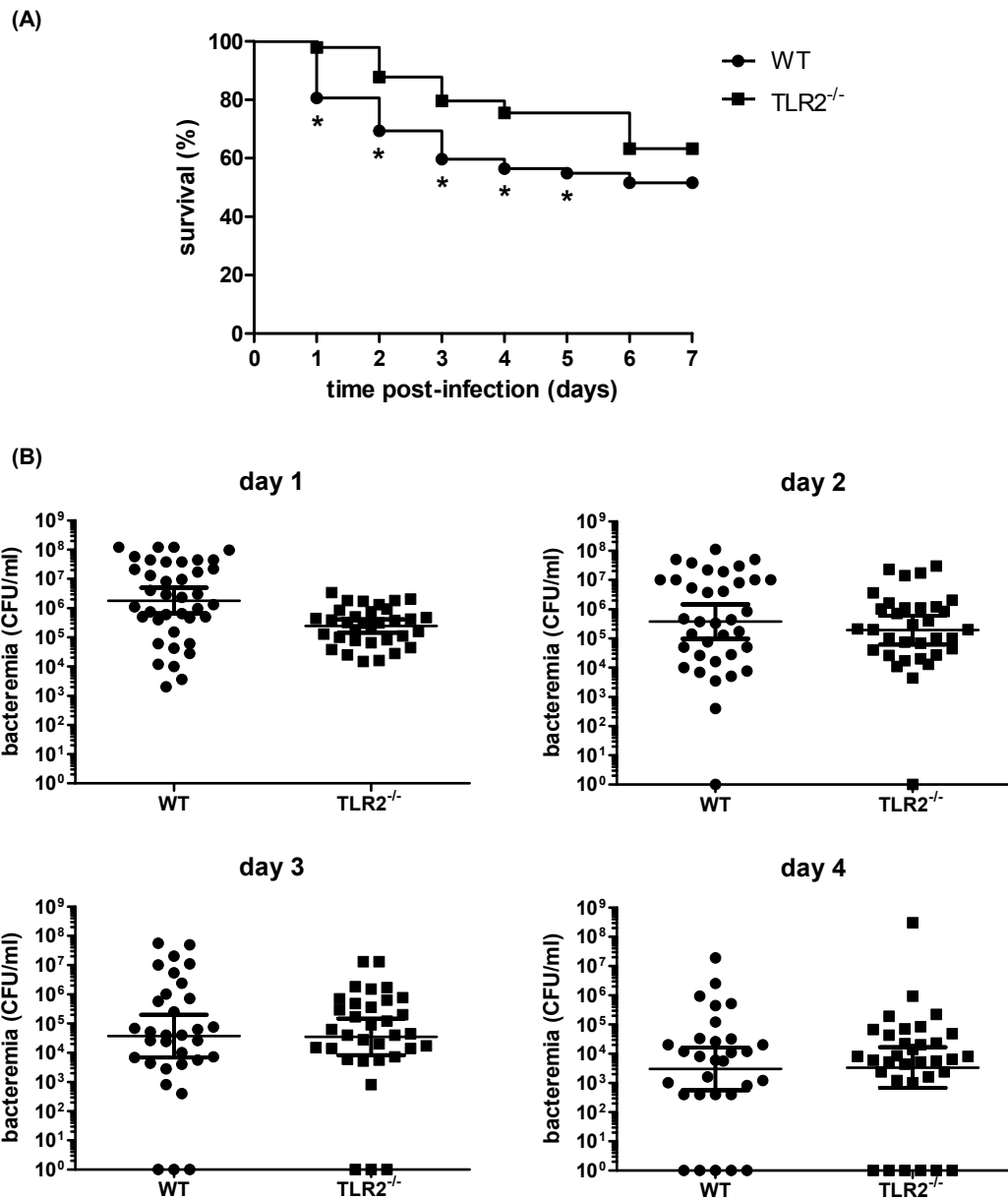
Finally, we have observed that pre-infected mice showed a significantly better resistance to a reinfection with the same strain of *S. suis* type 2 in comparison with non-preinfected mice. Even if a clear protective role of mouse or pig anti-*S. suis* type 2 CPS Abs had been demonstrated in opsonophagocytosis *in vitro* assays (25-27), the weak CPS-specific Ab response induced after *S. suis* clinical infection seems to suggest that protection observed in our study is more likely due to protein-specific Ab response. Studies with the purified *S. suis* protein Sao have shown that the protective capacity of humoral response against *S. suis* infection was dependent on the IgG subclass. Indeed, when the immunization protocol was changed with a vaccine formulation inducing bias toward a Th1-like immune response, dominated by the IgG2a response in mouse or IgG2 response in pigs, efficient immunity was conferred (16, 73). In this regard, it is interesting to point out that all Th1 IgG subclasses are induced after primary and secondary infection with *S. suis*. Yet, further functional assays of CPS- and protein-specific Abs are required for a better comprehension of their respective contribution in the fight against *S. suis* infection. A contributing role of cellular immunity to the whole protective response against this bacterium cannot be excluded.

In conclusion, the challenge in future vaccine design against *S. suis* resides in finding a protein or proteins able to overcome the phenotypic variability of *S. suis* type

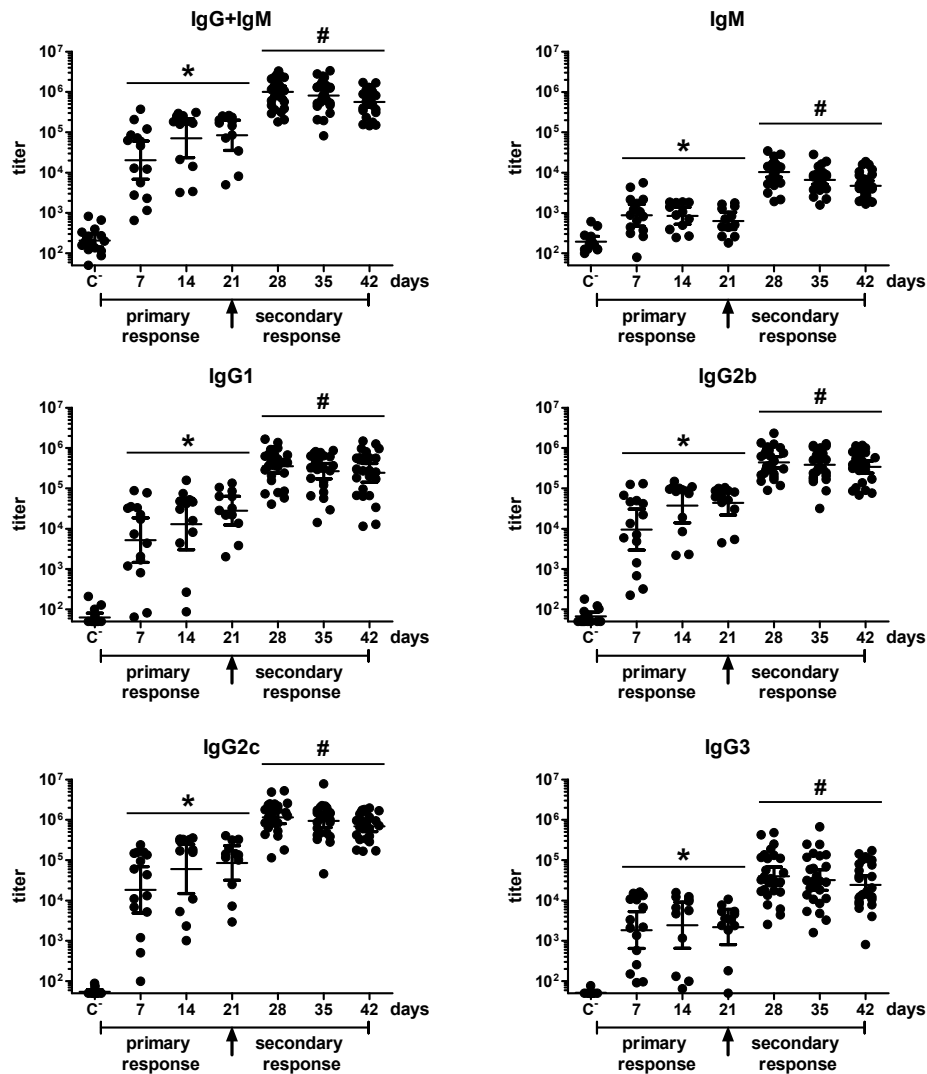
2 strains worldwide or to render the CPS immunogenic, as if produced, anti-CPS Abs are probably highly protective against all *S. suis* type 2 strains.

### **Acknowledgments**

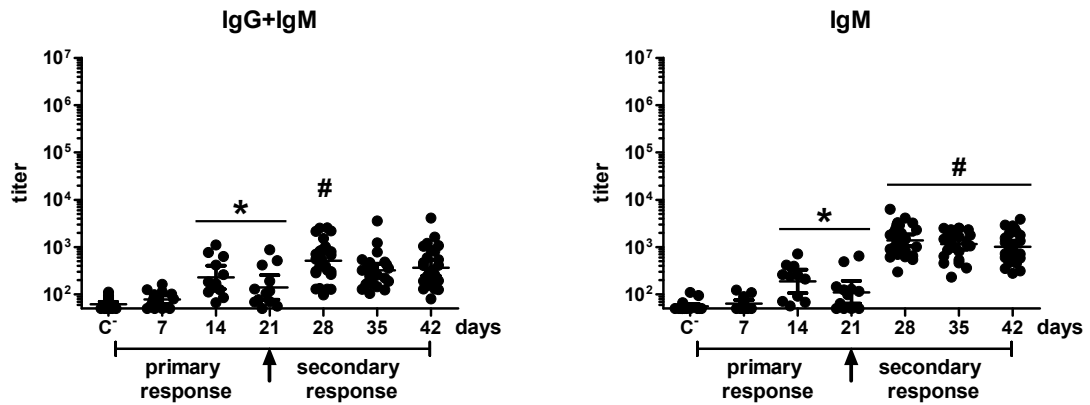
This work was mainly supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through a grant to MS (#342150). Partial contribution was also provided by Canadian Institutes of Health Research grant to MS and by Fédération des producteurs de porcs du Québec (FPPQ) grant to MS, MG and VG. GA is a recipient of a FPPQ fellowship.



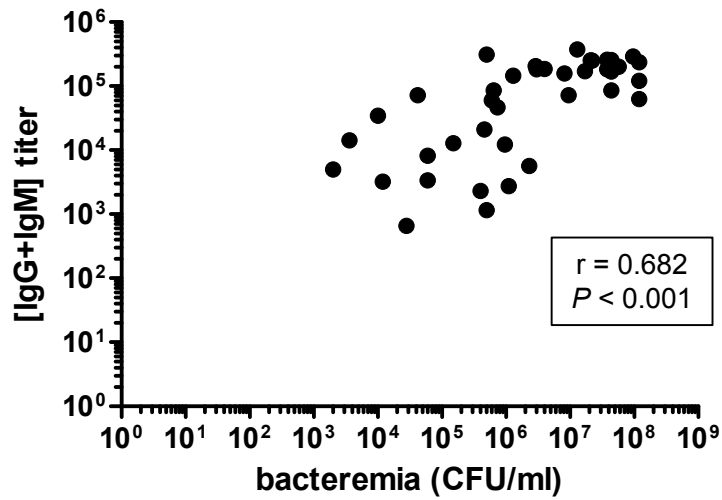
**Figure 1. Survival curve and blood bacteremia of wild-type (WT) and TLR2<sup>-/-</sup> mice after *S. suis* serotype 2 strain P1/7 primary infection.** (A) Survival of WT ( $n = 62$ ) and TLR2<sup>-/-</sup> ( $n = 50$ ) mice after primary intraperitoneal infection with  $2 \times 10^7$  CFU of live *S. suis* 2 strain P1/7 was monitored for 7 days. \*  $P < 0.05$ , indicates statistically significant differences between WT and TLR2<sup>-/-</sup> mouse groups, as determined by Log-rank (Mantel-Cox) test. (B) Blood bacteria loads of WT ( $n = 39$ ) and TLR2<sup>-/-</sup> ( $n = 34$ ) surviving mice after primary intraperitoneal infection with  $2 \times 10^7$  CFU of live *S. suis* 2 strain P1/7 were determined at days 1, 2, 3 or 4 post-infection. Data of individuals are presented including geometric mean with 95% confidence interval.



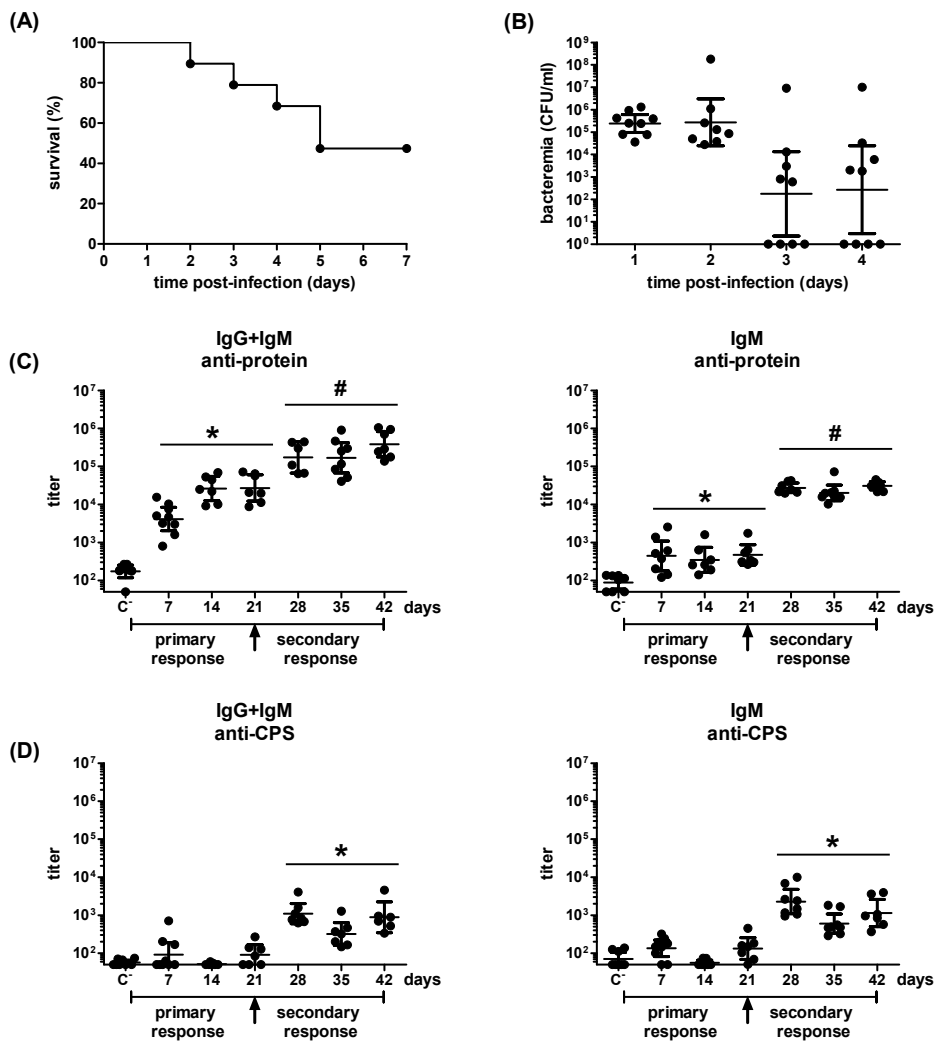
**Figure 2. Titration of protein-specific Abs of wild-type (WT) mice after *S. suis* serotype 2 strain P1/7 primary and secondary infections.** In a first set of experiments targeting the primary response, WT mice ( $n = 62$ ) were infected with  $2 \times 10^7$  CFU of live *S. suis* 2 strain P1/7. Total Ig [IgG+IgM], IgM, IgG1, IgG2b, IgG2c or IgG3 anti-protein titers were determined by ELISA at days 7 ( $n = 15$ ), 14 ( $n = 12$ ), or 21 ( $n = 12$ ) in surviving mice. In a second set of experiments targeting the secondary response, WT mice were infected with  $2 \times 10^7$  CFU of live *S. suis* 2 strain P1/7 and the surviving mice ( $n = 106$ ) were challenged at day 21 with  $5 \times 10^7$  CFU of the same strain. Anti-protein Ab titers of post-challenge surviving mice were determined by ELISA at days 28 ( $n = 27$ ), 35 ( $n = 26$ ), or 42 ( $n = 26$ ). C<sup>-</sup> represents a pool of control mice ( $n = 3$ ) injected with vehicle solution (THB) whose titers were evaluated at days 7, 14, 21, 28, 35 and 42. Data of individuals are presented including geometric mean with 95% confidence interval. Arrow indicates secondary infection. \*  $P < 0.05$ , indicates statistically significant differences in comparison with C<sup>-</sup>; #  $P < 0.05$ , indicates statistically significant differences in comparison with peak of primary response.



**Figure 3. Titration of CPS-specific Abs of wild-type (WT) mice after *S. suis* serotype 2 strain P1/7 primary and secondary infections.** In a first set of experiments targeting the primary response, WT mice ( $n = 62$ ) were infected with  $2 \times 10^7$  CFU of live *S. suis* 2 strain P1/7. Total Ig [IgG+IgM] or IgM anti-CPS titers were determined by ELISA at days 7 ( $n = 15$ ), 14 ( $n = 12$ ), or 21 ( $n = 12$ ) in surviving mice. In a second set of experiments targeting the secondary response, WT mice were infected with  $2 \times 10^7$  CFU of live *S. suis* 2 strain P1/7 and the surviving mice ( $n = 106$ ) were challenged at day 21 with  $5 \times 10^7$  CFU of the same strain. Anti-CPS Ab titers of post-challenge surviving mice were determined by ELISA at days 28 ( $n = 27$ ), 35 ( $n = 26$ ), or 42 ( $n = 26$ ). C<sup>-</sup> represents a pool of control mice ( $n = 3$ ) injected with vehicle solution (THB) whose titers were evaluated at days 7, 14, 21, 28, 35 and 42. Data of individuals are presented including geometric mean with 95% confidence interval. Arrow indicates secondary infection. \*  $P < 0.05$ , indicates statistically significant differences in comparison with C<sup>-</sup>; #  $P < 0.05$ , indicates statistically significant differences in comparison with peak of primary response.

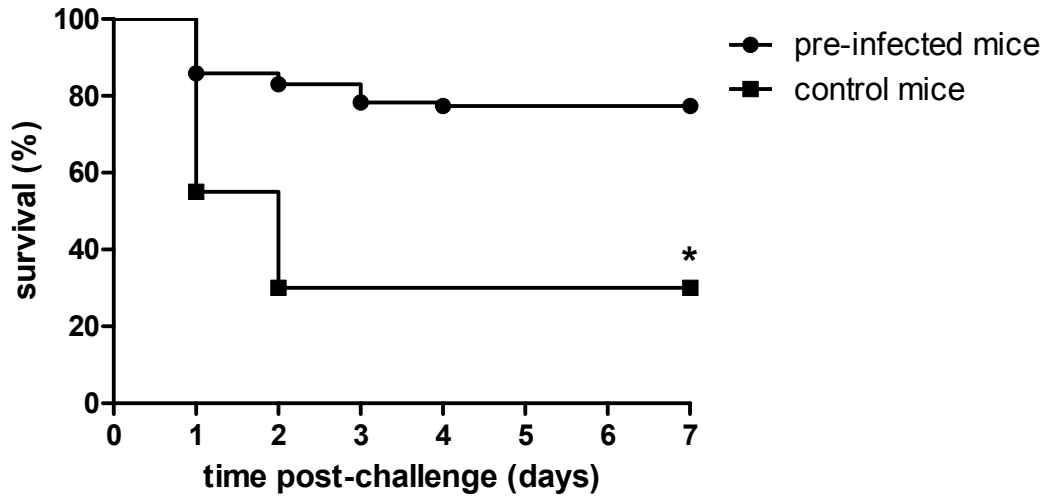


**Figure 4. Correlation between protein-specific Ab response and bacteremia of wild-type (WT) mice after *S. suis* serotype 2 strain P1/7 primary infection.** Total Ig [IgG+IgM] anti-protein titers of WT mice ( $n = 39$ ) infected with  $2 \times 10^7$  CFU of live *S. suis* 2 strain P1/7 and euthanized at days 7, 14 and 21 post-infection were correlated with bacteremia obtained at day 1 post-infection.  $r$ : correlation coefficient.  $P < 0.001$ , indicates a positive correlation as determined by Spearman rank order correlation.

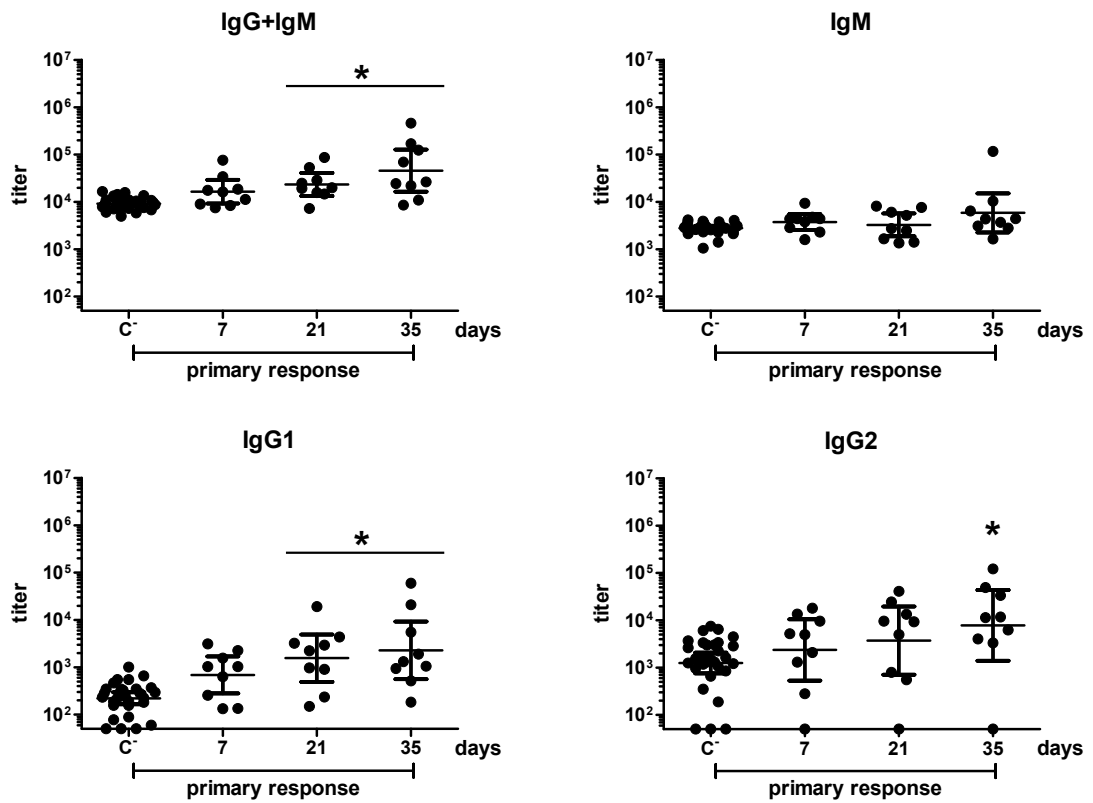


**Figure 5. Survival curve, blood bacteremia and titration of protein- or CPS-specific Abs of wild-type (WT) mice after *S. suis* serotype 2 strain 89-1591 infection.** (A) Survival of WT mice ( $n = 19$ ) after primary intraperitoneal infection with  $2 \times 10^7$  CFU of live *S. suis* 2 strain 89-1591 was monitored for 7 days. (B) Blood bacteria loads of WT surviving mice ( $n = 9$ ) were determined at days 1, 2, 3 or 4 post-primary infection. (C) and (D) Titration of protein- (C) or CPS- (D) specific Abs of WT mice after *S. suis* 2 strain 89-1591 primary and secondary infections. In a first set of experiments targeting the primary response, mice ( $n = 19$ ) were infected with  $2 \times 10^7$  CFU of live *S. suis* 2 strain 89-1591. Total Ig [IgG+IgM] or IgM anti-protein or anti-CPS titers were determined by ELISA at days 7 ( $n = 9$ ), 14 ( $n = 7$ ) and 21 ( $n = 7$ ) in surviving mice. In a second set of experiments targeting the secondary response, WT mice were infected with  $2 \times 10^7$  CFU of live *S. suis* 2 strain 89-1591 and the surviving mice were challenged at day 21 with  $5 \times 10^7$  CFU of the same strain. Anti-protein or anti-CPS Ab titers of post-challenge surviving mice were determined by ELISA at days 28 ( $n = 8$ ), 35 ( $n = 8$ ) and 42 ( $n = 7$ ). C- represents a pool of control mice ( $n = 3$ ) injected with vehicle solution (THB) whose titers were evaluated at days 7, 14, 21, 28, 35 and 42. Data of individuals are presented including geometric mean with 95% confidence interval. Arrow indicates secondary infection. \*  $P < 0.05$ , indicates statistically significant differences in comparison with C-; #  $P < 0.05$ , indicates statistically significant differences in comparison with peak of primary response.

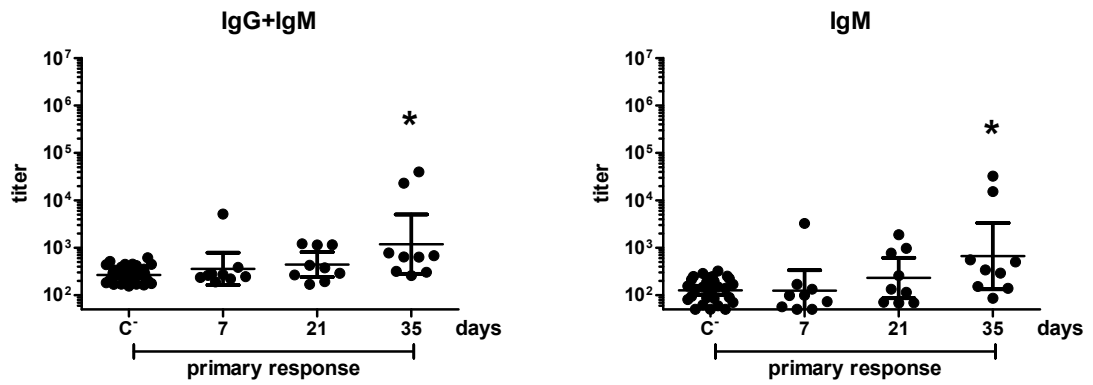




**Figure 6. Survival curve of wild-type (WT) mice after *S. suis* serotype 2 strain P1/7 secondary infection.** WT mice ( $n = 106$ ) were pre-infected with  $2 \times 10^7$  CFU of live *S. suis* 2 strain P1/7 and control mice ( $n = 20$ ) were injected with vehicle solution (THB). At day 21 post-primary infection or placebo injection, mice were challenged with  $5 \times 10^7$  CFU of the same strain and survival was monitored for 7 days. \*  $P < 0.05$ , indicates statistically significant difference between pre-infected and control mice, as determined by Log-rank (Mantel-Cox) test.



**Figure 7. Titration of protein-specific Abs of pigs after *S. suis* serotype 2 strain 89-1591 primary infection.** Pigs ( $n = 13$ ) were intranasally infected with  $4 \times 10^9$  CFU of live *S. suis* 2 strain 89-1591. Total Ig [IgG+IgM], IgM, IgG1 or IgG2 anti-protein titers were determined by ELISA at days 7, 21 and 35 in surviving pigs ( $n = 9$ ). C<sup>-</sup> represents a pool of control pigs ( $n = 10$ ) injected with vehicle solution (PBS) whose titers were evaluated at days 7, 21 and 35. Data of individuals are presented including geometric mean with 95% confidence interval. \*  $P < 0.05$ , indicates statistically significant differences in comparison with C<sup>-</sup>.



**Figure 8. Titration of CPS-specific Abs of pigs after *S. suis* serotype 2 strain 89-1591 primary infection.** Pigs ( $n = 13$ ) were intranasally infected with  $4 \times 10^9$  CFU of live *S. suis* 2 strain 89-1591. Total Ig [IgG+IgM] or IgM anti-CPS titers were determined by ELISA at days 7, 21 and 35 in surviving pigs ( $n = 9$ ). C<sup>-</sup> represents a pool of control pigs ( $n = 10$ ) injected with vehicle solution (PBS) whose titers were evaluated at days 7, 21 and 35. Data of individuals are presented including geometric mean with 95% confidence interval. \*  $P < 0.05$ , indicates statistically significant differences in comparison with C<sup>-</sup>.

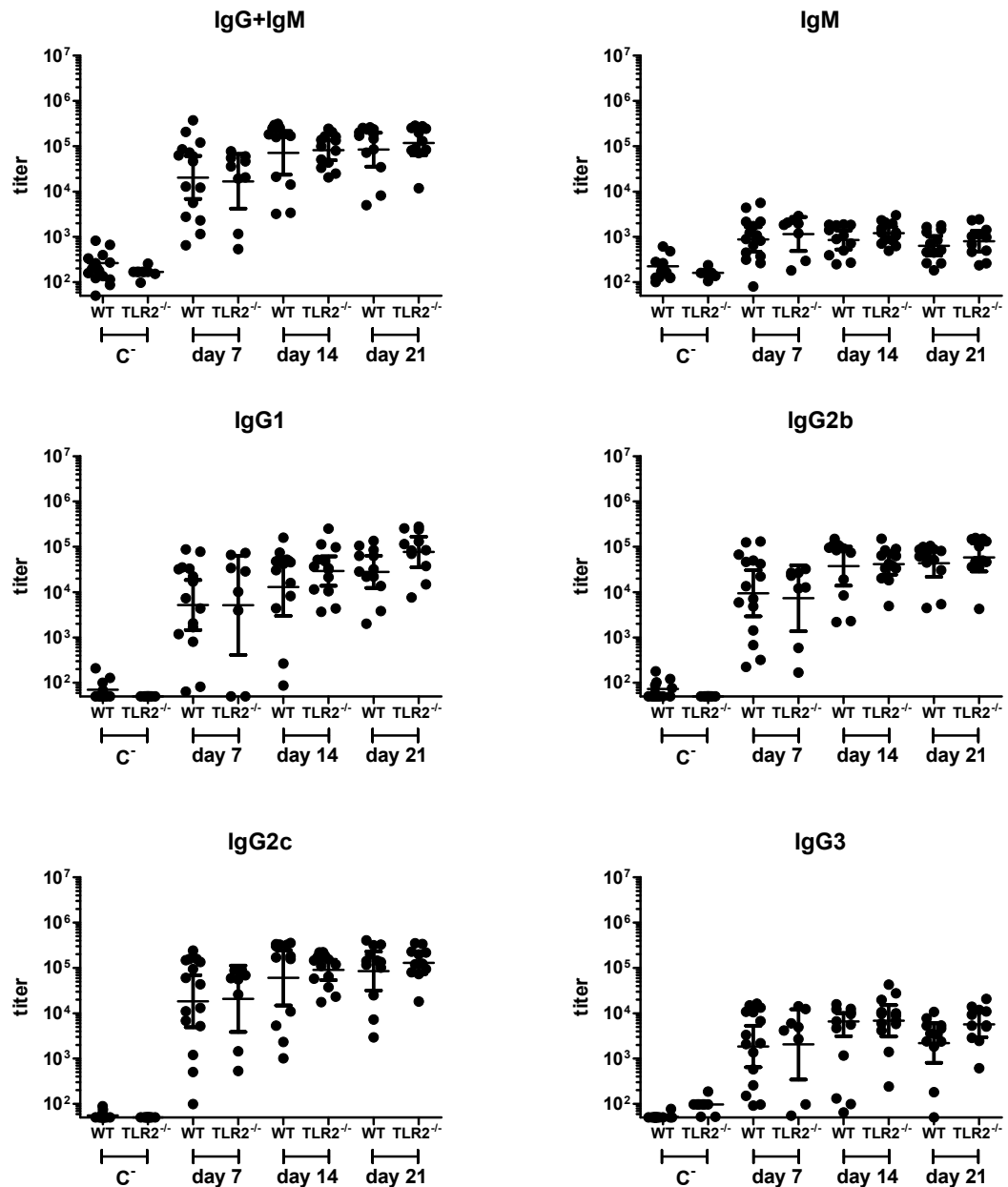
**Table I. Protein- and CPS-specific antibody titers after *S. suis* serotype 2 infection in mice and pigs and correlation with bacteremia.**

| Ab response in <i>S. suis</i> serotype 2-infected <sup>b</sup> : |             |          |          |          |             |          |          |          |                   |                 |  |
|--|-------------|----------|----------|----------|-------------|----------|----------|----------|-------------------|-----------------|--|
| Mice   |             |          |          |          |             |          |          |          |                   |                 |  |
| Ig (functions) <sup>a</sup>                                      | P1/7        |          |          |          | 89-1591     |          |          |          | Pigs (89-1591)    |                 |  |
|  | Antiprotein |          | Anti-CPS |          | Antiprotein |          | Anti-CPS |          | Antiprotein titer | Anti-CPS titer  |  |
|  | Titer       | <i>r</i> | Titer    | <i>r</i> | Titer       | <i>r</i> | Titer    | <i>r</i> |                   |                 |  |
| IgM (CA, ++; OP, +/-)  |             |          |          |          |             |          |          |          |                   |                 |  |
| Primary  | 0.9         | NC       | 0.2      | 0.81     | 0.5         | NC       | NS       |          | NS                | 0.7             |  |
| Secondary  | 10.4        | 0.63     | 1.4      | NC       | 30.8        | NC       | 2.3      | NC       | ND                | ND              |  |
| Type 1 IgGs (CA, ++; OP, ++)                                     |             |          |          |          |             |          |          |          |                   |                 |  |
| IgG2b  |             |          |          |          |             |          |          |          |                   |                 |  |
| Primary  | 43.4        | 0.61     | NS       |          | ND          |          | ND       |          | 7.8 <sup>c</sup>  | NS <sup>c</sup> |  |
| Secondary  | 441.6       | 0.46     | NS       |          | 363.7       | NC       | NS       |          | ND                | ND              |  |
| IgG2c  |             |          |          |          |             |          |          |          |                   |                 |  |
| Primary  | 85          | 0.8      | NS       |          | ND          |          | ND       |          |                   |                 |  |
| Secondary  | 1,149       | 0.48     | NS       |          | 654.3       | NC       | NS       |          |                   |                 |  |
| IgG3   |             |          |          |          |             |          |          |          |                   |                 |  |
| Primary  | 2.4         | 0.74     | NS       |          | ND          |          | ND       |          |                   |                 |  |
| Secondary  | 39.6        | 0.62     | NS       |          | 83.3        | NC       | NS       |          |                   |                 |  |
| Type 2 IgGs (CA, +/-; OP, +/-)                                   |             |          |          |          |             |          |          |          |                   |                 |  |
| IgG1   |             |          |          |          |             |          |          |          |                   |                 |  |
| Primary  | 27.9        | 0.71     | NS       |          | ND          |          | ND       |          | 2.3               | NS              |  |
| Secondary  | 353.7       | 0.48     | NS       |          | 47.3        | NC       | NS       |          | ND                | ND              |  |

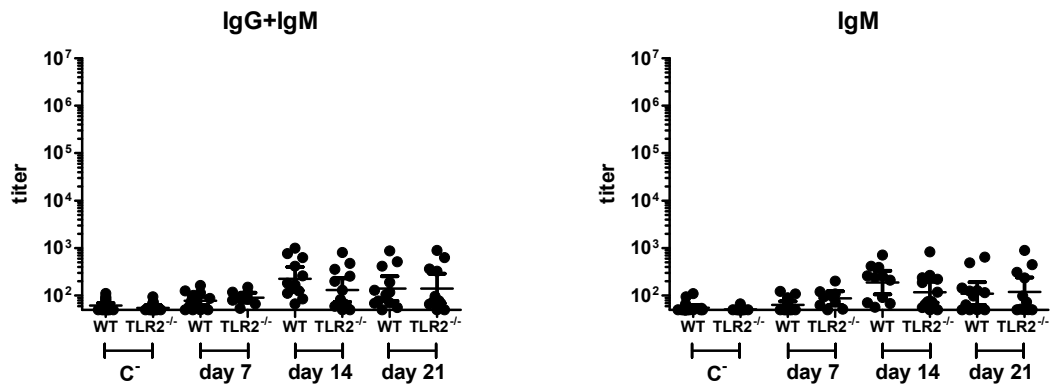
<sup>a</sup> Putative functions of the mouse/pig immunoglobulin (sub)classes against bacterial infections. CA, complement activation; OP, opsonophagocytosis; ++, strong activity; +/-, weak/no activity.

<sup>b</sup> Mice were infected i.p. with P1/7 at  $2 \times 10^7$  CFU for the primary infection and  $5 \times 10^7$  CFU for the secondary infection or 89-1591 at  $2 \times 10^7$  CFU for the primary infection and  $5 \times 10^7$  CFU for the secondary infection. Pigs were infected intranasally with 89-1591 at  $4 \times 10^9$  CFU (primary infection only). In each case, the titer represents the geometric mean of titers ( $10^3$ ) at the peak of the corresponding response, and *r* represents the correlation coefficient of titers at the peak of the corresponding response with bacteremia obtained 1 day postinfection, as determined by Spearman rank order correlation ( $P < 0.05$ ). Correlation studies were done only with the mouse model. NC, no correlation; NS, nonsignificant in comparison with titers from noninfected animals as determined by ANOVA; ND, not determined.

<sup>c</sup> Data are for the IgG2 subclass.



**Figure S1A.** Titration of protein-specific Abs of wild-type (WT) and TLR2<sup>-/-</sup> mice after *S. suis* serotype 2 strain P1/7 primary infection. WT ( $n = 62$ ) or TLR2<sup>-/-</sup> ( $n = 50$ ) mice were infected with  $2 \times 10^7$  CFU of live *S. suis* 2 strain P1/7. Total Ig [IgG+IgM], IgM, IgG1, IgG2b, IgG2c or IgG3 anti-protein titers were determined by ELISA at days 7 ( $n = 15$  WT mice or  $n = 9$  TLR2<sup>-/-</sup> mice), 14 ( $n = 12$  WT mice or  $n = 13$  TLR2<sup>-/-</sup> mice), or 21 ( $n = 12$  WT mice or  $n = 12$  TLR2<sup>-/-</sup> mice) in surviving mice. C<sup>-</sup> represents a pool of control mice ( $n = 3$ ) injected with vehicle solution (THB) whose titers were evaluated at days 7, 14 and 21. Data of individuals are presented including geometric mean with 95% confidence interval.



**Figure S1B.** Titration of CPS-specific Abs of wild-type (WT) and TLR2<sup>-/-</sup> mice after *S. suis* serotype 2 strain P1/7 primary infection. WT ( $n = 62$ ) or TLR2<sup>-/-</sup> ( $n = 50$ ) mice were infected with  $2 \times 10^7$  CFU of live *S. suis* 2 strain P1/7. Total Ig [IgG+IgM] or IgM anti-CPS titers were determined by ELISA at days 7 ( $n = 15$  WT mice or  $n = 9$  TLR2<sup>-/-</sup> mice), 14 ( $n = 12$  WT mice or  $n = 13$  TLR2<sup>-/-</sup> mice), or 21 ( $n = 12$  WT mice or  $n = 12$  TLR2<sup>-/-</sup> mice) in surviving mice. C- represents a pool of control mice ( $n = 3$ ) injected with vehicle solution (THB) whose titers were evaluated at days 7, 14 and 21. Data of individuals are presented including geometric mean with 95% confidence interval.

## References

1. **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.
2. **Segura M.** 2009. *Streptococcus suis*: an emerging human threat. *J Infect Dis* **199**:4-6.
3. **Goyette-Desjardins G.** 2014. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg Microbes Infect* **3**:e45.
4. **Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M.** 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol* **7**:259-279.
5. **Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, Segura M.** 2011. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis* **204**:919-929.
6. **Segura MA, Cleroux P, Gottschalk M.** 1998. *Streptococcus suis* and group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**:189-195.
7. **Lecours MP, Segura M, Lachance C, Mussa T, Surprenant C, Montoya M, Gottschalk M.** 2011. Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. *Vet Res* **42**:72.
8. **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.
9. **AlonsoDeVelasco E, Verheul AF, Verhoef J, Snippe H.** 1995. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev* **59**:591-603.
10. **Jones C.** 2005. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. *An Acad Bras Cienc* **77**:293-324.
11. **Unkeless JC, Scigliano E, Freedman VH.** 1988. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol* **6**:251-281.
12. **Neuberger MS, Rajewsky K.** 1981. Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *Eur J Immunol* **11**:1012-1016.
13. **Michaelsen TE, Kolberg J, Aase A, Herstad TK, Hoiby EA.** 2004. The four mouse IgG isotypes differ extensively in bactericidal and opsonophagocytic activity when reacting with the P1.16 epitope on the outer membrane PorA protein of *Neisseria meningitidis*. *Scand J Immunol* **59**:34-39.
14. **Oishi K, Koles NL, Guelde G, Pollack M.** 1992. Antibacterial and protective properties of monoclonal antibodies reactive with *Escherichia coli* O111:B4 lipopolysaccharide: relation to antibody isotype and complement-fixing activity. *J Infect Dis* **165**:34-45.
15. **Crawley A, Wilkie BN.** 2003. Porcine Ig isotypes: function and molecular characteristics. *Vaccine* **21**:2911-2922.
16. **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.
17. **Mond JJ, Lees A, Snapper CM.** 1995. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* **13**:655-692.
18. **Khan AQ, Chen Q, Wu ZQ, Paton JC, Snapper CM.** 2005. Both innate immunity and type 1 humoral immunity to *Streptococcus pneumoniae* are mediated by MyD88 but differ in their relative levels of dependence on toll-like receptor 2. *Infect Immun* **73**:298-307.
19. **Arjunaraja S, Massari P, Wetzler LM, Lees A, Colino J, Snapper CM.** 2012. The nature of an *in vivo* anti-capsular polysaccharide response is markedly influenced by the composition and/or architecture of the bacterial subcapsular domain. *J Immunol* **188**:569-577.
20. **Arjunaraja S, Paoletti LC, Snapper CM.** 2012. Structurally identical capsular polysaccharide expressed by intact group B *streptococcus* versus *Streptococcus pneumoniae* elicits distinct murine polysaccharide-specific IgG responses *in vivo*. *J Immunol* **188**:5238-5246.

21. **Colino J, Chattopadhyay G, Sen G, Chen Q, Lees A, Canaday DH, Rubtsov A, Torres R, Snapper CM.** 2009. Parameters underlying distinct T cell-dependent polysaccharide-specific IgG responses to an intact gram-positive bacterium versus a soluble conjugate vaccine. *J Immunol* **183**:1551-1559.
22. **Holt ME, Enright MR, Alexander TJ.** 1988. Immunisation of pigs with live cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Res Vet Sci* **45**:349-352.
23. **Holt ME, Enright MR, Alexander TJ.** 1989. Studies of the protective effect of different fractions of sera from pigs immune to *Streptococcus suis* type 2 infection. *J Comp Pathol* **100**:435-442.
24. **Blouin C, Higgins R, Gottschalk M, Simard J.** 1994. Evaluation of the antibody response in pigs vaccinated against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Can J Vet Res* **58**:49-54.
25. **Elliott SD, Clifton-Hadley F, Tai J.** 1980. Streptococcal infection in young pigs. V. An immunogenic polysaccharide from *Streptococcus suis* type 2 with particular reference to vaccination against streptococcal meningitis in pigs. *J Hyg (Lond)* **85**:275-285.
26. **Baums CG, Kock C, Beineke A, Bennecke K, Goethe R, Schroder C, Waldmann KH, Valentin-Weigand P.** 2009. *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9. *Clin Vaccine Immunol* **16**:200-208.
27. **Charland N, Jacques M, Lacouture S, Gottschalk M.** 1997. Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 1/2. *Microbiology* **143**:3607-3614.
28. **del Campo Sepulveda EM, Altman E, Kobisch M, D'Allaire S, Gottschalk M.** 1996. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. *Vet Microbiol* **52**:113-125.
29. **Takeuchi O, Akira S.** Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**:805-820.
30. **Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ.** 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* **274**:17406-17409.
31. **Wang Q, McLoughlin RM, Cobb BA, Charrel-Dennis M, Zaleski KJ, Golenbock D, Tzianabos AO, Kasper DL.** 2006. A bacterial carbohydrate links innate and adaptive responses through Toll-like receptor 2. *J Exp Med* **203**:2853-2863.
32. **Zughaier SM.** 2011. *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharides induce inflammatory responses via TLR2 and TLR4-MD-2. *J Leukoc Biol* **89**:469-480.
33. **Um SH, Rhee DK, Pyo S.** 2002. Involvement of protein kinase C and tyrosin kinase in tumoricidal activation of macrophage induced by *Streptococcus pneumoniae* type II capsular polysaccharide. *Int Immunopharmacol* **2**:129-137.
34. **Calzas C, Goyette-Desjardins G, Lemire P, Gagnon F, Lachance C, Van Calsteren MR, Segura M.** 2013. Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* Capsular Polysaccharides Induce Chemokine Production by Dendritic Cells via Toll-Like Receptor 2- and MyD88-Dependent and -Independent Pathways. *Infect Immun* **81**:3106-3118.
35. **Takeuchi O, Hoshino K, Akira S.** 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* **165**:5392-5396.
36. **Knapp S, Wieland CW, van 't Veer C, Takeuchi O, Akira S, Florquin S, van der Poll T.** 2004. Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. *J Immunol* **172**:3132-3138.
37. **Latz E, Franko J, Golenbock DT, Schreiber JR.** 2004. *Haemophilus influenzae* type b-outer membrane protein complex glycoconjugate vaccine induces cytokine production by engaging human toll-like receptor 2 (TLR2) and requires the presence of TLR2 for optimal immunogenicity. *J Immunol* **172**:2431-2438.
38. **Lecours MP, Segura M, Fittipaldi N, Rivest S, Gottschalk M.** 2012. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS One* **7**:e44746.
39. **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.



40. **Lachance C, Segura M, Gerber PP, Xu J, Gottschalk M.** 2013. Toll-like receptor 2-independent host innate immune response against an epidemic strain of *Streptococcus suis* that causes a toxic shock-like syndrome in humans. *PLoS One* **8**:e65031.
41. **Kawai T, Akira S.** 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**:373-384.
42. **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.
43. **Wichgers Schreur PJ, Rebel JM, Smits MA, van Putten JP, Smith HE.** 2010. Differential activation of the Toll-like receptor 2/6 complex by lipoproteins of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9. *Vet Microbiol* **143**:363-370.
44. **Zheng H, Luo X, Segura M, Sun H, Ye C, Gottschalk M, Xu J.** 2012. The role of toll-like receptors in the pathogenesis of *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* **156**:147-156.
45. **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.
46. **Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Dubreuil D.** 1992. Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. *Vet Microbiol* **30**:59-71.
47. **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.
48. **Marois C, Bougeard S, Gottschalk M, Kobisch M.** 2004. Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of live and dead pigs. *J Clin Microbiol* **42**:3169-3175.
49. **Dominguez-Punaro Mde L, Segura M, Radzioch D, Rivest S, Gottschalk M.** 2008. Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection. *Infect Immun* **76**:3901-3910.
50. **Gottschalk M.** 2012. Streptococcosis, p. 841-855. *In* K. L. Zimmerman JJ, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (ed.), *Diseases of swine*, 10th ed. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, IA.
51. **Brazeau C, Gottschalk M, Vincelette S, Martineau-Doize B.** 1996. *In vitro* phagocytosis and survival of *Streptococcus suis* capsular type 2 inside murine macrophages. *Microbiology* **142**:1231-1237.
52. **Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S, Gottschalk M.** 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* **144**:325-332.
53. **Segura M, Gottschalk M, Olivier M.** 2004. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infect Immun* **72**:5322-5330.
54. **Andresen LO, Tegtmeyer C.** 2001. Passive immunization of pigs against experimental infection with *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol* **81**:331-344.
55. **Kataoka Y, Haritani M, Mori M, Kishima M, Sugimoto C, Nakazawa M, Yamamoto K.** 1991. Experimental infections of mice and pigs with *Streptococcus suis* type 2. *J Vet Med Sci* **53**:1043-1049.
56. **Avci FY, Kasper DL.** 2010. How bacterial carbohydrates influence the adaptive immune system. *Annu Rev Immunol* **28**:107-130.
57. **Wessels MR, Paoletti LC, Rodewald AK, Michon F, DiFabio J, Jennings HJ, Kasper DL.** 1993. Stimulation of protective antibodies against type Ia and Ib group B streptococci by a type Ia polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *Infect Immun* **61**:4760-4766.
58. **Finne J, Leinonen M, Makela PH.** 1983. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* **2**:355-357.
59. **Dintzis HM, Dintzis RZ, Vogelstein B.** 1976. Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**:3671-3675.
60. **Kalka-Moll WM, Tzianabos AO, Bryant PW, Niemeyer M, Ploegh HL, Kasper DL.** 2002. Zwitterionic polysaccharides stimulate T cells by MHC class II-dependent interactions. *J Immunol* **169**:6149-6153.

61. **Carlin AF, Uchiyama S, Chang YC, Lewis AL, Nizet V, Varki A.** 2009. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood* **113**:3333-3336.
62. **Zamze S, Martinez-Pomares L, Jones H, Taylor PR, Stillion RJ, Gordon S, Wong SY.** 2002. Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* **277**:41613-41623.
63. **Crocker PR, Paulson JC, Varki A.** 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* **7**:255-266.
64. **Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, Rodrigues S, Fahey J, Wessels MR, Rubens CE.** 2005. Structural and genetic diversity of group B *streptococcus* capsular polysaccharides. *Infect Immun* **73**:3096-3103.
65. **Takahashi S, Aoyagi Y, Adderson EE, Okuwaki Y, Bohnsack JF.** 1999. Capsular sialic acid limits C5a production on type III group B *streptococci*. *Infect Immun* **67**:1866-1870.
66. **Courtney AH, Puffer EB, Pontrello JK, Yang ZQ, Kiessling LL.** 2009. Sialylated multivalent antigens engage CD22 in trans and inhibit B cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:2500-2505.
67. **Segura M, Stankova J, Gottschalk M.** 1999. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infect Immun* **67**:4646-4654.
68. **Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Hilgers LA, Smith HE.** 2002. Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol* **84**:155-168.
69. **Baums CG, Bruggemann C, Kock C, Beineke A, Waldmann KH, Valentin-Weigand P.** 2010. Immunogenicity of an autogenous *Streptococcus suis* bacterin in preparturient sows and their piglets in relation to protection after weaning. *Clin Vaccine Immunol* **17**:1589-1597.
70. **Wooten RM, Ma Y, Yoder RA, Brown JP, Weis JH, Zachary JF, Kirschning CJ, Weis JJ.** 2002. Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* **168**:348-355.
71. **Murphy KM, Reiner SL.** 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* **2**:933-944.
72. **Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA.** 1997. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* **185**:461-469.
73. **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.

## ARTICLE III

# **Terminal sialic acid in Gram-positive bacterial capsular polysaccharides does not exert an immunosuppressive effect on the humoral response**

Cynthia Calzas<sup>a</sup>, Morgan Taillardet<sup>b</sup>, Insaf Salem Fourati<sup>c</sup>, Marcelo Gottschalk<sup>a</sup>, Hugo Soudenys<sup>c</sup>, Thierry Defrance<sup>b</sup>, Mariela Segura<sup>a</sup>

Laboratory of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada<sup>a</sup>; INSERM U1111, CNRS UMR5308, University of Lyon 1, Lyon, France<sup>b</sup>; Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada<sup>c</sup>

Manuscrit en préparation pour soumission à *Infection and Immunity*

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

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

## Abstract

*Streptococcus suis* and *Streptococcus agalactiae* (also known as group B *Streptococcus* [GBS]) are encapsulated streptococci causing severe septicemia and meningitis. Antibodies (Abs) directed against capsular polysaccharides (CPSs) are essential to host defense against encapsulated bacteria, but the poor immunogenicity of CPSs is a major obstacle in the fight against these pathogens. The mechanisms underlying anti-CPS Ab responses are not fully elucidated, but some elements in the composition and/or the structure of the CPSs, including the presence of sialic acid, may have immunosuppressive effects. We investigated the influence of the biochemistry of CPSs on the development of humoral immunity by comparing the features of the CPS-specific Ab response directed against *S. suis* serotypes 2 and 14 and GBS serotypes III and V in mice after infection with live virulent strains, as well as after immunization with highly purified native and desialylated CPSs. Whereas *S. suis*-infected mice developed an extremely low to undetectable CPS-specific immunoglobulin(Ig)M response, significant anti-CPS IgM titers were measured in GBS-infected animals. Yet, the amplitude of GBS CPS-specific Ab response remained relatively weak and no isotype switching was detected neither in *S. suis*- nor in GBS-infected mice. Purified GBS type III CPS retained similar immunogenic properties as those observed with intact bacteria. By contrast, purified *S. suis* and GBS type V CPSs were non-immunogenic antigens. Addition of the Toll-like receptor agonist CpG oligodeoxynucleotide was unable to restore the responsiveness of mice to *S. suis* type 2 CPS. No major immunosuppressive effect of purified GBS or *S. suis* CPS was noted on the *in vitro* capacity of splenic murine B cells to secrete Ig after CpG or B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) activation. While the expression of sialic acid was essential for the immunogenicity of GBS type III CPS, this sugar was not responsible of the inability of purified *S. suis* types 2 and 14 and GBS type V CPSs to induce a specific Ab response, nor on the failure of CpG to potentiate this response. Thus other biochemical criteria, unrelated to the presence of sialic acid, may be responsible for the inaptitude of the host immune system to recognize and/or to mount an effective response against *S. suis* and GBS CPSs.

## Introduction

*Streptococcus suis* and *Streptococcus agalactiae* (also known as group B *Streptococcus* [GBS]) are two encapsulated bacteria that induce similar pathologies, including septicemia and meningitis in animals and/or humans. *S. suis* is a major pig pathogen, responsible for important economic losses in the swine industry, as well as an emerging zoonotic pathogen in humans and responsible of deadly outbreaks in Asian countries. GBS is a leading cause of life-threatening invasive bacterial infections in neonates and pregnant women, as well as in the elderly and immunocompromised individuals. Among the 35 *S. suis* and 10 GBS serotypes identified, *S. suis* types 2 and 14 and GBS types III and V are the most virulent and frequently isolated (1-7).

For both pathogens, the capsular polysaccharide (CPS), which defines the serotype, is considered as a major virulence factor by protecting the bacteria against the host immune responses (8-11). However, the interplay of CPS with components of the innate immune system, including antigen-presenting cells (APCs), seems to differ radically between these two streptococci. Experiments using nonencapsulated mutants have shown that, in contrast to GBS CPS, *S. suis* CPS has a strong antiphagocytic effect and severely interferes with the activation and maturation of APCs (11-21). Whereas the structures of GBS types III and V CPSs have been determined since the beginning of the 90's (22, 23), the structures of *S. suis* types 2 and 14 CPSs have been elucidated only recently (24, 25). The four CPSs share structural and compositional features, being composed of glucose, galactose and *N*-acetylglucosamine, arranged into a repeating unit that contains a side chain terminated by sialic acid (*N*-acetylneuraminic acid). Remarkably, the presence of capsular sialic acid is a unique characteristic of *S. suis* and GBS among Gram-positive bacteria. Despite biochemical similarities, each CPS is composed of a unique arrangement of these sugars, conferring a distinct antigenicity. In addition, sialic acid forms an  $\alpha$ -2,6 linkage with the adjacent galactose in *S. suis*, in contrast to the  $\alpha$ -2,3 linkage in GBS. Sialic acid of bacterial polysaccharides has been suggested to be involved in immune evasion, especially by molecular mimicry and inhibition of complement activation (26-31). These immuno-modulations might depend on the nature of sialic acid linkages (30, 31). Thus, the differential expression of sialic acid between *S. suis* and GBS might disparately modulate host immune responses.

The role of humoral immunity, and in particular CPS-specific antibodies (Abs), in host defense against encapsulated bacteria has been well established (32, 33). The efficacy of protection of the different immunoglobulin (Ig) classes during bacterial infection is dependent on the specificity and affinity with the targeted antigen and on their biological functions. In this regard, by favoring bacterial opsonophagocytosis and/or by triggering the complement cascade directly at the surface of the pathogen, IgG is particularly effective at mediating bacterial elimination (34-37). Concerning *S. suis* and GBS, Abs directed against the CPS have a protective role in opsonophagocytosis assays and *in vivo* after passive transfer to animals before challenge (38-43). Paradoxically, the cellular and molecular mechanisms of the development of CPS-specific Ab responses remain still elusive. By their inaptitude to recruit T cells during humoral responses, categorizing them as “thymo-independent” (TI) antigens, purified CPSs are usually less immunogenic than proteins (44-46). Via their repeating epitopes, TI antigens are able to deliver strong and sustained intracellular signaling through multivalent membrane Ig cross-linking at the surface of specific B cells, resulting in an efficient and robust cell proliferation (44-46). However, the engagement of the B cell receptor by TI antigens is not sufficient to induce B cell activation, and a second signal is required, which may be provided by APCs via the release of B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF). This cytokine promotes Ig class switching of naïve B cells and their terminal differentiation into plasma cells in the absence of T cells (47-49). Mice genetically deficient in the expression of BAFF or its receptors display an abrogated IgG response specific to the synthetic TI model antigen, nitrophenol (NP)-Ficoll (50).

Beside cytokines, ligands of Toll-like receptors (TLRs) may also potentiate TI Ab responses. TLRs are a 13-member family of receptors expressed by mammalian leucocytes dedicated to the detection of pathogens and the subsequent shaping of innate and adaptive immunity. The engagement of TLR4 and TLR1/2 by lipopolysaccharide and triacylated lipoproteins, respectively, stimulates expression and production of BAFF by human and murine APCs, including dendritic cells (DCs) (47, 51-53). In addition, the binding of CpG oligodeoxynucleotides to TLR9 expressed by adult human and murine B cells induces up-expression of BAFF receptors (54-58). However, the adjuvant effectiveness of TLR ligands seems to depend on the TI antigen studied. For example, in mice, whereas CpG significantly increase the IgM and IgG responses to NP-Ficoll (54, 59) and to purified *Streptococcus pneumoniae* type 3 CPS (PS3) (60), this TLR agonist does not heighten the immunogenicity of purified *S. pneumoniae* types 6B, 19F and 23F CPSs (59).

Besides the better understanding of the mechanisms underlying TI Ab responses, some studies suggest that CPS may have intrinsic immunosuppressive properties. In humans, exposure to a vaccine containing purified *Neisseria meningitidis* group C CPS (61) or to Pneumovax (a 23-valent pneumococcal CPS vaccine) results in subsequent hyporesponsiveness to a second dose (62). Also, increasing concentrations of free CPSs in protein-conjugated *S. pneumoniae* types 4 and 6B CPSs impair anti-CPS Ab response in immunized mice (63, 64). *In vitro* studies demonstrated that some purified bacterial CPSs, including *N. meningitidis* group C (65) and *S. pneumoniae* type 14 or 19F CPSs (66), inhibit the maturation and the pro-inflammatory activities of human macrophages and/or DCs, and even polarize immune responses toward a regulatory profile. We have also previously shown that purified *S. suis* and GBS CPSs exert a partial inhibition on the ability of murine DCs to express BAFF (67). However, the consequences of these findings on the generation of humoral immunity remain a relatively neglected domain in glycoimmunology.

The goal of this study was thus to evaluate the influence of the biochemistry of CPSs on the development of the humoral response by comparing the features of the CPS-specific Ab response against *S. suis* types 2 and 14 and GBS types III and V in mice. We first determined the characteristics of this response after a clinical infection with live virulent strains and after immunization with purified CPSs. We then investigated the *in vitro* interactions of each purified CPS with murine B cells and soluble factors involved in TI Ab responses, including CpG and BAFF. The influence of sialic acid was analyzed using chemically desialylated CPSs.

## Materials and Methods

### *Mice*

Female 5- to 8-week-old C57BL/6 mice (Charles River Laboratories) were acclimatized to standard laboratory conditions with free access to water and rodent chow. All experiments were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animals Care and the principles set forth in the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* by the Animal Welfare Committee of the Université de Montréal.

### *Bacterial strains and growth conditions*

Encapsulated virulent *S. suis* serotype 2 strain P1/7 isolated from a pig with meningitis (68), *S. suis* serotype 14 strain DAN13730 isolated from a human with meningitis (69), GBS serotype III strain COH-1 isolated from an infant with bacteremia (70), and GBS serotype V strain CJB111 (ATCC BAA-23) isolated from a neonate with septicemia, were used for experimental infections. These strains were already used in earlier studies and were cultured as previously described (11, 16, 71). Briefly, bacteria were grown overnight onto sheep blood agar plates at 37°C and isolated colonies were cultured in 5 ml of Todd-Hewitt broth (THB; Becton Dickinson) for 8 h at 37°C. Then, 10 µl of a 10<sup>-3</sup> dilution of 8-h cultures were transferred into 30 ml of THB and incubated for 16 h (*S. suis*) or 12 h (GBS) at 37°C. Stationary-phase bacteria were washed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.3). Bacterial pellet was then resuspended in THB and adjusted to the desired concentrations. Non-encapsulated mutant strains  $\Delta cpsF$  derived from strain P1/7 (13),  $\Delta cps14b$  derived from strain DAN13730 (11),  $\Delta cpsE$  derived from COH-1 (18) and  $\Delta cpsE$  derived from CJB111 (16) were used as coating for ELISA evaluation of non-capsular, mainly protein-specific Ab response as described previously (72). For both encapsulated and non-encapsulated strains, aliquots of final bacterial suspensions were plated using an Autoplate 4000 automated spiral plater (Spiral Biotech) onto sheep blood agar plates, and colonies were accurately counted after overnight incubation at 37°C.



### *CPS purification and desialylation*

The native CPSs of *S. suis* serotype 2 S735 (ATCC 43765), *S. suis* type 14 strain DAN13730, GBS type III strain COH-1 and GBS type V strain CJB111, were purified as previously described (67). Desialylated CPSs were obtained by mild acid hydrolysis (67). Each purified CPS was subjected to rigorous physicochemical and immunologic quality control tests to ensure the identity and the purity of the CPS, the preservation of epitope recognition, and the absence of sialic acid in the desialylated preparations (67).

### *Bacterial infections*

A 1-ml volume of a live suspension of  $2 \times 10^7$  CFU of strain P1/7,  $5 \times 10^6$  CFU of strain DAN13730, or a 0.5-ml volume of a live suspension of  $2 \times 10^6$  CFU of strain COH-1 or  $10^4$  CFU of strain CJB111 was administered intraperitoneally (i.p.) in mice on day 0. Optimal bacterial doses were determined in standardization pre-trials and vary depending on the pathogenicity of each strain (data not shown). Negative control mice were injected with vehicle solution (sterile THB). Blood bacterial loads were assessed by collecting a 5  $\mu$ l blood sample from the tail of each mouse at 12 h post-infection. Proper dilutions were plated and bacterial numbers counted as described above. Samples were taken on days 7, 14 and 21 post-infection. To reduce the number of mice, on days 7 and 14, blood samples were collected from the tail vein of each mouse for anti-CPS Ig titration. On day 21, mice were euthanized and bled for anti-CPS and anti-protein Ig titration. The numbers of animals included in all experiments are detailed in the figure legends.

### *Immunizations*

In a first set of experiments aimed to compare the immunogenicity of purified *S. suis* types 2 and 14 and GBS types III and V CPSs, as well as to evaluate the influence of the presence of sialic acid, mice were immunized subcutaneously (s.c.) twice at 3-week interval with 2  $\mu$ g of each of native or desialylated CPS emulsified with STIMUNE® (Specol®; Prionics) following manufacturer's recommendations, in a final volume of 100  $\mu$ l. STIMUNE® is a water-in-oil adjuvant composed of purified and defined mineral oil (Markol 52) with Span 85 and Tween 85 as emulsifiers, which has been used as a good alternative to Freund's adjuvant for weak immunogens in animals (73). Placebo group received STIMUNE® alone. The amount of injected CPS was

chosen based on literature (60, 74). On days 7, 14, 21, 28, 35 and 42 post-immunization, blood samples were collected from the tail vein of each mouse for anti-CPS Ig titration.

In selected experiments aimed to evaluate the adjuvant effect of exogenous TLR agonists on the CPS-specific Ab response, mice were immunized s.c. with 2 µg of purified native or desialylated *S. suis* type 2 CPS in 100 µl of PBS on day 0, followed by an administration of 80 µg of CpG 1826 (InvivoGen) in 100 µl of PBS via the same route two days after. A group of mice similarly immunized with 2 µg of PS3 (ATCC 31-X), followed by 80 µg of CpG two days after, was included for comparative purpose. This immunization protocol was chosen based on literature (60, 74). Control group received native or desialylated *S. suis* type 2 CPS or PS3 on day 0 followed by PBS injection on day 2. Two placebo groups receiving only PBS or CpG were also included. On days 0 (before immunization), 7, 14 and 21 post-immunization, blood samples were collected from the tail vein of each mouse for anti-CPS Ig titration. On day 5, randomly selected mice of each group were euthanized and spleens were removed to enumerate CPS-specific Ab secreting cells (ASCs) by ELISpot (see below).

A last set of experiments aimed to evaluate the immunomodulatory effect of purified *S. suis* types 2 and 14 and GBS types III and V CPSs on the development of the ovalbumin (OVA)-specific Ab response. On day 0, mice were immunized i.p. with 10 µg of OVA (Sigma) in association with 2 µg of each individual native CPS in a final volume of 100 µl of PBS. A second dose with the same preparation was given on day 21 post-primary immunization. Control group received OVA alone on days 0 and 21. A placebo group receiving PBS alone was also included. On days 7, 14, 21 and 35 post-immunization, blood samples were collected from the tail vein of each mouse for anti-OVA Ig titration.

The numbers of animals included in the experiments are detailed in the figure legends.

#### *In vitro B cell stimulation assay*

Untouched B cells were purified from the spleen of naïve mice by negative selection using the B Cell Isolation Kit microbeads and magnetically activated cell sorting (MACS; Miltenyi Biotech) according to the manufacturer's instructions, and resuspended at 10<sup>6</sup> cells/ml in complete medium, consisting of RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 50 µM 2-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin-streptomycin and 20 µg/ml gentamycin (Gibco, Invitrogen). The enriched B cells had > 95% purity as determined

by fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis using anti-CD19 staining (data not shown).

To evaluate the immunomodulatory effect of purified *S. suis* types 2 and 14 and GBS types III and V CPSs on the ability of BAFF or CpG to stimulate B cells, these cells were co-incubated with 20 µg/ml of each individual native or desialylated CPS and 1 µg/ml of BAFF along with 50 ng/ml of IL-4 (BioLegend), as reported (75). Similarly, in a second set of experiments, B cells were co-incubated with 1 µg/ml of CpG and 20 µg/ml of each individual native or desialylated CPS. After 7 days, supernatants were collected for quantification of Ig secretion. In some experiments, B cells were pre-stimulated with CPS for 24 h prior to incubation with BAFF/IL-4 or CpG for 6 days. Cells stimulated with BAFF/IL-4 alone or CpG alone (without CPS) served as positive controls. In both set of experiments, Ig secretion in the supernatants of B cells incubated with medium alone, or each purified CPS alone, was also measured as an indication of the basal Ig secretion by B cells in the absence of CpG or BAFF/IL-4 stimulation.

## ELISA

(i) *Samples of in vivo assays.* For titration of protein-specific Abs in *S. suis*- or GBS-infected mice, Polysorb immunoplates (Nunc) were coated with the respective non-encapsulated mutant strains as described previously (72). After washes in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T), mouse sera were serially diluted (two-fold) in PBS-T (starting with a dilution of 1/50) and incubated 1 h at room temperature (RT). After washes in PBS-T, plates were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse total Ig (IgG plus IgM), IgG (Jackson Immunoresearch) or IgM (Southern Biotech) Abs for 1 h at RT. Plates were developed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB; Invitrogen) substrate, and the enzyme reaction was stopped by addition of 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance was read at 450 nm with an ELISA plate reader. The reciprocal of the last serum dilution that resulted in an optical density (OD<sub>450 nm</sub>) equal or lower than 0.2 (cutoff) was considered the titer of that serum. When the OD<sub>450 nm</sub> of the first dilution of a serum was lower than the cutoff, its titer was arbitrary fixed to 50. For titration of CPS- or OVA-specific Abs, a solution of 2 µg/ml of purified native *S. suis* type 2 or 14 or GBS type III or V CPS in carbonate buffer 0.1 M pH 9.6, or PS3 or OVA in PBS (100 µl/well) was added overnight on Polysorb immunoplates at 4°C. Free sites were then blocked 1 h at RT with 1% BSA in PBS before addition of mouse serum dilutions. CPS- and OVA-specific Ab titers were determined as described above.

To control inter-plate variations, we added an internal reference positive control to each plate. For *S. suis* or GBS CPS- or protein-specific ELISA, this control was a pool of sera from mice hyperimmunized i.p. with  $10^9$  CFU of heat-killed whole *S. suis* or GBS of the respective serotypes. For PS3-specific ELISA, this control was a pool of sera from mice immunized s.c. with 0.5  $\mu$ g of PS3 followed by 80  $\mu$ g of CpG two days after. For OVA-specific ELISA, this control was a pool of sera from mice co-immunized i.p. with 10  $\mu$ g of OVA plus 20  $\mu$ g of CpG. Reaction in TMB was stopped when an OD<sub>450 nm</sub> of 1 was obtained for the positive control. Optimal dilutions of the coating antigen, the positive internal control sera and the peroxidase conjugated anti-mouse Abs were determined during preliminary standardizations.

(ii) *Samples of in vitro assays.* The total IgM and IgG levels in B cell culture supernatants were measured with a Mouse IgM or a Mouse IgG ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratory), respectively, according to the manufacturer's instructions. Twofold dilutions of mouse reference IgM or IgG serum (Bethyl Laboratory) were used to generate standard curves. Sample dilutions giving OD readings in the linear portion of the appropriate standard curve were used to quantify the levels of Ig.

### *ELISpot*

Spleens from mice immunized with native or desialylated *S. suis* type 2 or PS3 (with or without CpG) or from placebo groups, as described above, were harvested and pressed gently through a sterile fine wire mesh. After incubation with NH<sub>4</sub>Cl lysing buffer (eBioscience) to remove red blood cells, total splenocytes were resuspended in complete medium. Assays were performed using 96-well MultiScreen high protein binding immunobilon-P membrane plates (Millipore) coated with 2  $\mu$ g/ml of purified native *S. suis* type 2 or PS3 in PBS, overnight at 4°C. Plates were then washed in PBS and blocked for 2 h at 37°C with complete medium. Splenocytes were serially diluted (two-fold) in complete medium (starting with a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/ml) and 100  $\mu$ l/well of each dilution was incubated on the plates for 24 h at 37°C. Subsequently, plates were washed in PBS-T and incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse total Ig (IgG plus IgM) Abs for 2 h at RT. Plates were developed with TMB substrate. Spots were counted using a CTL ImmunoSpot S4 ultraviolet Analyzer (Cellular Technology). Each individual spot was used as an indicator for a specific ASC, and data were expressed as the number of ASCs/ $10^6$  total splenocytes. Optimal dilutions of the coating antigen and the peroxidase conjugate were determined during preliminary standardizations.

### *Statistical analysis*

Data were analyzed for significance using analysis of variance (ANOVA) with the Sigma Plot System (v11.0; Systat Software). A  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

## Results

### *Distinct features of the CPS-specific Ab response between mice infected with live S. suis and GBS*

In order to compare the features of the humoral immunity against *S. suis* and GBS CPSs, we first infected mice with live virulent strains of *S. suis* types 2 or 14 or GBS types III or V, and evaluated the kinetics, magnitude and isotype profile of the induced anti-CPS Ab response. The protein-specific Ab response was also measured in parallel for each bacterial strain. Bacteremia was detected in all infected mice at 12 h post-infection, ranging from  $\sim 10^4$  to  $10^7$  CFU/ml for *S. suis* types 2 and 14, from  $10^2$  to  $10^6$  CFU/ml for GBS type III and from  $10^2$  to  $5 \times 10^3$  CFU/ml for GBS type V, in accordance with previous studies (11, 71) (Fig. S1). Mice infected with *S. suis* types 2 and 14 developed a significant anti-protein Ab response. It was mainly composed of IgG, with an almost 300-fold increase in titers *versus* non-infected mice (Fig. 1A and 1B). In contrast to the protein response, either a weak anti-CPS IgM response was observed from day 14 to day 21 post-infection in *S. suis* type 2-infected mice, or a complete absence of significant anti-CPS titers was noticed in *S. suis* type 14-infected animals (Fig. 1A and 1B). In opposition to *S. suis*-infected mice, GBS-infected animals presented a significant CPS-specific Ab response as soon as day 7, which remained stable until day 21 (Fig. 1C and 1D). However, the magnitude was also relatively low, with a 20-fold and 8-fold increase in IgM titers in GBS type III and GBS type V-infected mice, respectively. In addition, no IgG anti-CPS titers were detected in GBS-infected mice (Fig. 1C and 1D). Surprisingly, even if some GBS type III- or GBS type V-infected mice exhibited a significant protein-specific Ab response, this response was globally low.

### *Features of the CPS-specific Ab response in mice immunized with purified S. suis and GBS CPSs*

A live bacterium contains numerous protein and polysaccharide antigens that are secreted and/or intimately co-expressed within an organized particulate structure owning multiple adjuvanting moieties. This may confer unique immunogenic properties to the CPS expressed in the context of an intact bacteria (33). In order to directly evaluate the influence of the CPS biochemistry on the development of the humoral immunity against *S. suis* and GBS CPSs, we then immunized mice with purified *S. suis* type 2 or 14 or GBS type III or V CPS, and compared the features of the induced

primary anti-CPS Ab response (Fig. 2). Similarly to results obtained with live bacteria, the specific Ab response in mice immunized with *S. suis* type 14 CPS remained undetectable throughout the experiment (Fig. 2B). At the difference of mice infected with live *S. suis* type 2 or GBS type V, anti-CPS Ab titers were no longer measured in mice immunized with the CPS purified from these two pathogens (Fig. 2A and 2D). By contrast, we observed a significant response in mice immunized with purified CPS from GBS type III, with a similar amplitude and kinetics to what was monitored after infection with the bacteria (Fig. 2C). This response was composed of IgM, and no IgG was detected (data not shown). In accordance with the inability of purified TI antigens to generate an amplified reaction subsequent to a second administration (76, 77), no differences in the kinetics, magnitude or isotype profile were observed between primary and secondary specific Ab responses against each of the four CPSs (Fig. S2). Therefore, whereas the presence of subcapsular and/or secreted bacterial components may be required for the generation of *S. suis* type 2 and GBS type V CPS-specific Abs in mice, GBS type III CPS owns intrinsic immunogenic properties.

*Influence of sialic acid on the features of the CPS-specific Ab response in mice immunized with purified S. suis and GBS CPSs*

The expression of sialic acid by pathogens has been demonstrated to be a subversive strategy to interfere with host immunity by preventing complement activation on microbial surfaces (26-29), as well as by binding to inhibitory receptors expressed by innate immune cells (19, 30, 31, 78). However, the consequences of sialic acid expression on the development of humoral responses remain poorly explored. As the deletion of genes involved in sialic acid synthesis results in considerable or complete loss of CPS expression by *S. suis* and GBS (11, 79, 80), the influence of this sugar has been evaluated by using purified chemically desialylated CPSs. As depicted in Fig. 2 and S2, no difference in the CPS-specific Ab response was observed between mice immunized with native and desialylated *S. suis* type 2, *S. suis* type 14 or GBS type V CPS. In contrast, a significant decrease in GBS type III CPS-specific Ab response was detected in mice immunized with desialylated CPS, with Ab titers returning to basal levels of the placebo group (Fig. 2C and S2C). This is in accordance with previous studies demonstrating that sialic acid exerted a conformational control of the helical structure of the immunodominant epitope of this CPS (81, 82). Therefore, whereas the presence of sialic acid may not exert major modulatory effect on the poor ability of purified *S. suis* types 2 and 14 and GBS type V

CPSs to induce a specific Ab response in mice, the expression of this sugar is essential for the immunogenicity of GBS type III CPS.

#### *In vivo effect of exogenous TLR agonists on S. suis type 2 CPS-specific Ab response*

In comparison with *S. suis* type 2 CPS expressed in the context of an intact bacteria, the complete loss in the immunogenicity of the same antigen administered under a purified form suggests that bacterial non-capsular factors could potentiate the development of CPS-specific humoral response. We thus evaluated if an exogenous TLR agonist, expected to mimic some of the co-signals provided by whole bacteria, could modulate the magnitude of the Ab response directed to purified *S. suis* type 2 CPS. We focused our work on CpG because previous studies have demonstrated that this TLR9 agonist amplified the humoral reaction against purified bacterial CPS, provided that they were administered few days after immunization with the CPS (60, 74). Nevertheless, by following the same experimental protocol, no improvement of the *S. suis* type 2 CPS-specific serum Ab response was obtained when CpG was injected to mice, and Ab titers remained undetectable from day 7 to day 21 (Fig. 3A). This was in sharp opposition with the significant adjuvant effect observed on total Ig (IgG plus IgM) PS3-specific serum Ab response during the same period (Fig. 3A). Similarly to previous reports (60, 74), CpG promoted a rise of both IgM and IgG anti-PS3 titers (Fig. S3). The inability of CpG to potentiate *S. suis* type 2 CPS-specific Ab response may not be related to the expression of sialic acid, as a similar result was obtained in mice immunized with desialylated CPS plus CpG (Fig. 3A). In accordance with results obtained with serum Ab titers, CpG injection significantly increased the number of splenic anti-PS3 ASCs, whereas specific ASCs were not detected in the spleen of mice immunized with native or desialylated *S. suis* type 2 CPS, whether mice received CpG or not (Fig. 3B and 3C).

#### *In vitro study of the immunomodulatory effect of purified S. suis and GBS CPSs*

In order to get a better understanding of the cellular and molecular mechanisms responsible for the poor immunogenicity of *S. suis* types 2 and 14 and GBS type V CPSs, as well as the relatively higher ability of GBS type III CPS to induce a specific Ab response, we compared the *in vitro* interactions of each purified CPS with naive B cells isolated from mouse spleen, a central organ in the implementation of Ab reaction against TI antigens (83-86). We evaluated in particular the immunomodulatory effect of CPSs on the capacity of B cells to secrete Ig in response to soluble factors critically



involved in the generation of TI humoral immunity. We first assessed the interplay of CPS with the ability of BAFF to promote Ig secretion by B cells. Stimulation with BAFF along with IL-4 was required for Ig production, and cells incubated with media or each CPS alone did not secrete detectable levels of IgM or IgG (Fig. 4, left panels). Co-stimulation of B cells with BAFF/IL-4 and each CPS did not decrease the concentration of IgM or IgG in culture supernatants in comparison with cells stimulated with BAFF/IL-4 only (Fig. 4, central panels). Similarly, no decrease in IgM or IgG release was observed when B cells were pre-incubated with CPS before addition of BAFF/IL-4 *versus* non-pretreated cells (Fig. 4, right panels). There was indeed an overall tendency to an increase of Ig production by B cells with combined CPS/BAFF/IL-4 treatment, which seems to be related to the presence of sialic acid (Fig. S4). We then evaluated the effect of *S. suis* and GBS CPSs on CpG-induced Ig secretion by B cells. No immunoregulatory action was observed by the different CPSs (either native or desialylated) on the ability of CpG to bring about IgM or IgG production by B cells, whether CPS was added 24 h before or simultaneous to CpG (Fig. 5 and S5). Therefore, in our hands, the poor immunogenicity of *S. suis* and GBS type V CPSs could not be explained by the induction of an immunosuppressive state of B cells making them unreactive to BAFF- or CpG-stimulation.

#### *Study of the immunomodulatory effect of purified S. suis and GBS CPSs on a TD response*

In the light of reported immunosuppressive effect of encapsulated bacteria on the generation of humoral immunity specific to heterologous proteins (87), as well as the ability of purified microbial polysaccharides to interfere with the presentation of TD antigens by APCs (88-90), we assessed if purified *S. suis* and GBS CPSs could prevent the development of OVA-specific Ab response in mice. We chose this TD antigen model because bacterial CPSs have been previously described to impede the activation of OVA-specific T cells (91). As shown in Fig. 6, co-injection of OVA with *S. suis* type 2 or 14 or GBS type III or V CPS did not hamper the generation of primary OVA-specific Ab response. Except for a slight inhibitory effect of *S. suis* type 14 CPS, no major influence of *S. suis* or GBS CPS was noticed on the generation of memory OVA-specific Ab response. Similar results were obtained regardless of the concentration of CPS (2 or 20 µg) and route of immunization (s.c. or i.p.) (data not shown).

## Discussion

Humoral response is the main mechanism of host adaptive immunity in the fight against infections with extracellular pathogens. Via their biological functions of opsonophagocytosis, CPS-specific IgG allow clearance of bacteria by the innate immune system. This is the rationale for the development of vaccines against *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* and *Haemophilus influenzae* infections in humans (32, 33). Despite being an important pig pathogen and an emerging threat to human health, no efficient vaccine against *S. suis* is currently available. Whole-cell killed bacterins used in the field provide limited protection and experimental live-attenuated vaccines have been tried with contradictory results. Moreover, the high genotypic and phenotypic variations among *S. suis* strains of different geographical origins may preclude the use of protein subunit vaccines (92). Concerning GBS, despite that protein-based vaccines confer potent defense in clinical trials, they generally do not provide broad-coverage protection (93). For both *S. suis* and GBS, the CPS represents a target of choice in the fight against these two pathogens, not only because CPS-specific Abs display a good protective potential in experimental trials (38-43), but also because a vaccine composed of CPSs purified from several serotypes is the key for an universal vaccine. However, the design of CPS-based vaccines is a neglected area of research on *S. suis*, and the efficacy of in-trial GBS vaccines depends on the serotype of the CPS included in the preparations (43, 94). Indeed, CPSs of types Ia, Ib, II and III induce strong protective IgG responses, whereas GBS type V CPS promotes higher concentrations of specific IgM than IgG. Yet, the mechanisms of the generation of *S. suis* and GBS CPS-specific Ab responses, as well as the influence of intrinsic immunomodulatory properties of CPS on its immunogenicity, have been poorly explored.

Our work is the first to compare, within a same study, the impact of the composition and/or the structure of *S. suis* types 2 and 14 and GBS types III and V CPSs on the generation of humoral response, including the influence of the presence of sialic acid.

Bacterial CPSs are classically encountered by the host immune system covalently attached to the underlying subcapsular domain. We thus initially compared the anti-CPS Ab response subsequent to a clinical infection with live virulent *S. suis* type 2 or 14 or GBS type III or V in mice. A distinct pattern was noticed between the two bacterial species. Whereas *S. suis*-infected mice developed an extremely low (*S. suis* type 2) to undetectable (*S. suis* type 14) CPS-specific IgM response, significant anti-CPS IgM titers were measured in GBS-infected animals, with a rapid kinetics of

induction. Despite these discrepancies, the amplitude of GBS CPS-specific Ab response remained relatively weak and no isotype switching was observed neither in *S. suis*-, nor in GBS-infected mice. Therefore, CPS-specific Ab responses to whole GBS and *S. suis* type 2 exhibit typical features of a TI reaction.

Previous studies demonstrated that the expression of CPS differently modulates the interactions of whole *S. suis* and GBS with host innate immunity. Experiments using nonencapsulated mutant strains showed that *S. suis* types 2 and 14 CPSs crucially protect bacteria from phagocytosis by APCs, including DCs and macrophages (11-15, 17, 21). Remarkably, *S. suis* type 2 CPS does not act simply as an inert physical barrier against phagocytes, but actively down-modulates signaling pathways involved in phagocytosis (15, 95). In addition, *S. suis* types 2 and 14 CPSs severely interfere with the release of most of the cytokines produced by *S. suis*-infected myeloid cells (12-14, 96), and also impair DC maturation (12, 14) (and unpublished observations). In contrast to *S. suis*, GBS types III and V are highly internalized by APCs (16, 18-21, 97) and do not significantly impede DC maturation or cytokine secretion by these cells (16, 18). Therefore, the different interplay of *S. suis* and GBS with innate immune cells may promote distinct adaptive immune reactions and may explain the disparate CPS-specific humoral response that we have observed between the two pathogens. The dissimilar and globally weak CPS-specific Ab responses subsequent to infection with *S. suis* and GBS could be attributed to the immunomodulatory influence of (distinct) secreted factors and/or subcapsular components expressed within the bacteria as well as the kinetics of bacterial multiplication, dissemination and survival in the host. In this regard, the total anti-protein response was also dissimilar between these two bacterial species. In contrast to *S. suis* and GBS, it was reported that immunization with intact heat-killed *S. pneumoniae* capsular type 14 induces a strong anti-CPS IgM and IgG response (98). On the other hand, a relatively modest IgM and IgG anti-CPS response was observed after immunization with inactivated *N. meningitidis* serogroup C, a Gram-negative bacterium (99). Authors suggested that the nature of the *in vivo* anti-CPS response is markedly influenced by the composition and/or architecture of the bacterial subcapsular domain. Using inactivated GBS type III immunization, not only a relatively high anti-CPS IgM response but also modest IgG titers were observed (100). This observation adds another level of complexity to the analysis of the features of the anti-CPS responses against whole bacteria, as live organisms might behave differently from inactivated ones. Therefore, the distinct features of the CPS-specific Ab response that we have obtained in our experimental infections with live bacteria, such as the IgM-

restricted isotype profile, might also be related to the influence of antigens selectively produced *in vivo*.

Several studies have also suggested that the anti-CPS responses to intact bacteria *versus* isolated CPS are distinct (98-100). This was the case in the present study for *S. suis* type 2 and GBS type V, for which the anti-CPS response absolutely depended on CPS expression on the bacterial surface. In the case of purified *S. suis* type 2 CPS, the complete lack of immunogenicity as a soluble antigen was observed at different doses (ranging from 1 to 25 µg) and despite addition of different adjuvants (unpublished observations). Similarly, whereas purified *S. pneumoniae* type 14 CPS behaves as a TI antigen, its expression at the surface of intact bacteria markedly increased its immunogenicity in mice (98, 101). This includes a newly acquired capacity to recruit T cell help in the development of humoral response, displayed by high titers of CPS-specific IgG.

Besides secreted and/or closely co-expressed non-capsular antigens by the bacteria, intrinsic properties of the CPS itself may also direct the development of CPS-specific Ab responses. One particular biochemical element which may play a crucial role is sialic acid. This sugar is widely expressed at terminal positions of glycoconjugates exposed at the surface of most mammalian leucocytes and, by interacting with sialic-acid binding lectins (Siglecs) expressed on the same cell (*cis* interaction), it maintains a constitutive inhibitory tone of immune cells (30, 102-105). Remarkably, sialylated bacteria can exploit these receptors to dampen immune responses (30, 31). However, our study suggests that sialic acid does not significantly modulate the generation of Ab response specific to *S. suis* and GBS CPSs, and variations in the composition and/or in the ratio of sugars in the repeating units, in the structure, and/or in the molecular weight may account for the different immunogenic properties of purified GBS type III *versus* *S. suis* types 2 and 14 and GBS type V CPSs. In contrast to our results, chemical alteration of sialic acid of purified *N. meningitidis* group B CPS greatly improved immunogenicity of the CPS, including IgG isotype switching in mice (106). A CPS-specific IgM-to-IgG isotype switching was also observed in macaques immunized with purified desialylated GBS type V CPS in comparison with animals receiving the native form of the CPS (94). However, a TD form of the CPS (CPS conjugated to a carrier protein) was used in both studies, which may explain the divergent conclusions with the present work. In this regard, modifications of sialic acid of unconjugated *N. meningitidis* group B CPS had no influence on its immunogenicity (106). Interestingly, the incorporation of  $\alpha$ -2,6 sialic acid residues on the synthetic TI antigen NP-haptenated polyacrylamide (PA) not only

completely abolished its immunostimulatory properties, but also tolerized murine B cells to a subsequent challenge with the unsialylated NP-PA (107). Authors of these experiments demonstrated that sialic acid exerted its immunosuppressive effect by interacting directly with Siglec CD22, an inhibitory co-receptor of B cells specific for  $\alpha$ -2,6 sialosides, rather than through accessory cells (107). However, it is important to note that in this study, the synthetic antigen was specially designed to express sialic acid with high affinity for CD22, in order to outcompete with natural host *cis* ligands. Also, the highest specificity of CD22 is for a member of the sialic acid family (*N*-glycolylneuraminic acid) which is different from the form expressed by *S. suis* and GBS CPSs (*N*-acetylneuraminic acid).

Some evidences suggest the poor immunogenicity of bacterial CPSs are related to their suppressive action on BAFF and its receptors (75). Whereas we have previously demonstrated that purified *S. suis* types 2 and 14 and GBS types III and V CPSs partially impaired *in vitro* BAFF expression by murine DCs (67), in the present study, we were unable to see a down-modulatory effect of these CPSs on the ability of exogenous BAFF to induce *in vitro* Ig secretion by murine B cells. Contrary to our results, in addition to blunt BAFF production by DCs, purified *N. meningitidis* group C CPS partially inhibited the *in vitro* response of murine B cells to BAFF stimulation (75). These abrogated functions were correlated with the decrease in the expression of BAFF receptors on the B cell surface (75).

The strong immunosuppressive effect of the *N. meningitidis* group C CPS can be explained by its chemical composition, an  $\alpha$ -2,9 linked homopolymer of sialic acid,. The highest degree of presentation of sialic acid molecules by *N. meningitidis* group C CPS might result in an interaction of higher affinity with host Siglecs than *S. suis* and GBS CPSs. Variations in experimental conditions can also account for the observed differences, including the mouse strain origin and the subsets of B cells used. Indeed, our *in vitro* B cell culture model did not include all the B cell subsets susceptible to be involved in TI Ab responses. In particular, we have focused our work on B2 B subsets (including both marginal zone and follicular B cells), and we did not evaluate the interactions of *S. suis* and GBS CPSs with B1 B cells, an important cellular population in polysaccharide-specific Ab responses (77, 84, 85, 108). However, both B1 and B2 subsets were affected by the immunosuppressive effect of *N. meningitidis* group C CPS (75), and *in vivo* tolerance induction exerted by sialylated NP-PA targeted, at least in part, follicular B cells (107). Finally, we have no explanations for the apparent tendency of our CPSs preparations to increase B cell responsiveness to BAFF, an effect that seems to be favored by the presence of sialic acid.

In parallel to well-defined adjuvant properties of TLR agonists on TD Ab responses, several experimental clues suggest that they also heighten TI Ab responses. Purified B cell subsets preferentially involved in TI responses are particularly well reactive to *in vitro* stimulation by TLR ligands (109). In addition, these molecules induced BAFF production by innate immune cells (47, 51-53), promoted the expression of BAFF receptors by B cells (54-58), and the co-engagement of TLRs and BAFF receptors synergized to improve B cell activation in the absence of T cell help (110). *In vivo*, the co-immunization of purified PS3 with CpG enhanced the CPS-specific Ab response in adult mice, restored responsiveness of infant mice to this TI antigen, and conferred protection in animals against a subsequent challenge with live *S. pneumoniae* with similar efficiency and longevity as a PS3-tetanus toxoid conjugate vaccine (60, 74). It was demonstrated that CpG exerts its adjuvant effect directly on TI-specific B cell clones by promoting survival, proliferation and plasma cell differentiation (74). In contrast to PS3, no raise in specific Ab titers was observed in mice immunized with *S. suis* type 2 CPS along with CpG. Similar to our results, co-injection of mice with CpG and purified *H. influenzae* type b or *N. meningitidis* group C CPS does not improve the specific humoral response (75, 111). In accordance with these observations, *in vitro* reports indicated that some purified microbial polysaccharides limit TLR-driven stimulation of host immune cells. For example, purified *Cryptococcus neoformans* and *N. meningitidis* group C CPSs inhibit the ability of LPS to induce pro-inflammatory cytokines production by and/or maturation of macrophages and DCs (65, 112). A binding competition between LPS and *N. meningitidis* group C CPS for CD14 has been suspected to be responsible for the observed inhibitory effect (65). Negative cross-talk between lectin receptors and TLRs has been also mentioned. For instance, the interplay of arabinomannan purified from *Mycobacterium tuberculosis* with mannose receptor (113), and sialylated mucins of *Trypanosoma Cruzi* with Siglec-E (114), interferes with the LPS-induced secretion of IL-12 by DCs. This antagonism in signaling pathways between TLRs and lectin receptors might explain why a delayed administration of TLR agonists is required to see a boosted CPS-specific Ab response. However, in the case of *S. suis* type 2 CPS, the inefficacy of CpG is unlikely related to such a negative cross-talk between Siglecs and TLRs, because specific Ab titers remained undetectable in mice immunized with desialylated CPS adjuvanted with CpG. We did not observe either an immunosuppressive or immunomodulatory effect of purified *S. suis* CPS or GBS CPS on CpG-mediated Ig secretion by B cells in our *in vitro* culture system. Noteworthy, the TLR4 agonist monophosphoryl lipid A did not exert any adjuvant effect on *S. suis* type 2 CPS-specific Ab response in mice

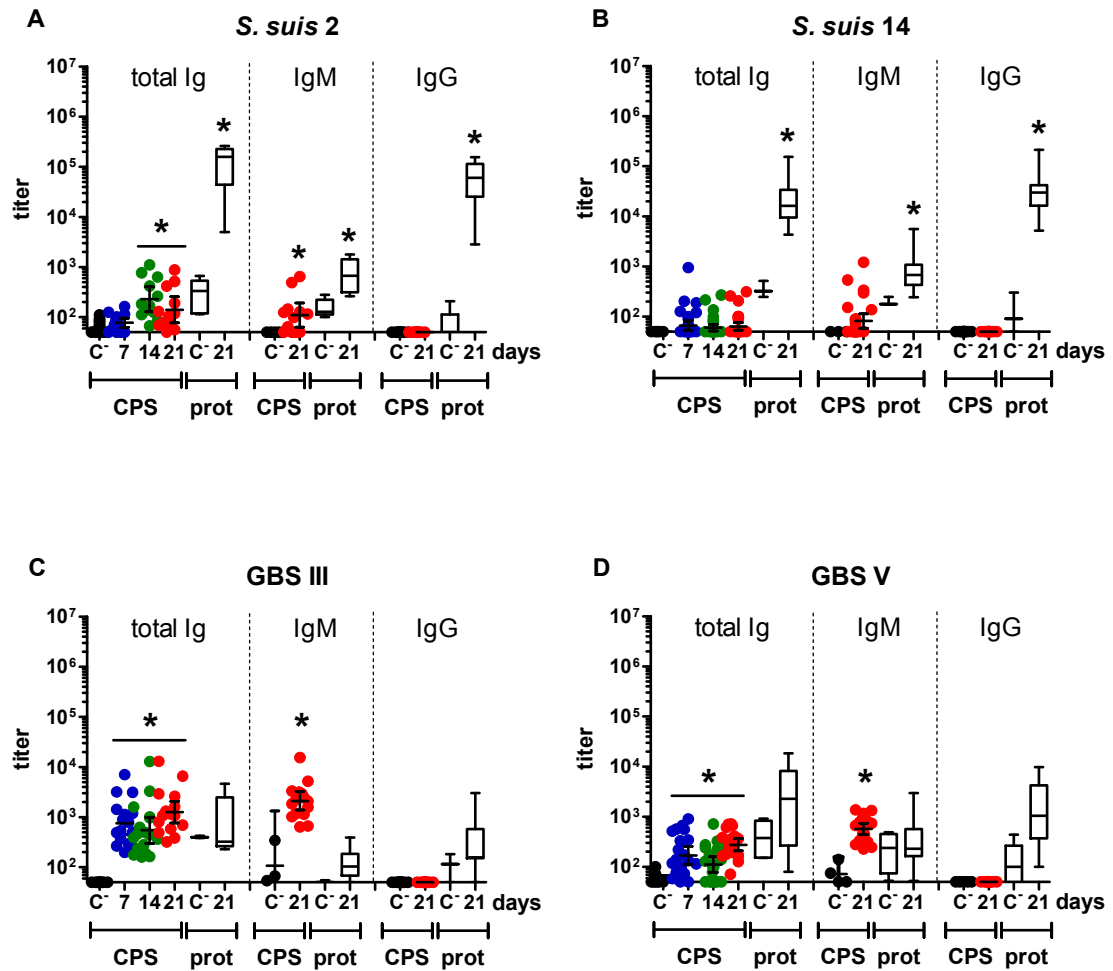
(unpublished observations), despite the fact that this ligand has the capacity to restore the immunogenicity of a synthetic sialylated TI antigen (107).

Whereas it has been proven that bacterial subcapsular components could inhibit the development of humoral immune response specific to heterologous soluble TD antigens (87, 115), the ability of purified CPS to exert such an effect has been poorly evaluated. Some *in vitro* studies have reported that the polysaccharides Ficoll, dextran, arabinomannan and arabinogalactan interfere with the presentation of TD antigen by murine or human APCs (88-90). The inhibitory mechanisms remain poorly known, but would be associated with the retention and the accumulation of the polysaccharide inside the vesicles of APCs with consequent impairment of normal function and recycling of endocytic vesicles (88). For instance, it has been shown that *N. meningitidis* group B CPS impaired the fusion between phagosomes and lysosomes in human macrophages (116). However, despite these observations, the co-injection of purified *S. suis* or GBS CPS with OVA did not significantly dampen the generation of OVA-specific Abs in mice.

In conclusion, we have found that CPS expressed from two distinct serotypes of two different Gram-positive streptococci, *S. suis* and GBS, are poorly immunogenic antigens. The inability of host to mount an effective Ab response specifically directed against the CPS of these two pathogens cannot be explained by the capacity of sialic acid on its own to have instructed immune cells to recognize CPS as a “self-antigen” or to actively dampen B cell functions. The failure of exogenous TLRs ligands as well as intact bacteria, where CPS is associated to a particulate structure with numerous adjuvanting moieties, to generate an optimal anti-CPS response might be related to the intrinsic biochemical properties of these CPSs. Yet, the major conclusion of this work, and in contrast to sialylated Gram-negative bacterial CPSs, is that terminal sialic acid of Gram-positive bacterial CPSs does not exert an inhibitory effect on the anti-CPS humoral response.

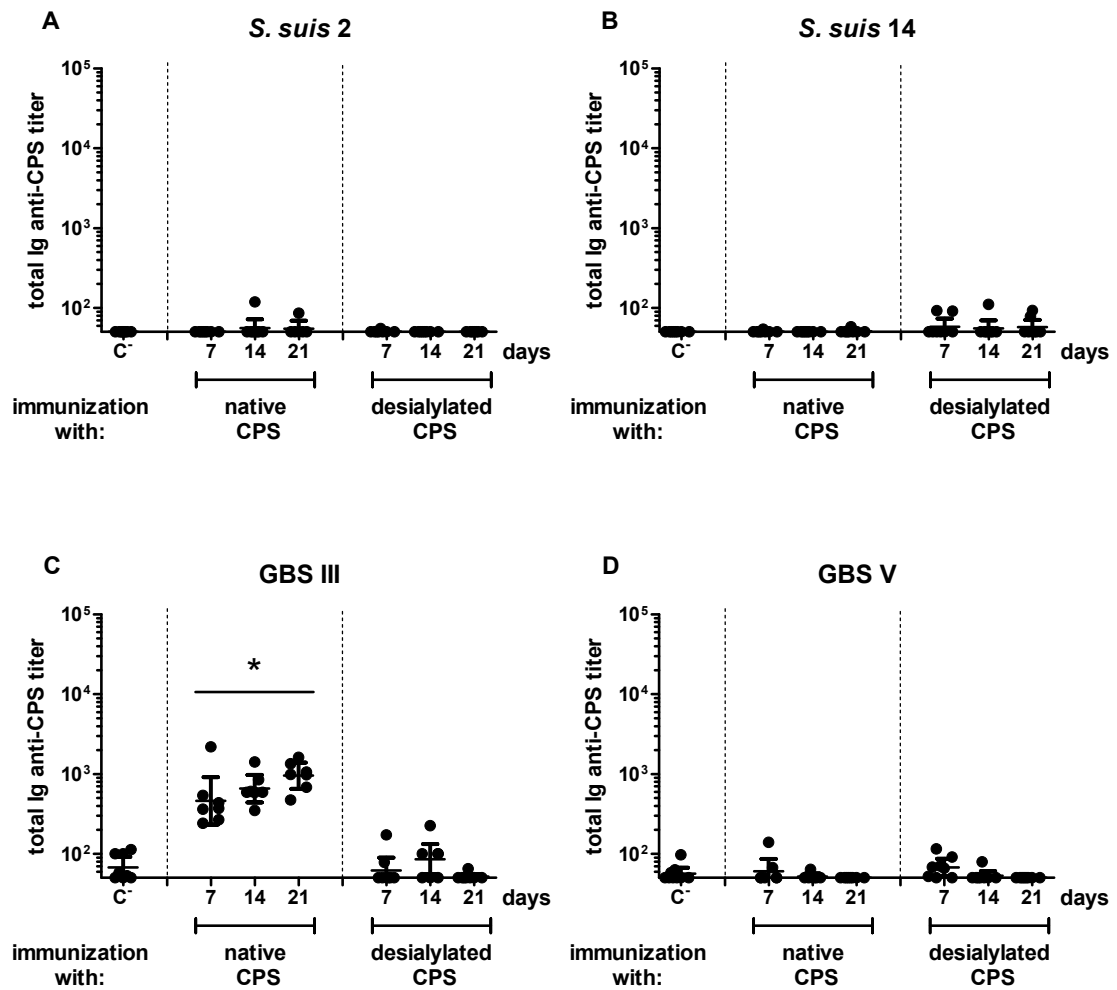
### **Acknowledgements**

This work was mainly supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through a grant to MS (#342150). Partial contribution was also provided by Canadian Institutes of Health Research grant to MS and MG.

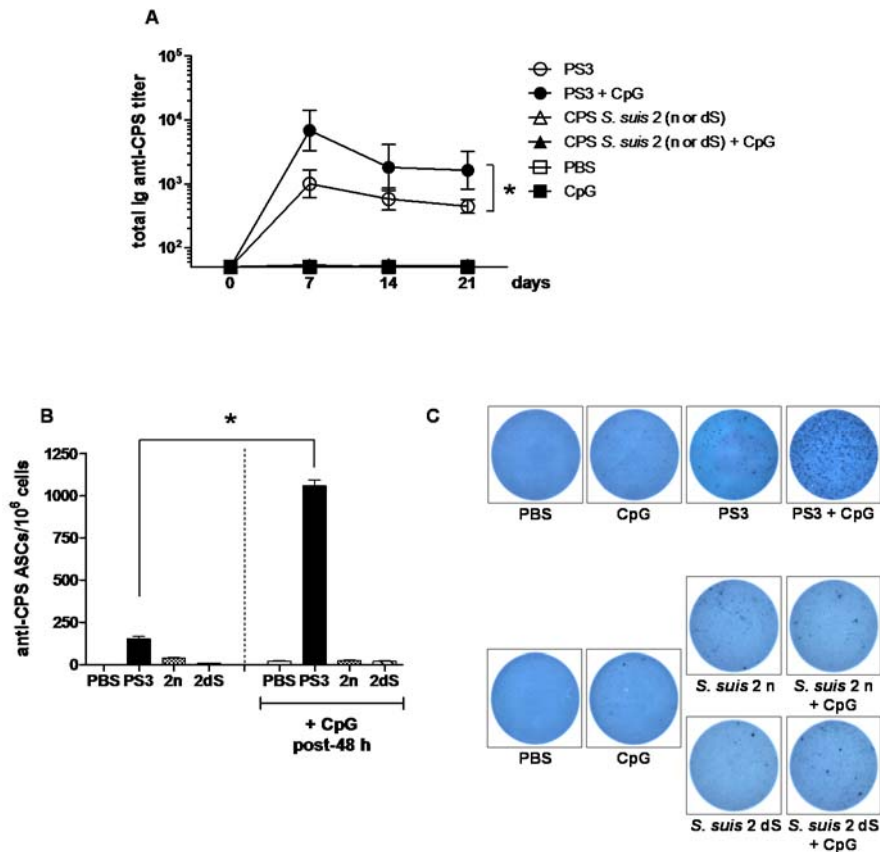


**Figure 1. Titration of CPS-specific Abs in mice after infection with *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V.** Mice were infected with  $2 \times 10^7$  CFU of live *S. suis* serotype 2 ( $n = 60$ ) (A),  $5 \times 10^6$  CFU of live *S. suis* serotype 14 strain DAN13730 ( $n = 40$ ) (B),  $2 \times 10^6$  CFU of live GBS serotype III strain COH-1 ( $n = 40$ ) (C), or  $10^4$  CFU of live GBS serotype V strain CJB111 ( $n = 40$ ) (D). Total Ig (IgG plus IgM) anti-CPS titers were determined by ELISA on days 7, 14 and 21 in surviving mice. IgM and IgG anti-CPS titers were determined on day 21. Data from individual mice are presented, including the geometric mean with 95% confidence interval. For comparative purpose, total Ig (IgG plus IgM), IgM and IgG anti-protein titers were also determined on day 21 and presented in a box-and-whisker diagram (ends of whiskers represent the minimum and the maximum value). «C-» represents a pool of control mice ( $n = 3$ ) injected with vehicle solution (THB), whose titers were evaluated on days 7, 14 and 21. \*, statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) in comparison to the respective C- group.

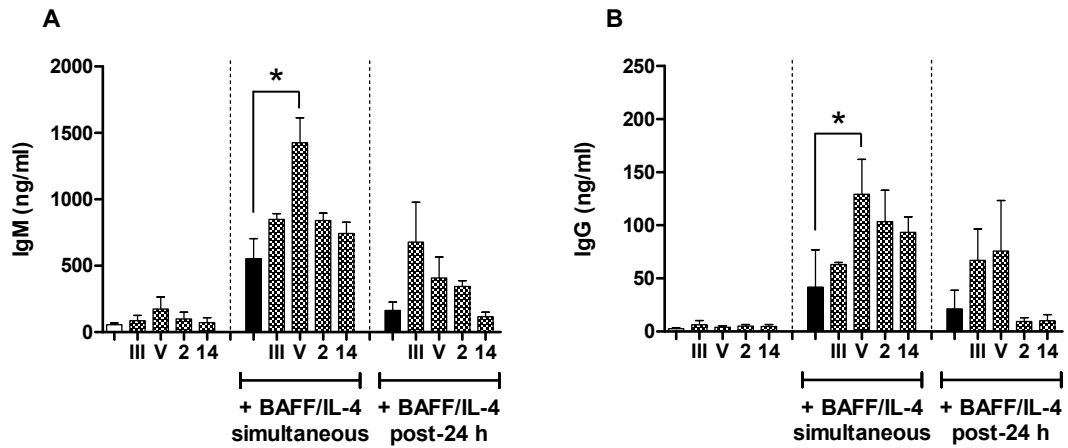




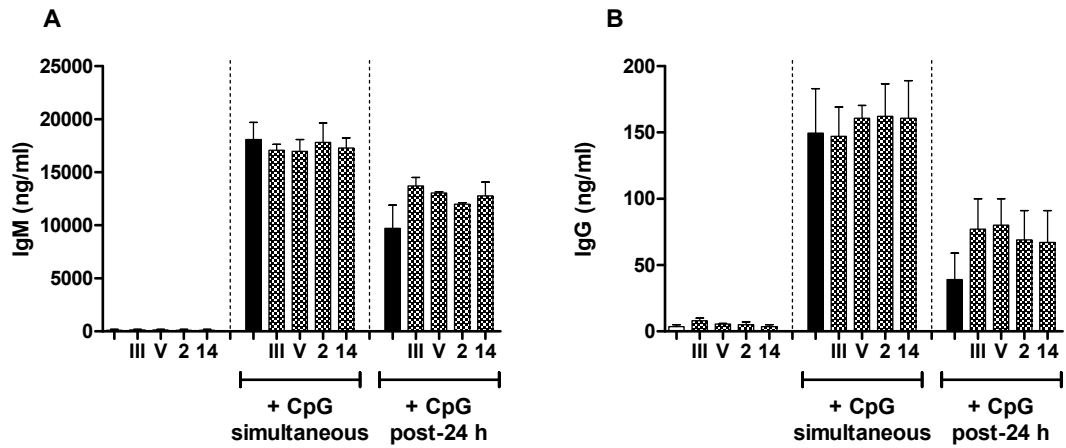
**Figure 2.** Titration of CPS-specific Abs in mice after immunization with purified native or desialylated *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS. Mice ( $n = 8$ ) were immunized with  $2 \mu\text{g}$  of purified native or desialylated *S. suis* serotype 2 (A), *S. suis* serotype 14 (B), GBS serotype III (C), or GBS serotype V (D) CPS emulsified with STIMUNE®. Total Ig (IgG plus IgM) anti-native CPS titers were determined by ELISA on days 7, 14 and 21. «C<sup>-</sup>» represents a pool of control mice ( $n = 3$ ) injected with STIMUNE® only, whose titers were evaluated on days 7, 14 and 21. Data from individual mice are presented, including the geometric mean with 95% confidence interval. \*, statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) in comparison to the C<sup>-</sup> group.



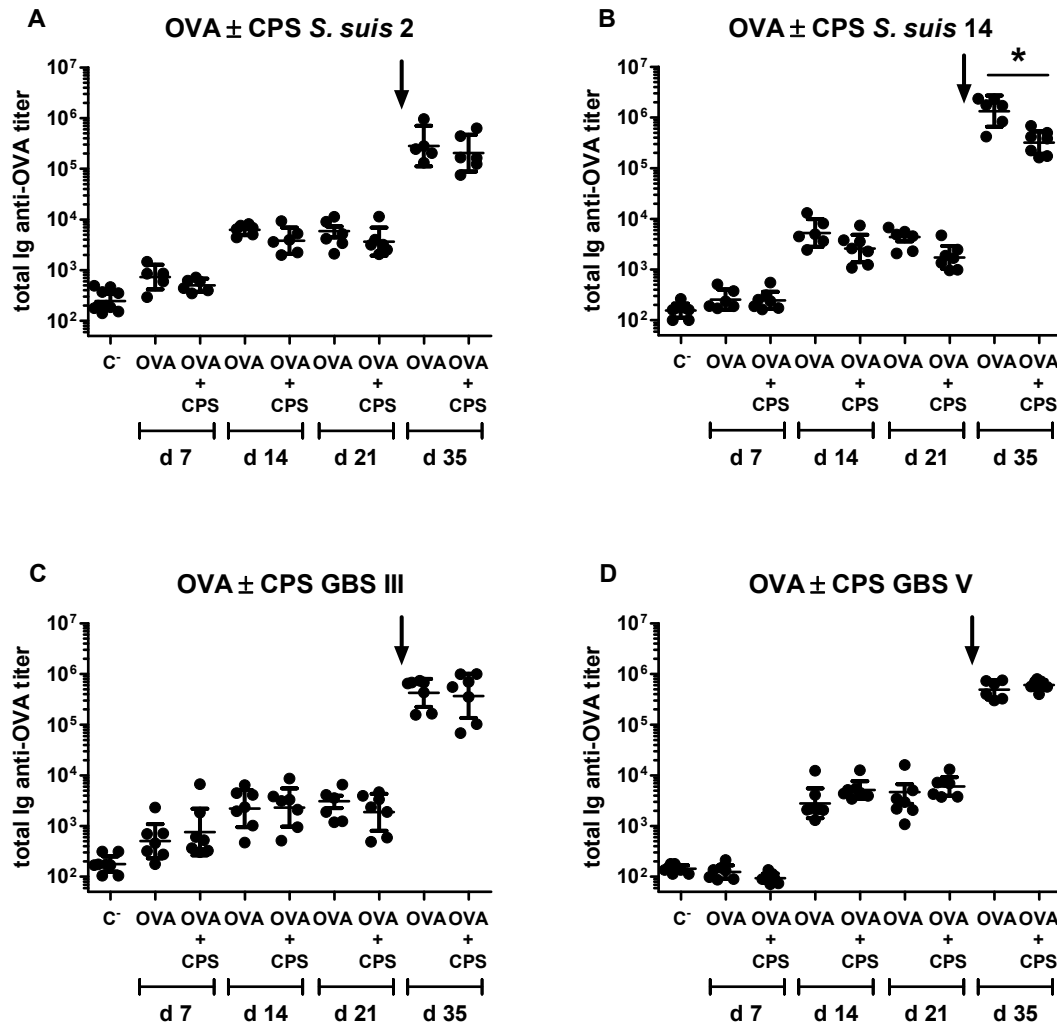
**Figure 3. Adjuvant effect of CpG on the CPS-specific humoral response in mice immunized with purified native or desialylated *S. suis* serotype 2 CPS or purified *S. pneumoniae* serotype 3 CPS (PS3).** (A) In a first set of experiments, mice ( $n = 8$ ) were immunized with 2  $\mu\text{g}$  of purified native (n) or desialylated (dS) *S. suis* serotype 2 or PS3 in PBS on day 0, and 80  $\mu\text{g}$  of CpG two days after. Control group ( $n = 8$ ) received CPS on day 0, and PBS two days later. Placebo group ( $n = 3$ ) received PBS or CpG only. Total Ig (IgG plus IgM) anti-native *S. suis* type 2 CPS or anti-PS3 titers were determined by ELISA on days 7, 14 and 21. Data are expressed as geometric mean with 95% confidence interval. (B) In a second set of experiments, mice ( $n = 5$ ) were immunized as described in (A), but splenocytes were collected on day 5 after immunization, and anti-CPS antibody secreting cells (ASCs) were enumerated by ELISpot as described in the *Materials and Methods* section. Data are expressed as arithmetic means with SEM. (C) Visualization of PS3 (top) or native *S. suis* type 2 CPS (bottom) specific ASCs in ELISpot wells from splenocytes of mice obtained in (B). \*,  $P < 0.05$  between «PS3» and «PS3 + CpG» groups.



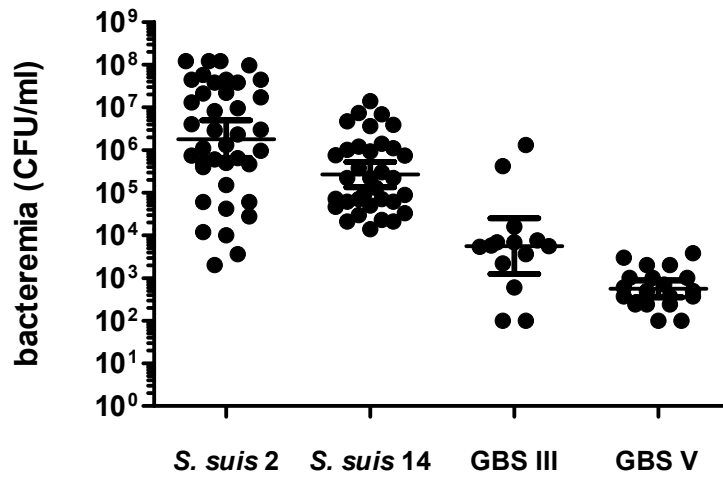
**Figure 4.** *In vitro* immunomodulatory effect of purified native *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS on BAFF/IL-4-induced Ig secretion by naïve B cells. Mouse splenic B cells ( $10^6$  cells/ml) were incubated with purified native *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS (each at 20  $\mu$ g/ml) simultaneously with (central panel) or 24 h before addition of (right panel) BAFF (1  $\mu$ g/ml) along with IL-4 (50 ng/ml). After 7 days of incubation, supernatants were collected and total IgM (A) and IgG (B) were quantified by ELISA. Cells stimulated with BAFF/IL-4 alone (black bars) served as positive control. In left panel, cells stimulated with medium (white bars) or each purified CPS alone are represented as an indication of the basal Ig secretion level of cells in absence of BAFF/IL-4 stimulation. Data are expressed as arithmetic means with SEM for at least three experiments. \*,  $P < 0.05$ .



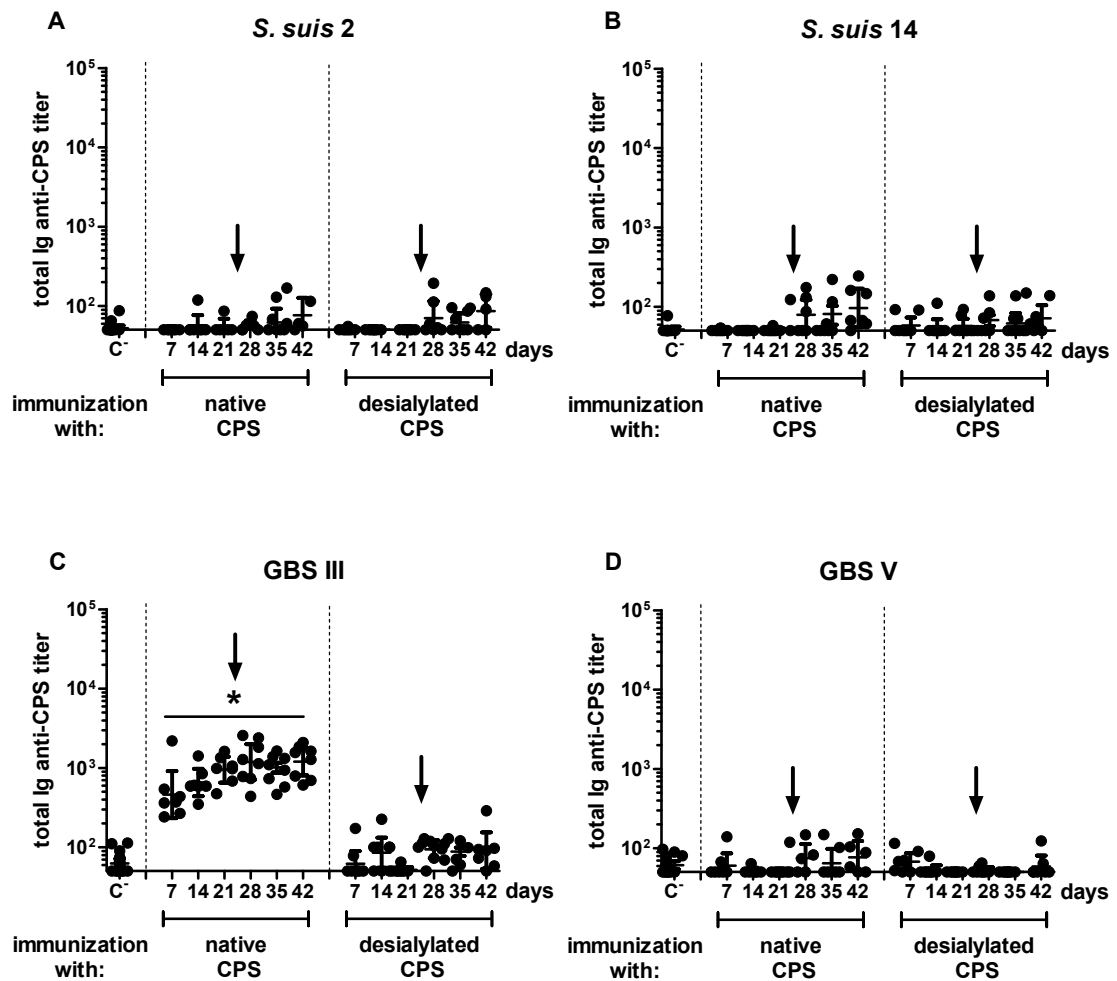
**Figure 5. *In vitro* immunomodulatory effect of purified native *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS on CpG-induced Ig secretion by naïve B cells.** Mouse splenic B cells ( $10^6$  cells/ml) were incubated with purified native *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS (each at 20  $\mu$ g/ml) simultaneously with (central panel) or 24 h before addition of (right panel) CpG (1  $\mu$ g/ml). After 7 days of incubation, supernatants were collected and total IgM (A) and IgG (B) were quantified by ELISA. Cells stimulated with CpG alone (black bars) served as positive control. In left panel, cells stimulated with medium (white bars) or each purified CPS alone are represented as an indication of the basal Ig secretion level of cells in absence of CpG stimulation. Data are expressed as arithmetic means with SEM for at least three experiments.



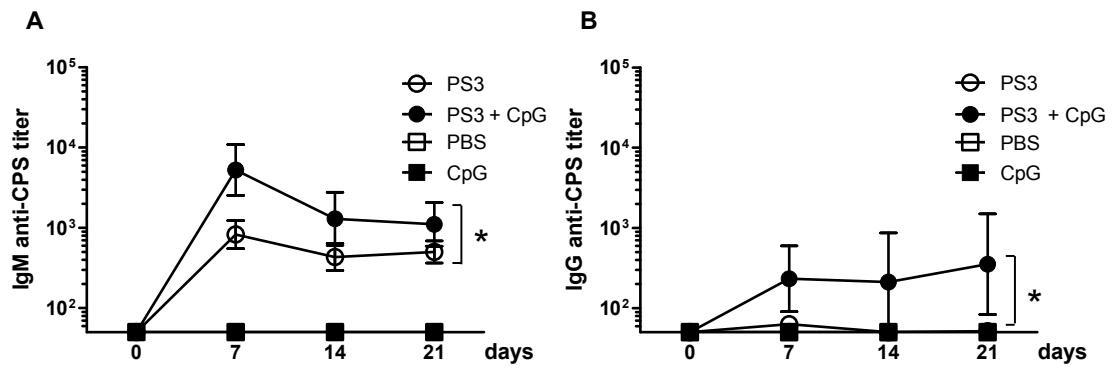
**Figure 6.** *In vivo* immunomodulatory effect of purified native *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS on OVA-specific Ab response. Mice (n = 8) were co-immunized with 10 µg of OVA and 2 µg of purified native *S. suis* serotype 2 (A), *S. suis* serotype 14 (B), GBS serotype III (C), or GBS serotype V (D) CPS in PBS on days 0 and 21. Control group (n = 8) received OVA only on days 0 and 21. Total Ig (IgG plus IgM) anti-OVA titers were determined by ELISA on days 7, 14, 21 and 35. «C-» represents a pool of placebo mice (n = 3) injected with PBS, whose titers were evaluated on days 7, 14, 21 and 35. Data from individual mice are presented, including the geometric mean with 95% confidence interval. An arrow indicates secondary immunization. \*,  $P < 0.05$ .



**Figure S1. Blood bacteremia of mice after infection with *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V.** Blood bacterial loads of surviving mice after infection with  $2 \times 10^7$  CFU of live *S. suis* serotype 2 strain P1/7 (n = 60),  $5 \times 10^6$  CFU of live *S. suis* serotype 14 strain DAN13730 (n = 40),  $2 \times 10^6$  CFU of live GBS serotype III strain COH-1 (n = 40), or  $10^4$  CFU of live GBS serotype V strain CJB111 (n = 40) were determined 12 h post-infection. Data from individual mice are presented, including the geometric mean with 95% confidence interval.

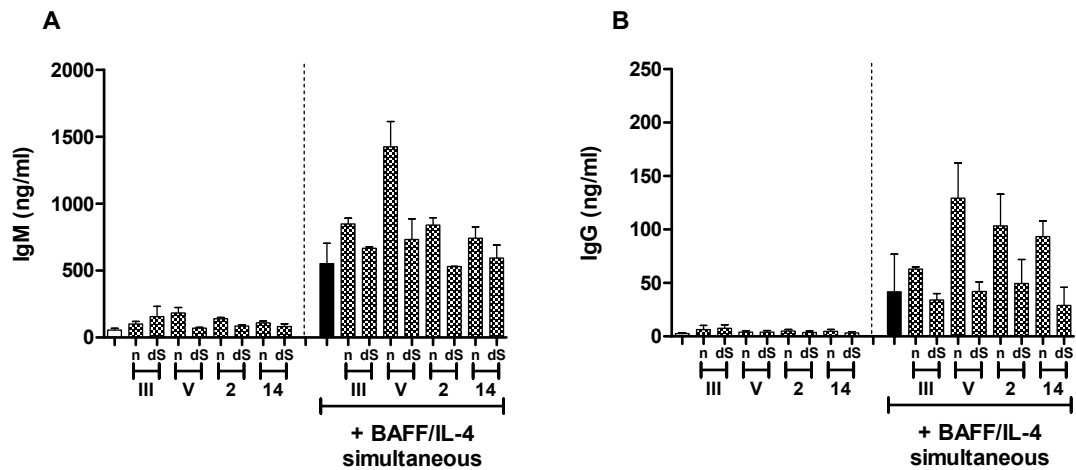


**Figure S2. Titration of CPS-specific Abs in mice after primary and secondary immunization with purified native or desialylated *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS.** Mice ( $n = 8$ ) were immunized with  $2 \mu\text{g}$  of purified native or desialylated *S. suis* serotype 2 (A), *S. suis* serotype 14 (B), GBS serotype III (C), or GBS serotype V (D) CPS emulsified with STIMUNE® on days 0 and 21. Total Ig (IgG plus IgM) anti-native CPS titers were determined by ELISA on days 7, 14, 21, 28, 35 and 42. «C-» represents a pool of control mice ( $n = 3$ ) injected with STIMUNE® only, whose titers were evaluated on days 7, 14, 21, 28, 35 and 42. Data from individual mice are presented, including the geometric mean with 95% confidence interval. An arrow indicates secondary immunization. \*, statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) in comparison to the C- group.

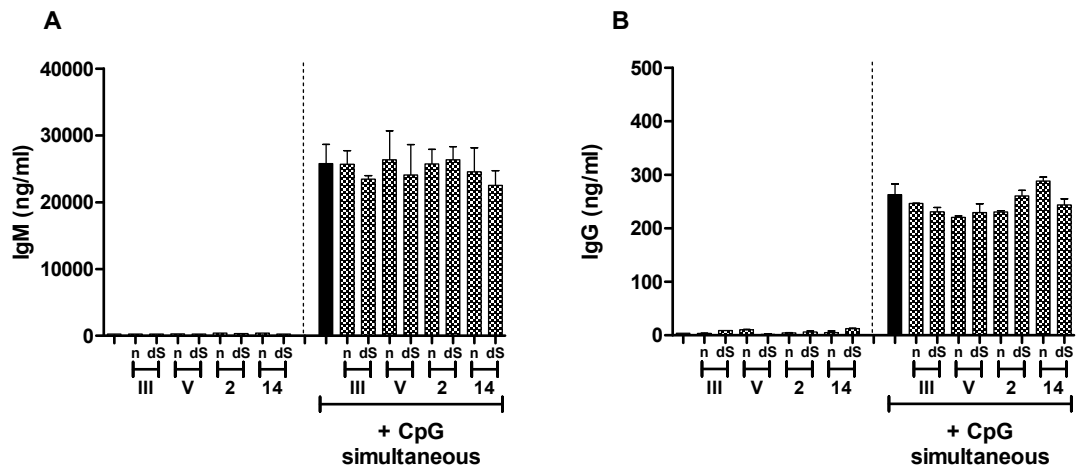


**Figure S3. Adjuvant effect of CpG on the CPS-specific Ab response in mice immunized with purified *S. pneumoniae* serotype 3 CPS (PS3).** Mice (n = 8) were immunized with 2 µg of PS3 in PBS on day 0, and 80 µg of CpG two days after. Control group (n = 8) received PS3 on day 0, and PBS two days later. Placebo group (n = 3) received PBS or CpG only. IgM (A) or IgG (B) anti-PS3 titers were determined by ELISA on days 7, 14 and 21. Data are expressed as geometric mean with 95% confidence interval. \*,  $P < 0.05$  between «PS3» and «PS3 + CpG» groups.





**Figure S4. *In vitro* immunomodulatory effect of purified native or desialylated *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS on BAFF/IL-4-induced Ig secretion by naïve B cells.** Mouse splenic B cells ( $10^6$  cells/ml) were incubated with purified native (n) or desialylated (dS) *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS (each at 20  $\mu$ g/ml) simultaneously with BAFF (1  $\mu$ g/ml) along with IL-4 (50 ng/ml) (right panel). After 7 days of incubation, supernatants were collected and total IgM (A) and IgG (B) were quantified by ELISA. Cells stimulated with BAFF/IL-4 alone (black bars) served as positive control. In left panel, cells stimulated with medium (white bars) or each purified CPS alone are represented as an indication of the basal Ig secretion level of cells in absence of BAFF/IL-4 stimulation. Data are expressed as arithmetic means with SEM for at least three experiments.



**Figure S5. *In vitro* immunomodulatory effect of purified native or desialylated *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS on CpG-induced Ig secretion by naïve B cells.** Mouse splenic B cells ( $10^6$  cells/ml) were incubated with purified native (n) or desialylated (dS) *S. suis* serotype 2, *S. suis* serotype 14, GBS serotype III, or GBS serotype V CPS (each at 20  $\mu$ g/ml) simultaneously with CpG (1  $\mu$ g/ml) (right panel). After 7 days of incubation, supernatants were collected and total IgM (A) and IgG (B) were quantified by ELISA. Cells stimulated with CpG alone (black bars) served as positive control. In left panel, cells stimulated with medium (white bars) or each purified CPS alone are represented as an indication of the basal Ig secretion level of cells in absence of CpG stimulation. Data are expressed as arithmetic means with SEM for at least three experiments.

## References

1. **Goyette-Desjardins G, Auger JP, Xu J, Segura M, Gottschalk M.** 2014. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg Microbes Infect* **3**:e45.
2. **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.
3. **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.
4. **Le Doare K, Heath PT.** 2013. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine* **31** Suppl 4:D7-12.
5. **Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, Schrag SJ, Zaidi AK, Cousens S, Heath PT.** 2012. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet* **379**:547-556.
6. **Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Zansky SM, Gershman K, Stefonek KR, Albanese BA, Zell ER, Schuchat A, Schrag SJ, Active Bacterial Core surveillance/Emerging Infections Program N.** 2008. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA* **299**:2056-2065.
7. **Edwards MS, Baker CJ.** 2005. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* **41**:839-847.
8. **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.
9. **Rubens CE, Wessels MR, Heggen LM, Kasper DL.** 1987. Transposon mutagenesis of type III group B *Streptococcus*: correlation of capsule expression with virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:7208-7212.
10. **Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S, Gottschalk M.** 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* **144**:325-332.
11. **Roy D, Auger JP, Segura M, Fittipaldi N, Takamatsu D, Okura M, Gottschalk M.** 2015. Role of the capsular polysaccharide as a virulence factor for *Streptococcus suis* serotype 14. *Can J Vet Res* **79**:141-146.
12. **Lecours MP, Segura M, Lachance C, Mussa T, Surprenant C, Montoya M, Gottschalk M.** 2011. Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. *Vet Res* **42**:72.
13. **Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, Segura M.** 2011. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and sullysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis* **204**:919-929.
14. **Meijerink M, Ferrando ML, Lammers G, Taverne N, Smith HE, Wells JM.** 2012. Immunomodulatory effects of *Streptococcus suis* capsule type on human dendritic cell responses, phagocytosis and intracellular survival. *PLoS One* **7**:e35849.
15. **Segura M, Gottschalk M, Olivier M.** 2004. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infect Immun* **72**:5322-5330.
16. **Lemire P, Roy D, Fittipaldi N, Okura M, Takamatsu D, Bergman E, Segura M.** 2014. Implication of TLR- but not of NOD2-signaling pathways in dendritic cell activation by group B *Streptococcus* serotypes III and V. *PLoS One* **9**:e113940.
17. **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.
18. **Lemire P, Houde M, Lecours MP, Fittipaldi N, Segura M.** 2012. Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells. *Microbes Infect* **14**:1064-1076.
19. **Carlin AF, Uchiyama S, Chang YC, Lewis AL, Nizet V, Varki A.** 2009. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood* **113**:3333-3336.
20. **Valentin-Weigand P, Benkel P, Rohde M, Chhatwal GS.** 1996. Entry and intracellular survival of group B *streptococci* in J774 macrophages. *Infect Immun* **64**:2467-2473.

21. **Segura MA, Cleroux P, Gottschalk M.** 1998. *Streptococcus suis* and group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**:189-195.
22. **Wessels MR, Pozsgay V, Kasper DL, Jennings HJ.** 1987. Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsular polysaccharide of type III group B *Streptococcus*. A revised structure for the type III group B streptococcal polysaccharide antigen. *J Biol Chem* **262**:8262-8267.
23. **Wessels MR, DiFabio JL, Benedi VJ, Kasper DL, Michon F, Brisson JR, Jelinkova J, Jennings HJ.** 1991. Structural determination and immunochemical characterization of the type V group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *J Biol Chem* **266**:6714-6719.
24. **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.
25. **Van Calsteren MR, Gagnon F, Calzas C, Goyette-Desjardins G, Okura M, Takamatsu D, Gottschalk M, Segura M.** 2013. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 14 capsular polysaccharide. *Biochem Cell Biol* **91**:49-58.
26. **Edwards MS, Kasper DL, Jennings HJ, Baker CJ, Nicholson-Weller A.** 1982. Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. *J Immunol* **128**:1278-1283.
27. **Marques MB, Kasper DL, Pangburn MK, Wessels MR.** 1992. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B *streptococci*. *Infect Immun* **60**:3986-3993.
28. **Takahashi S, Aoyagi Y, Adderson EE, Okuwaki Y, Bohnsack JF.** 1999. Capsular sialic acid limits C5a production on type III group B *streptococci*. *Infect Immun* **67**:1866-1870.
29. **Cress BF, Englaender JA, He W, Kasper D, Linhardt RJ, Koffas MA.** 2014. Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. *FEMS Microbiol Rev* **38**:660-697.
30. **Pillai S, Netravali IA, Cariappa A, Mattoo H.** 2012. Siglecs and immune regulation. *Annu Rev Immunol* **30**:357-392.
31. **Chang YC, Nizet V.** 2014. The interplay between Siglecs and sialylated pathogens. *Glycobiology* **24**:818-825.
32. **Jones C.** 2005. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. *An Acad Bras Cienc* **77**:293-324.
33. **Snapper CM.** 2012. Mechanisms underlying *in vivo* polysaccharide-specific immunoglobulin responses to intact extracellular bacteria. *Ann N Y Acad Sci* **1253**:92-101.
34. **Unkeless JC, Scigliano E, Freedman VH.** 1988. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol* **6**:251-281.
35. **Neuberger MS, Rajewsky K.** 1981. Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *Eur J Immunol* **11**:1012-1016.
36. **Michaelsen TE, Kolberg J, Aase A, Herstad TK, Hoiby EA.** 2004. The four mouse IgG isotypes differ extensively in bactericidal and opsonophagocytic activity when reacting with the P1.16 epitope on the outer membrane PorA protein of *Neisseria meningitidis*. *Scand J Immunol* **59**:34-39.
37. **Oishi K, Koles NL, Guelde G, Pollack M.** 1992. Antibacterial and protective properties of monoclonal antibodies reactive with *Escherichia coli* O111:B4 lipopolysaccharide: relation to antibody isotype and complement-fixing activity. *J Infect Dis* **165**:34-45.
38. **Baums CG, Kock C, Beineke A, Bennecke K, Goethe R, Schroder C, Waldmann KH, Valentin-Weigand P.** 2009. *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9. *Clin Vaccine Immunol* **16**:200-208.
39. **Charland N, Jacques M, Lacouture S, Gottschalk M.** 1997. Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 1/2. *Microbiology* **143**:3607-3614.
40. **Elliott SD, Clifton-Hadley F, Tai J.** 1980. Streptococcal infection in young pigs. V. An immunogenic polysaccharide from *Streptococcus suis* type 2 with particular reference to vaccination against streptococcal meningitis in pigs. *J Hyg (Lond)* **85**:275-285.

41. **Baker CJ, Kasper DL.** 1976. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *N Engl J Med* **294**:753-756.
42. **Lin FY, Weisman LE, Azimi PH, Philips JB, 3rd, Clark P, Regan J, Rhoads GG, Frasch CE, Gray BM, Troendle J, Brenner RA, Moyer P, Clemens JD.** 2004. Level of maternal IgG anti-group B *streptococcus* type III antibody correlated with protection of neonates against early-onset disease caused by this pathogen. *J Infect Dis* **190**:928-934.
43. **Heath PT.** 2011. An update on vaccination against group B *streptococcus*. *Expert Rev Vaccines* **10**:685-694.
44. **Mond JJ, Lees A, Snapper CM.** 1995. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* **13**:655-692.
45. **Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ.** 2000. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev* **176**:154-170.
46. **Snapper CM, Mond JJ.** 1996. A model for induction of T cell-independent humoral immunity in response to polysaccharide antigens. *J Immunol* **157**:2229-2233.
47. **Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A.** 2002. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. *Nat Immunol* **3**:822-829.
48. **Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, Bryce P, Jabara H, Bhan AK, Mizoguchi E, Geha RS.** 2004. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3903-3908.
49. **Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu S, Lam KP, Bram RJ, Jabara H, Geha RS.** 2005. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med* **201**:35-39.
50. **Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, Frew E, Scott ML.** 2001. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* **293**:2111-2114.
51. **Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, Moore PA, Olsen HS, Migone TS, Sosnovtseva S, Carrell JA, Feng P, Giri JG, Hilbert DM.** 2001. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood* **97**:198-204.
52. **Zhang M, Ko KH, Lam QL, Lo CK, Srivastava G, Zheng B, Lau YL, Lu L.** 2005. Expression and function of TNF family member B cell-activating factor in the development of autoimmune arthritis. *Int Immunol* **17**:1081-1092.
53. **Suzuki K, Maruya M, Kawamoto S, Sitnik K, Kitamura H, Agace WW, Fagarasan S.** 2010. The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* **33**:71-83.
54. **Kanswal S, Katsenelson N, Selvapandian A, Bram RJ, Akkoyunlu M.** 2008. Deficient TACI expression on B lymphocytes of newborn mice leads to defective Ig secretion in response to BAFF or APRIL. *J Immunol* **181**:976-990.
55. **Katsenelson N, Kanswal S, Puig M, Mostowski H, Verthelyi D, Akkoyunlu M.** 2007. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion. *Eur J Immunol* **37**:1785-1795.
56. **Dickinson GS, Akkoyunlu M, Bram RJ, Alugupalli KR.** 2015. BAFF receptor and TACI in B-1b cell maintenance and antibacterial responses. *Ann N Y Acad Sci.* doi: 10.1111/nyas.12772.
57. **Zhang Y, Li J, Zhang YM, Zhang XM, Tao J.** 2015. Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases. *J Immunol Res* **2015**:247426.
58. **Abu-Rish EY, Amrani Y, Browning MJ.** 2013. Toll-like receptor 9 activation induces expression of membrane-bound B-cell activating factor (BAFF) on human B cells and leads to increased proliferation in response to both soluble and membrane-bound BAFF. *Rheumatology (Oxford)* **52**:1190-1201.
59. **Kovarik J, Bozzotti P, Tougne C, Davis HL, Lambert PH, Krieg AM, Siegrist CA.** 2001. Adjuvant effects of CpG oligodeoxynucleotides on responses against T-independent type 2 antigens. *Immunology* **102**:67-76.
60. **Taillardet M, Haffar G, Mondiere P, Asensio MJ, Gheit H, Burdin N, Defrance T, Genestier L.** 2009. The thymus-independent immunity conferred by a pneumococcal polysaccharide is mediated by long-lived plasma cells. *Blood* **114**:4432-4440.

61. **Gold R, Lepow ML, Goldschneider I, Draper TL, Gotschlich EC.** 1975. Clinical evaluation of group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines in infants. *J Clin Invest* **56**:1536-1547.
62. **Torling J, Hedlund J, Konradsen HB, Ortqvist A.** 2003. Revaccination with the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in middle-aged and elderly persons previously treated for pneumonia. *Vaccine* **22**:96-103.
63. **Rodriguez ME, van den Dobbelsteen GP, Oomen LA, de Weers O, van Buren L, Beurret M, Poolman JT, Hoogerhout P.** 1998. Immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* type 6B and 14 polysaccharide-tetanus toxoid conjugates and the effect of uncoupled polysaccharide on the antigen-specific immune response. *Vaccine* **16**:1941-1949.
64. **Peeters CC, Tenbergen-Meekes AM, Poolman JT, Zegers BJ, Rijkers GT.** 1992. Immunogenicity of a *Streptococcus pneumoniae* type 4 polysaccharide-protein conjugate vaccine is decreased by admixture of high doses of free saccharide. *Vaccine* **10**:833-840.
65. **Kocabas C, Katsenelson N, Kanswal S, Kennedy MN, Cui X, Blake MS, Segal DM, Akkoyunlu M.** 2007. *Neisseria meningitidis* type C capsular polysaccharide inhibits lipooligosaccharide-induced cell activation by binding to CD14. *Cell Microbiol* **9**:1297-1310.
66. **Meltzer U, Goldblatt D.** 2006. Pneumococcal polysaccharides interact with human dendritic cells. *Infect Immun* **74**:1890-1895.
67. **Calzas C, Goyette-Desjardins G, Lemire P, Gagnon F, Lachance C, Van Calsteren MR, Segura M.** 2013. Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* capsular polysaccharides induce chemokine production by dendritic cells via Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent and -independent pathways. *Infect Immun* **81**:3106-3118.
68. **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.
69. **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.
70. **Kuypers JM, Heggen LM, Rubens CE.** 1989. Molecular analysis of a region of the group B *streptococcus* chromosome involved in type III capsule expression. *Infect Immun* **57**:3058-3065.
71. **Lemire P, Calzas C, Segura M.** 2013. The NOD2 receptor does not play a major role in the pathogenesis of Group B *Streptococcus* in mice. *Microb Pathog* **65**:41-47.
72. **Calzas C, Lemire P, Auray G, Gerds V, Gottschalk M, Segura M.** 2015. Antibody response specific to the capsular polysaccharide is impaired in *Streptococcus suis* serotype 2-infected animals. *Infect Immun* **83**:441-453.
73. **Stills HF, Jr.** 2005. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J* **46**:280-293.
74. **Taillardet M, Haffar G, Mondiere P, Asensio MJ, Pleau-Pison T, Burdin N, Defrance T, Genestier L.** 2010. Toll-like receptor agonists allow generation of long-lasting antipneumococcal humoral immunity in response to a plain polysaccharidic vaccine. *J Infect Dis* **202**:470-479.
75. **Kanswal S, Katsenelson N, Allman W, Uslu K, Blake MS, Akkoyunlu M.** 2011. Suppressive effect of bacterial polysaccharides on BAFF system is responsible for their poor immunogenicity. *J Immunol* **186**:2430-2443.
76. **Obukhanych TV, Nussenzweig MC.** 2006. T-independent type II immune responses generate memory B cells. *J Exp Med* **203**:305-310.
77. **Defrance T, Taillardet M, Genestier L.** 2011. T cell-independent B cell memory. *Curr Opin Immunol* **23**:330-336.
78. **Chang YC, Olson J, Beasley FC, Tung C, Zhang J, Crocker PR, Varki A, Nizet V.** 2014. Group B *Streptococcus* engages an inhibitory Siglec through sialic acid mimicry to blunt innate immune and inflammatory responses *in vivo*. *PLoS Pathog* **10**:e1003846.
79. **Chaffin DO, Mentele LM, Rubens CE.** 2005. Sialylation of group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by *cpsK* and is required for optimal capsule polymerization and expression. *J Bacteriol* **187**:4615-4626.
80. **Lecours MP, Fittipaldi N, Takamatsu D, Okura M, Segura M, Goyette-Desjardins G, Van Calsteren MR, Gottschalk M.** 2012. Sialylation of *Streptococcus suis* serotype

- 2 is essential for capsule expression but is not responsible for the main capsular epitope. *Microbes Infect* **14**:941-950.
81. **Gonzalez-Outeirino J, Kadirvelraj R, Woods RJ.** 2005. Structural elucidation of type III group B *Streptococcus* capsular polysaccharide using molecular dynamics simulations: the role of sialic acid. *Carbohydr Res* **340**:1007-1018.
  82. **Jennings HJ, Lugowski C, Kasper DL.** 1981. Conformational aspects critical to the immunospecificity of the type III group B streptococcal polysaccharide. *Biochemistry* **20**:4511-4518.
  83. **Garcia de Vinuesa C, O'Leary P, Sze DM, Toellner KM, MacLennan IC.** 1999. T-independent type 2 antigens induce B cell proliferation in multiple splenic sites, but exponential growth is confined to extrafollicular foci. *Eur J Immunol* **29**:1314-1323.
  84. **Martin F, Oliver AM, Kearney JF.** 2001. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* **14**:617-629.
  85. **Foote JB, Kearney JF.** 2009. Generation of B cell memory to the bacterial polysaccharide  $\alpha$ -1,3 dextran. *J Immunol* **183**:6359-6368.
  86. **Hsu MC, Toellner KM, Vinuesa CG, MacLennan IC.** 2006. B cell clones that sustain long-term plasmablast growth in T-independent extrafollicular antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:5905-5910.
  87. **Chattopadhyay G, Chen Q, Colino J, Lees A, Snapper CM.** 2009. Intact bacteria inhibit the induction of humoral immune responses to bacterial-derived and heterologous soluble T cell-dependent antigens. *J Immunol* **182**:2011-2019.
  88. **Gonzalez-Fernandez M, Carrasco-Marin E, Alvarez-Dominguez C, Outschoorn IM, Leyva-Cobian F.** 1997. Inhibitory effects of thymus-independent type 2 antigens on MHC class II-restricted antigen presentation: comparative analysis of carbohydrate structures and the antigen presenting cell. *Cell Immunol* **176**:1-13.
  89. **Leyva-Cobian F, Unanue ER.** 1988. Intracellular interference with antigen presentation. *J Immunol* **141**:1445-1450.
  90. **Moreno C, Mehlert A, Lamb J.** 1988. The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. *Clin Exp Immunol* **74**:206-210.
  91. **Yauch LE, Lam JS, Levitz SM.** 2006. Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. *PLoS Pathog* **2**:e120.
  92. **Gottschalk M.** 2012. Streptococcosis, p. 841-855. *In* K. L. Zimmerman JJ, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (ed.), *Diseases of swine*, 10th ed. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, IA.
  93. **Heath PT, Feldman RG.** 2005. Vaccination against group B *streptococcus*. *Expert Rev Vaccines* **4**:207-218.
  94. **Guttormsen HK, Paoletti LC, Mansfield KG, Jachymek W, Jennings HJ, Kasper DL.** 2008. Rational chemical design of the carbohydrate in a glycoconjugate vaccine enhances IgM-to-IgG switching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:5903-5908.
  95. **Houde M, Gottschalk M, Gagnon F, Van Calsteren MR, Segura M.** 2012. *Streptococcus* capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition. *Infect Immun* **80**:506-517.
  96. **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.
  97. **Lemire P, Houde M, Segura M.** 2012. Encapsulated group B *Streptococcus* modulates dendritic cell functions via lipid rafts and clathrin-mediated endocytosis. *Cell Microbiol* **14**:1707-1719.
  98. **Khan AQ, Lees A, Snapper CM.** 2004. Differential regulation of IgG anti-capsular polysaccharide and anti-protein responses to intact *Streptococcus pneumoniae* in the presence of cognate CD4<sup>+</sup> T cell help. *J Immunol* **172**:532-539.
  99. **Arjunaraja S, Massari P, Wetzler LM, Lees A, Colino J, Snapper CM.** 2012. The nature of an *in vivo* anti-capsular polysaccharide response is markedly influenced by the composition and/or architecture of the bacterial subcapsular domain. *J Immunol* **188**:569-577.
  100. **Arjunaraja S, Paoletti LC, Snapper CM.** 2012. Structurally identical capsular polysaccharide expressed by intact group B *streptococcus* versus *Streptococcus*

- pneumoniae* elicits distinct murine polysaccharide-specific IgG responses *in vivo*. J Immunol **188**:5238-5246.
101. **Chen Q, Cannons JL, Paton JC, Akiba H, Schwartzberg PL, Snapper CM.** 2008. A novel ICOS-independent, but CD28- and SAP-dependent, pathway of T cell-dependent, polysaccharide-specific humoral immunity in response to intact *Streptococcus pneumoniae* versus pneumococcal conjugate vaccine. J Immunol **181**:8258-8266.
  102. **Crocker PR, McMillan SJ, Richards HE.** 2012. CD33-related siglecs as potential modulators of inflammatory responses. Ann N Y Acad Sci **1253**:102-111.
  103. **Nitschke L, Carsetti R, Ocker B, Kohler G, Lamers MC.** 1997. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. Curr Biol **7**:133-143.
  104. **Hoffmann A, Kerr S, Jellusova J, Zhang J, Weisel F, Wellmann U, Winkler TH, Kneitz B, Crocker PR, Nitschke L.** 2007. Siglec-G is a B1 cell-inhibitory receptor that controls expansion and calcium signaling of the B1 cell population. Nat Immunol **8**:695-704.
  105. **Cariappa A, Takematsu H, Liu H, Diaz S, Haider K, Boboila C, Kalloo G, Connole M, Shi HN, Varki N, Varki A, Pillai S.** 2009. B cell antigen receptor signal strength and peripheral B cell development are regulated by a 9-O-acetyl sialic acid esterase. J Exp Med **206**:125-138.
  106. **Jennings HJ, Roy R, Gamian A.** 1986. Induction of meningococcal group B polysaccharide-specific IgG antibodies in mice by using an N-propionylated B polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. J Immunol **137**:1708-1713.
  107. **Duong BH, Tian H, Ota T, Completo G, Han S, Vela JL, Ota M, Kubitz M, Bovin N, Paulson JC, Nemazee D.** 2010. Decoration of T-independent antigen with ligands for CD22 and Siglec-G can suppress immunity and induce B cell tolerance *in vivo*. J Exp Med **207**:173-187.
  108. **Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF.** 2005. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. Immunity **23**:7-18.
  109. **Genestier L, Taillardet M, Mondiere P, Gheit H, Bella C, Defrance T.** 2007. TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. J Immunol **178**:7779-7786.
  110. **He B, Santamaria R, Xu W, Cols M, Chen K, Puga I, Shan M, Xiong H, Bussel JB, Chiu A, Puel A, Reichenbach J, Marodi L, Doffinger R, Vasconcelos J, Issekutz A, Krause J, Davies G, Li X, Grimbacher B, Plebani A, Meffre E, Picard C, Cunningham-Rundles C, Casanova JL, Cerutti A.** 2010. The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. Nat Immunol **11**:836-845.
  111. **von Hunolstein C, Teloni R, Mariotti S, Recchia S, Orefici G, Nisini R.** 2000. Synthetic oligodeoxynucleotide containing CpG motif induces an anti-polysaccharide type 1-like immune response after immunization of mice with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. Int Immunol **12**:295-303.
  112. **Monari C, Kozel TR, Paganelli F, Pericolini E, Perito S, Bistoni F, Casadevall A, Vecchiarelli A.** 2006. Microbial immune suppression mediated by direct engagement of inhibitory Fc receptor. J Immunol **177**:6842-6851.
  113. **Nigou J, Zelle-Rieser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G.** 2001. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. J Immunol **166**:7477-7485.
  114. **Erdmann H, Steeg C, Koch-Nolte F, Fleischer B, Jacobs T.** 2009. Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). Cell Microbiol **11**:1600-1611.
  115. **Saumyaa, Arjunaraja S, Pujanauski L, Colino J, Torres RM, Snapper CM.** 2013. Immunosuppressive property within the *Streptococcus pneumoniae* cell wall that inhibits generation of T follicular helper, germinal center, and plasma cell response to a coimmunized heterologous protein. Infect Immun **81**:3426-3433.
  116. **Read RC, Zimmerli S, Broaddus C, Sanan DA, Stephens DS, Ernst JD.** 1996. The ( $\alpha$ 2-8)-linked polysialic acid capsule of group B *Neisseria meningitidis* modifies multiple steps during interaction with human macrophages. Infect Immun **64**:3210-3217.



## **IV – DISCUSSION**

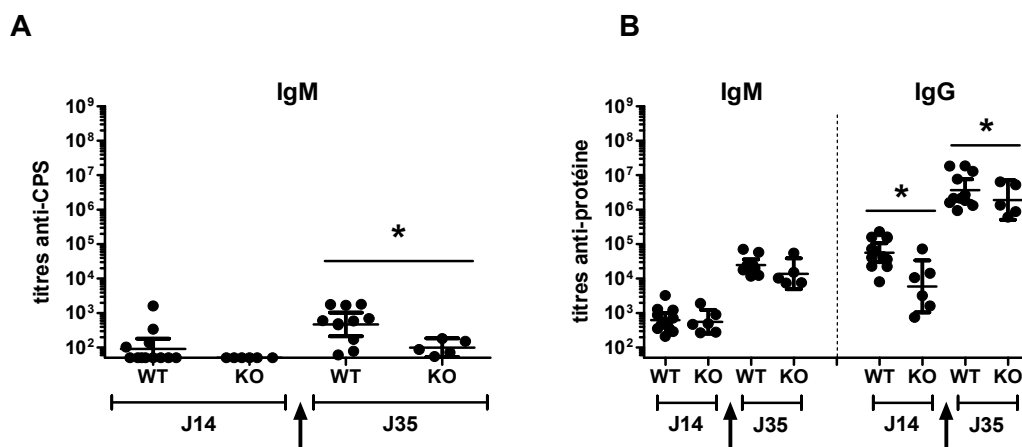
## 1. Caractéristiques de la réponse Ac anti-CPS suite à l'infection par *S. suis* et GBS

### 1.1. Caractéristiques TI de la réponse Ac anti-CPS suite à l'infection par *S. suis*

Alors que la CPS est une molécule centrale de l'immunopathogénèse des bactéries encapsulées et représente une cible majeure de l'immunité humorale protectrice contre ces pathogènes, la nature de la réponse Ac anti-CPS lors de l'infection par *S. suis* n'avait jamais été précisément caractérisée au début de ce projet de thèse. Nous avons choisi d'analyser cette réponse au niveau sérique et (principalement) chez les souris consanguines exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (SPF) afin de pouvoir « fixer » certains paramètres susceptibles d'influencer la capacité stimulatrice de l'immunogène, notamment la prédisposition génétique du receveur ainsi que l'état de son système immunitaire. Le modèle d'infection choisi dans cette étude a été mis au point dans nos laboratoires et reproduit les caractéristiques cliniques de l'infection observées chez le porc, l'hôte naturel de la bactérie (134, 135). On peut finalement mentionner que le modèle murin a également été utilisé dans la littérature pour évaluer la réponse humorale face à d'autres bactéries encapsulées telles que *S. pneumoniae* (322), *N. meningitidis* (381) et *Streptococcus* du groupe A (GAS) (382).

Suite à l'infection primaire par *S. suis* type 2, les souris développent une réponse humorale anti-CPS qui se distingue par des titres d'Ac très faibles ainsi qu'un profil isotypique restreint à l'IgM. Cette réponse diffère radicalement de celle montée contre les Ag non capsulaires de la bactérie (« anti-protéine ») qui est dominée par de forts titres d'IgG. Après une seconde infection, la réponse Ac anti-protéine présente tous les traits d'une réponse mémoire, alors que la réponse Ac anti-CPS secondaire se caractérise par un boost très modéré des titres d'IgM et une absence de CSR (**ARTICLE II**). La disparité entre les réponses Ac anti-protéine et anti-CPS est encore plus marquée chez les souris infectées par *S. suis* type 14 qui ne produisent pas du tout d'Ac anti-CPS (**ARTICLE III**). Finalement, les porcs infectés expérimentalement par *S. suis* type 2 développent une réponse Ac anti-CPS de même nature que celle observée chez les souris, qui se compose uniquement de très faibles titres d'IgM (**ARTICLE II**). La réponse Ac dirigée contre la CPS de *S. suis*, lorsqu'elle est générée, présente donc les traits d'une réponse TI, que ce soit chez la souris ou l'hôte naturel.

Afin d'évaluer plus précisément l'implication des LT, nous avons analysé le profil de la réponse humorale des souris génétiquement déficientes en LT CD4<sup>+</sup> face à l'infection par *S. suis* type 2. Alors que les titres d'IgG anti-protéine primaire et mémoire sont significativement diminués chez les souris CD4<sup>-/-</sup>, la présence des LT CD4<sup>+</sup> n'est pas requise pour la génération de la réponse IgM anti-protéine (primaire ou mémoire) ou IgM anti-CPS primaire. Une diminution partielle des titres d'IgM mémoires anti-CPS est toutefois observée chez les souris CD4<sup>-/-</sup> (**Figure 10**, données non publiées) et une telle altération avait été précédemment décrite chez les souris athymiques immunisées par GAS (382). Ces données confirment ainsi le caractère globalement TI de la réaction humorale anti-CPS au cours de l'infection par *S. suis*.



**Figure 10. Titration des Ac anti-CPS (A) et anti-protéine (B) chez les souris sauvages (WT) et CD4<sup>-/-</sup> après infections primaire et secondaire par *S. suis* type 2.** Les souris WT ou CD4<sup>-/-</sup> (KO) (n = 20) ont été infectées intrapéritonéalement avec la souche vivante virulente P1/7 de *S. suis* type 2 ( $2 \times 10^7$  CFU) aux jours 0 et 21. Les titres d'IgM anti-CPS (A) et anti-protéine (B) ainsi que les titres d'IgG anti-protéine (B) ont été dosés par ELISA deux semaines après l'infection primaire (J14) et secondaire (J35) chez les souris survivantes. Les données pour chaque souris sont présentées incluant la moyenne géométrique avec un intervalle de confiance de 95 %. La flèche indique l'infection secondaire. \*, différence statistiquement significative ( $P < 0.05$ ) entre les souris WT et KO (ANOVA).

Un tel profil de réponse face à une bactérie intacte peut paraître surprenant. Comme mentionné dans la partie « Revue de la littérature », du fait de leur nature biochimique distincte, les polysaccharides et les protéines sont deux types de molécules traitées différemment par les APC, les premières ne pouvant pas se complexer aux molécules du CMH-II et recruter l'aide des LT contrairement aux secondes. Ces deux Ag génèrent par conséquent, via des mécanismes qui leur sont

propres, des réponses humorales de nature différente (251, 252). Toutefois, une bactérie encapsulée est un immunogène particulière complexe au sein duquel de multiples Ag protéiques et polysaccharidiques sont co-exprimés en association avec divers adjuvants bactériens incluant des ligands des TLR (256). L'expression de la CPS dans le contexte d'une bactérie entière pourrait ainsi en théorie lui conférer des propriétés immunostimulatrices augmentées. A cet égard, le couplage de la CPS à une protéine porteuse (« glycoconjugué ») améliore son immunogénicité en convertissant la réponse anti-CPS d'un profil TI vers un profil TD (30). Brièvement, suite à l'internalisation du glycoconjugué par les LB subséquente à la reconnaissance de la portion polysaccharidique par le BCR, deux catégories d'épitopes peuvent être générés par dégradation enzymatique dans l'endosome de la cellule, à savoir des épitopes peptidiques et des épitopes saccharidiques qui sont dérivés des portions protéinique et polysaccharidique du glycoconjugué, respectivement. Ces deux classes d'Ag peuvent s'associer aux molécules du CMH-II à la surface de l'APC, soit directement dans le cas des peptides, soit indirectement dans le cas des saccharides via le peptide auquel ils restent liés covalentement durant le processus de dégradation dans l'endosome. En présence de molécules de co-stimulation et de cytokines adéquates, la reconnaissance des complexes CMH-II/peptide et/ou CMH-II/peptide-saccharide par les LT exprimant un TCR spécifique pour l'un ou l'autre des deux types d'épitope conduit à leur activation. Ces cellules peuvent alors participer la stimulation des LB CPS-spécifiques, en optimisant notamment la CSR, la différenciation en plasmocytes et la génération de LB mémoires (30, 383).

On pourrait émettre l'hypothèse que l'absence de liaison covalente entre la CPS et les protéines bactériennes au sein de *S. suis* résulterait en un moins bon traitement et/ou présentation des épitopes antigéniques et conduirait alors en un recrutement sous-optimal voire même nul des LT CD4<sup>+</sup>. Une étude *in vitro* portant sur les LT spécifiques de la protéine PspA (« pneumococcal surface protein A ») de *S. pneumoniae* a montré toutefois que les APC exposées à la bactérie intacte induisent une meilleure activation des LT PspA-spécifiques que les cellules exposées à de mêmes quantités de PspA sous la forme d'un glycoconjugué PspA-CPS, la nature particulière de la bactérie facilitant l'internalisation d'une plus grande quantité de la protéine (277). En accord avec l'hypothèse pré-citée, une étude examinant la réponse Ac anti-CPS chez la souris immunisée par *S. pneumoniae* type 14 (où CPS et protéines sont associées sans être covalentement liées) a démontré que celle-ci possède en réalité des caractéristiques d'une réponse à la fois TD et TI (277, 322, 323). En effet, bien que les souris développent une réponse IgG anti-CPS qui est dépendante de la

présence des LT CD4<sup>+</sup> et des molécules de co-stimulation CD40L et CD28, celle-ci se distingue par une cinétique d'apparition plus rapide, une dépendance temporelle plus courte de l'aide des LT CD4<sup>+</sup> ainsi qu'une absence de maturation d'affinité par rapport à la réponse IgG générée contre la même CPS conjuguée à une protéine porteuse. De plus, les souris ne génèrent pas de réponse Ac anti-CPS mémoire face à une seconde immunisation par la bactérie. Il est intéressant de noter que contrairement à ce qui est observé avec *S. pneumoniae* type 14, les souris immunisées par *N. meningitidis* groupe C sont capables de monter une réponse IgG anti-CPS mémoire (381).

Outre un recrutement différentiel des LT, les mécanismes cellulaires responsables de la nature différente des réponses Ac anti-CPS générées face à une bactérie intacte *versus* face à un glycoconjugué, et/ou de la nature différente des réponses Ac anti-CPS *versus* anti-protéine face à la bactérie entière, restent mal compris. Jusqu'à maintenant, cette question a été examinée exclusivement pour *S. pneumoniae* type 14.

La mise en jeu de différentes populations de LB pourrait être une première explication. En effet, la réponse IgG anti-CPS face à *S. pneumoniae* mobilise les LB MZ, tandis que la même réponse générée suite à l'immunisation par un glycoconjugué implique les LB FO (277). La nature particulière, l'expression de composants bactériens interagissant avec les molécules du complément ainsi que de ligands reconnus par des récepteurs exprimés plus particulièrement par les LB MZ conduiraient au recrutement sélectif de ces cellules dans la réponse Ac anti-CPS face à la bactérie entière. Etant donné que les LB MZ sont majoritairement impliqués dans les réactions extrafolliculaires, engendrant globalement des réponses plasmocytaires rapides et peu affines plutôt que la génération de LB mémoires, cela pourrait expliquer le profil de la réponse Ac anti-CPS observé chez les souris immunisées par la bactérie (faible affinité, absence de réponse mémoire). Toutefois, l'engagement des LB MZ ne peut pas expliquer à lui seul les caractéristiques TI de cette dernière. En effet, l'adsorption d'un glycoconjugué à base de CPS de *S. pneumoniae* à la surface d'une souche mutante non encapsulée de la même bactérie induit la génération d'une réponse Ac anti-CPS sous l'entier contrôle des LB MZ, mais qui présente les mêmes caractéristiques TD que celles obtenues suite à l'administration du glycoconjugué soluble (277). Il serait ainsi intéressant dans le futur d'identifier les différentes populations de LB impliquées dans les réponses Ac anti-CPS et anti-protéine durant l'infection par *S. suis*. Ces réponses pourraient être évaluées chez les souris qui présentent une déficience sélective en LB FO, LB MZ ou LB-1, ou bien chez les souris  $\mu$ MT et/ou  $\text{rag}^{-/}$  reconstituées avec chacune de ces sous-populations.

Il a été suggéré enfin qu'un rôle différentiel des APC pouvait aussi être responsable du profil différent des réponses Ac anti-CPS *versus* anti-protéine face à *S. pneumoniae* (384). Alors que des interactions spécifiques entre les DC et les LT sont requises pour la génération de la réponse Ac anti-protéine, les DC participeraient à l'induction des réponses IgM et IgG anti-CPS en interagissant directement avec les LB (384). Les sous-types de DC mis en jeu n'ont toutefois pas été caractérisés dans cette étude. A cet égard, on peut mentionner aussi que les travaux évaluant l'interaction de *S. suis* avec les DC, un champ de recherche très récent, ont été réalisés exclusivement avec des cellules différenciées *in vitro* à partir des cellules de la moelle osseuse (souris) ou des monocytes (homme), et leur(s) équivalent(s) *in vivo* n'ont pas été identifiés à l'heure actuelle. Finalement, tout comme les DC, les monocytes inflammatoires de la MZ collaboreraient différemment dans les deux types de réponses face à *S. pneumoniae*. Ils joueraient un rôle essentiel dans la génération des réponses IgM et IgG anti-CPS, alors que la déplétion spécifique de ces cellules n'altérerait pas l'induction de la réponse Ac anti-protéine (385).

Pour conclure cette partie, les souris infectées par *S. suis* développent une réponse Ac anti-CPS très faible (*S. suis* type 2) voire même inexistante (*S. suis* type 14), ce qui pourrait s'expliquer par une incapacité à recruter efficacement l'aide des LT. L'identification des sous-populations cellulaires mises en jeu dans la réponse Ac anti-CPS au cours de l'infection à *S. suis*, et en particulier les types/sous-types d'APC (DC, monocytes/macrophages) et de LB (LB FO, LB MZ, LB-1) est nécessaire pour une compréhension globale de cette faible immunogénicité. Il est en outre indispensable d'évaluer le rôle immunomodulateur des composants de *S. suis* dans l'orchestration de ces mécanismes cellulaires, et notamment l'implication respective des composants non-capsulaires et de la CPS. Cette thèse s'est plus particulièrement concentrée sur ce deuxième point et nous allons poursuivre la discussion sur ce sujet à partir de la section 1.3.

## **1.2. Rôle de TLR2 dans la réponse Ac anti-CPS suite à l'infection par *S. suis* type 2**

Les TLR jouent un rôle crucial dans la détection des pathogènes, la mise en place de la réponse immunitaire innée ainsi que l'orchestration de la réponse immunitaire adaptative. Le rôle des TLR, et en particulier TLR2, dans les réponses immunes innées face aux bactéries extracellulaires est bien établi, notamment pour *S. pneumoniae* et *S. aureus* (356, 386). En ce qui concerne *S. suis*, la production de

diverses cytokines/chémokines pro-inflammatoires ainsi que l'expression des molécules de co-stimulation et du CMH-II par les APC stimulées *in vitro* avec la bactérie sont dépendantes de l'expression de TLR2 (145, 387, 388), tout comme l'est la réponse inflammatoire *in vivo* induite chez les souris infectées par la bactérie (181). Malgré ces observations, le rôle du TLR2 dans la génération des réponses humorales *in vivo* contre les bactéries encapsulées avait été très peu étudié au début de ce projet de thèse, et jamais évalué dans le cas de *S. suis*. Notre étude démontre ainsi pour la première fois que TLR2 ne joue pas de rôle majeur dans l'induction de la réponse IgM anti-CPS ou anti-protéine, ni dans la génération de la réponse IgG anti-protéine chez la souris infectée par *S. suis* type 2 (**ARTICLE II**).

De façon similaire à nos résultats, la réponse IgG anti-protéine face à l'infection par *Borrelia burgdorferi* n'est pas altérée chez les souris déficientes pour l'expression de TLR2 (389). Ce récepteur n'est pas non plus impliqué dans les réponses IgM et IgG spécifiques de la CPS de *N. meningitidis* type C (exprimée dans le contexte de la bactérie entière) (381). En revanche, l'induction de titres optimaux d'IgG de type 1 spécifiquement dirigés contre la CPS et les protéines de *S. pneumoniae* type 14 nécessite la présence de ce récepteur (355). Une étude ultérieure plus détaillée de la réponse IgG dirigée contre la PhC générée suite à l'immunisation par ce pathogène, qui est dépendante de la présence des LT CD4<sup>+</sup>, a démontré que l'expression de TLR2 était plus particulièrement requise au niveau des LB et des LT CD4<sup>+</sup>, alors que la présence de ce récepteur au niveau des DC n'est pas indispensable (390).

Les récepteurs impliqués dans la réponse Ac anti-*S. suis* restent donc à être identifiés et pourraient correspondre à d'autres membres de la famille des TLR. TLR4, qui contribue à la réponse inflammatoire des DC murines infectées par *S. suis* type 2 (387), est impliqué dans les réponses IgM et IgG2c contre la CPS de *N. meningitidis* type C chez la souris (exprimée dans le contexte de la bactérie entière) (381). Les TLR 6 et 9 participent également à la reconnaissance *in vitro* de *S. suis* par les cellules mononucléaires humaines, murines et porcines (182, 387, 388). Toutefois, bien qu'ils puissent jouer un rôle dans la production de cytokines et chémokines pro-inflammatoires et/ou dans l'induction de molécules de co-stimulation par ces leucocytes (182, 387), leur implication dans la réponse humorale contre les bactéries encapsulées n'a jamais été démontrée.

En revanche, les lectines constituent de sérieux candidats. L'expression de Siglec-1 par les souris infectées avec GBS type III est essentielle dans la génération de la réponse IgM anti-CPS et est associée à une meilleure survie et un meilleur

contrôle de la bactériémie (391). SIGN-R1 a aussi été démontré comme pouvant être impliqué dans la réponse humorale contre *S. pneumoniae*, même si cela reste encore un sujet de controverse. En effet, alors qu'une première étude a établi que l'expression de ce récepteur était indispensable pour la survie des souris face à une infection pulmonaire par *S. pneumoniae* type 3 et à la génération des IgM anti-PhC (392), une seconde étude conclut que ce récepteur n'est pas indispensable dans le développement des réponses IgG et IgM anti-PhC et anti-CPS suite à l'immunisation par *S. pneumoniae* type 3 ou 14 tuée (373). Bien que ces lectines puissent potentiellement lier la CPS de *S. suis*, notamment du fait de la présence d'acide sialique (interaction avec les Siglecs) et de GlcNAc (interaction avec les CLR), la reconnaissance de la bactérie par ce type de récepteur n'a jamais été prouvée et représente une avenue de recherche très intéressante.

### **1.3. Comparaison de la réponse Ac anti-CPS suite à l'infection par *S. suis* et GBS**

Dans notre optique de comprendre l'effet immunomodulateur de la composition bactérienne sur la nature de la réponse Ac anti-CPS induite, nous avons évalué les caractéristiques de cette réponse chez les souris infectées par un streptocoque encapsulé dont l'immunopathogénèse est assez semblable à celle de *S. suis*, à savoir GBS. Bien que les deux bactéries partagent de nombreuses similarités (place centrale de la CPS dans l'interaction avec le système immunitaire de l'hôte, similarités biochimiques de la CPS, induction de pathologies semblables, entre autres), ce sont deux bactéries bien distinctes (interactions différentes avec le système immunitaire de l'hôte, composition et structure uniques de la CPS, entre autres). Les souris infectées par GBS développent une réponse IgM anti-CPS primaire qui est globalement de plus forte magnitude que les souris infectées par *S. suis* (**ARTICLE III**). Toutefois, comme dans le cas de *S. suis*, nous n'avons pas réussi à détecter d'IgG anti-CPS subséquemment à l'infection par les deux bactéries.

Tout comme pour *S. suis*, il est nécessaire de mieux déterminer quels sont les acteurs cellulaires impliqués dans la réponse Ac anti-CPS durant l'infection par GBS. Alors que les types/sous-types d'APC et de LB mis en jeu demeurent non identifiés, une étude publiée en 2012 a démontré que les souris immunisées avec GBS type III tué sont capables de monter non seulement une forte réponse IgM anti-CPS, mais aussi une réponse IgG anti-CPS primaire et mémoire modeste impliquant les LT CD4<sup>+</sup> et les interactions CD40/CD40L (393). La différence du profil isotypique de la réponse



Ac anti-CPS obtenu dans cette étude comparativement à la nôtre pourrait s'expliquer par des dissimilitudes dans les conditions expérimentales, incluant l'utilisation de différentes souches de souris (BALB/c *versus* C57BL/6) ou d'immunogènes (immunisation avec la bactérie tuée *versus* infection avec la bactérie vivante), ainsi que dans les méthodes de titration des Ac. Il demeure indispensable d'évaluer dans le futur l'implication des LT dans le développement de la réponse Ac anti-CPS face à GBS vivante en réalisant des infections expérimentales chez la souris déficiente pour cette population cellulaire.

La (relative) disparité dans la capacité de *S. suis* et GBS à induire une réponse humorale anti-CPS peut s'expliquer par les interactions différentes que ces deux espèces bactériennes exercent avec les APC de l'hôte, régies notamment par la présence de la CPS. En effet, l'expression de la CPS permet à *S. suis* type 2 ou 14 de résister à l'internalisation par les APC (84, 110, 114, 388, 396, 397), alors que la présence de la CPS n'empêche pas GBS type III ou V d'être phagocyté par ces cellules (110, 125, 394, 395). En particulier, la CPS de *S. suis* type 2 perturbe l'intégrité des microdomaines lipidiques au niveau de la cupule phagocytaire, inhibe l'activation des enzymes impliquées dans les voies de signalisation intracellulaires gouvernant la phagocytose des macrophages et des DC, et les rares bactéries internalisées ne survivent pas dans les cellules (113, 114). En revanche, dans le cas de GBS type III, la CPS oriente stratégiquement l'internalisation de la bactérie via la voie dépendante des radeaux lipidiques, ce qui est susceptible de la protéger de la dégradation lysosomale, lui permettant ainsi de survivre plusieurs heures à l'intérieur des APC (395). Aussi, la CPS de *S. suis* interfère fortement avec la maturation et la sécrétion de cytokines et de certaines chémokines par ces cellules (388, 396, 397) contrairement à la CPS de GBS (394, 398). Ainsi, du fait d'un effet immunomodulateur différent des CPS de *S. suis* et GBS, les APC pourraient présenter une capacité différente à traiter et présenter les épitopes antigéniques aux LT et/ou LB, ainsi qu'à recruter ces cellules. Ceci est alors susceptible d'influencer la nature de la réponse humorale subséquente à l'infection par les deux pathogènes.

En marge des différences *S. suis versus* GBS, on peut noter qu'un profil de réponse Ac anti-CPS assez semblable a été obtenu entre les différents sérotypes à l'intérieur de chaque espèce bactérienne (**ARTICLES II et III**). Aucune différence majeure n'a été observée dans la capacité de *S. suis* types 2 et 14 à activer les DC *in vitro* [(397) + Lemire *et al*, manuscrit en préparation]. Par contre, une étude comparant l'interaction de 6 différents sérotypes de *S. suis* avec les DC humaines a démontré que les sérotypes 2 et 14 sont les moins aptes à stimuler la production de cytokines et à

induire l'expression de molécules de co-stimulation, et font partie des sérotypes les plus résistants à l'internalisation par les cellules (397). Concernant GBS, aucune différence significative n'a été non plus reportée dans l'interaction de GBS types III et V avec les DC murines, que ce soit en termes d'internalisation, de survie intracellulaire, de quantité et de profil de cytokines sécrétées ainsi que d'engagement des PRR (394).

On peut émettre l'hypothèse que l'interaction différentielle de *S. suis* et de GBS (type III) avec les PRR des leucocytes puisse être à l'origine des caractéristiques différentes de la réponse humorale anti-CPS. Tout comme pour *S. suis*, le rôle des récepteurs impliqués dans la réponse humorale, et notamment dans la réponse Ac anti-CPS, contre GBS demeure mal identifié. Il a été démontré que les TLR, incluant TLR2, participent à la sécrétion de diverses cytokines et chémokines par les macrophages et des DC infectés *in vitro* par GBS (187, 189). Aussi, un ensemble de travaux publiés ces cinq dernières années a prouvé que l'interaction de divers Ag exprimés à la surface de GBS avec les Siglecs, incluant la CPS, résultait en une modulation complexe de la fonction des APC. Par exemple, tandis que l'interaction de la bactérie avec Siglec-E et -5 résulte en une inhibition de la fonction phagocytaire des APC et/ou favorise la génération d'un environnement anti-inflammatoire (196, 399), la reconnaissance du pathogène par Siglec-1 fournit des signaux d'activation à ces leucocytes en induisant notamment la phagocytose et la destruction de ce dernier (391). Ces interactions hétéroclites pourraient possiblement résulter en l'induction de réponses humorales bien propres à ce pathogène. Toutefois, exception faite pour Siglec-1 comme mentionné dans la section 1.2. de cette discussion, l'implication des récepteurs pré-cités dans les réponses adaptatives contre GBS n'a jamais été explorée. Il serait ainsi intéressant dans le futur d'évaluer leur participation dans la génération des Ac anti-CPS chez l'hôte infecté par GBS, afin d'améliorer non seulement nos connaissances sur l'immunopathogénèse de ce pathogène, mais aussi de fournir une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine du profil différent de la réponse Ac anti-CPS observé chez les souris infectées par *S. suis* et GBS.

A la vue d'un précédent rapport relatant l'implication des NLR dans la capacité de certains sucres microbiens ( $\beta$ -glucanes) à activer les DC et les LB (60), nous avons évalué l'implication de ces récepteurs, et plus particulièrement NOD2, dans l'activation du système immunitaire de l'hôte par GBS type III. Après infection, bien que la production de cytokines soit partiellement atténuée chez les souris déficientes pour l'expression de NOD2, ce récepteur ne semble pas être impliqué dans la capacité de la bactérie à activer les LT et les LB spléniques *in vivo* (mesurée par l'expression de CD69) (**ANNEXE, ARTICLE VII**). Aucun rôle majeur de NOD2 n'a non plus été observé

dans l'activation de la réponse inflammatoire *in vitro* des DC infectées par la bactérie (394). La réponse Ac anti-CPS chez les souris NOD2<sup>-/-</sup> infectées par GBS serait néanmoins intéressante à évaluer dans le futur.

Bien qu'un certain écart dans les titres d'Ac anti-CPS soit observé entre les souris infectées par *S. suis* et GBS (en particulier GBS type III), l'amplitude de la réponse reste relativement faible et la diversité isotypique est limitée (**ARTICLE III**). La capacité globalement faible des animaux infectés par GBS et *S. suis* à monter une réponse humorale CPS-spécifique et/ou la différence de magnitude de cette réponse entre les deux espèces bactériennes pourraient être attribuées tout d'abord aux propriétés immunomodulatrices (distinctes) des composants non capsulaires exprimés au sein de la bactérie et/ou sécrétés. Il a été démontré par exemple que la co-administration d'une souche mutante non capsulée de *S. pneumoniae* type 14 avec un glycoconjugué à base de CPS de cette même bactérie interfère avec le développement de la réponse Ac anti-CPS, et cela serait lié à la capacité de composants de la paroi bactérienne, tel que la PhC, à inhiber la formation des centres germinatifs (400, 401). Toutefois, le domaine sous-capsulaire de GBS type III ne semblerait pas posséder de telles propriétés immunosuppressives (393, 401) et, en ce qui concerne *S. suis* type 2, les souris infectées avec des souches d'origines géographiques différentes montent une réponse Ac anti-CPS similaire (faibles titres d'Ac, profil restreint à l'IgM, absence de réponse mémoire), suggérant que la nature de cette réponse est indépendante de la diversité génotypique/phénotypique des souches à l'intérieur du sérotype (**ARTICLE II**).

Aussi, les propriétés immunomodulatrices intrinsèques aux CPS de *S. suis* et GBS pourraient régir le développement de la réponse Ac CPS-spécifique, et c'est sur ce point que s'est concentrée la suite de nos travaux de recherche dont les résultats vont être discutés dans la section 2. Finalement, il faut mentionner aussi que des différences dans la cinétique de répllication bactérienne ainsi que dans la dissémination et la survie du pathogène dans l'hôte peuvent être à l'origine du profil dissemblable des réponses humorales contre *S. suis* et GBS.

#### **1.4. Le rôle protecteur des Ac anti-CPS face à l'infection par *S. suis* type 2**

Dans notre étude, nous avons observé qu'en association avec la génération d'Ac spécifiques, les souris survivant à la première infection par *S. suis* type 2 présentent une meilleure résistance face à un second challenge bactérien (**ARTICLE II**). Deux rapports précédents avaient également démontré une diminution significative

de la morbidité des porcs face à une seconde infection par *S. suis* type 2 (202, 250). Cependant, les animaux moribonds avaient été traités avec des antibiotiques durant l'infection primaire et l'effet d'une réinfection sur le taux de survie n'avait pas pu être établi.

Le rôle essentiel de l'immunité humorale dans la lutte contre *S. suis* type 2 a été illustré par plusieurs travaux. *In vitro*, l'ajout d'Ac anti-*S. suis* provoque la phagocytose et/ou la destruction du pathogène par les leucocytes humains, porcins et murins (112, 202, 203, 402, 403). *In vivo*, la pré-immunisation des souris et des porcs avec des souches avirulentes ou tuées de la bactérie induit la génération d'Ac spécifiques qui est associée à une meilleure protection des animaux face à un challenge avec la bactérie vivante (202, 402, 403). Le transfert passif de sérums hyperimmuns anti-*S. suis* confère également une protection des animaux contre une infection subséquente (202, 203, 402, 404). Toutefois, la contribution spécifique des Ac dirigés contre la CPS ou bien contre d'autres composants bactériens n'est pas toujours bien établie. La fonctionnalité des Ac anti-CPS dans les tests bactéricides *in vitro* (199, 200, 249), la meilleure efficacité protectrice de bactérines à base de souches de *S. suis* encapsulées *versus* non encapsulées (208), ainsi que la protection conférée par le transfert passif d'IgM anti-CPS aux souris face à l'infection par *S. suis* (200) témoignent du potentiel protecteur de ces Ac. Toutefois, l'efficacité protectrice des Ac dirigés contre divers Ag protéiques de la bactérie a également été démontrée *in vitro* et *in vivo* (198, 201, 204, 228). Dans notre étude, la très faible réponse Ac anti-CPS générée chez les souris et les porcs infectés par *S. suis* type 2 suggérerait plutôt un rôle des Ac anti-protéine dans la protection contre la bactérie. En particulier, en plus d'une forte magnitude, celle-ci est composée des trois sous-classes d'IgG de type 1 (IgG3, IgG2b, IgG2c chez la souris ; IgG2 chez le porc), connues pour leur pouvoir opsonisant particulièrement efficace contre les bactéries extracellulaires (405-408). Il serait toutefois indispensable dans le futur d'évaluer et de comparer la fonctionnalité de ces Ac dans des tests d'opsonophagocytose *in vitro* et/ou dans des expériences de transfert passif chez l'animal, afin de dresser un meilleur portrait de la participation respective de l'immunité humorale anti-CPS et anti-protéine dans la lutte contre l'infection à *S. suis*. On ne peut pas non plus exclure une participation de l'immunité à médiation cellulaire comme cela a été établi pour certains pathogènes extracellulaires incluant *S. pneumoniae* (409-411).

Lorsque produits, les Ac dirigés contre la CPS de *S. suis* et, comme extensivement démontré dans les essais cliniques vaccinaux chez l'homme, contre la

CPS de GBS, jouent un rôle protecteur certain contre les deux pathogènes. Toute la problématique réside dans la capacité de l'hôte infecté à monter une réponse Ac anti-CPS efficace, et cela nécessite notamment une meilleure compréhension de l'effet immunomodulateur de la CPS, ce qui va faire l'objet de la suite de cette discussion.

## 2. Propriétés immunomodulatrices intrinsèques des CPS purifiées de *S. suis* et GBS

### 2.1. Caractéristiques de la réponse Ac anti-CPS suite à l'immunisation par les CPS purifiées de *S. suis* et GBS

Afin d'évaluer exclusivement l'effet de la biochimie des CPS de *S. suis* et GBS sur le développement de la réponse Ac anti-CPS, il nous était indispensable de conduire nos expériences avec des CPS hautement purifiées des deux pathogènes. Ainsi, subséquemment à l'étape de purification, chaque CPS a subi une série de tests physicochimiques et immunologiques rigoureux qui ont attesté de la préservation des épitopes antigéniques ainsi que leur haut degré de pureté (**ARTICLE I**). On peut souligner que dans le contexte de cette thèse, nous avons déterminé pour la première fois la structure de la CPS de *S. suis* type 14 (**ANNEXE, ARTICLE VI**), décrite dans la partie « Revue de la littérature ».

L'administration de ces CPS purifiées aux souris a conduit à un profil de réponse humorale sérique bien différent. Alors que les souris immunisées avec la CPS de GBS type III sont capables de monter une bonne réponse IgM spécifique, comme reporté dans la littérature (393, 412, 413), nous n'avons détecté aucune réponse Ac anti-CPS chez les souris immunisées avec la CPS de *S. suis* type 2 ou 14 ou GBS type V (**ARTICLE III**). Une immunogénicité moindre de la CPS purifiée de GBS type V par rapport à celle de GBS type III a déjà été mentionnée (247). Aucune de ces CPS n'a induit d'IgG chez l'hôte receveur.

Le profil global de la réponse humorale obtenu suite à l'immunisation avec les CPS purifiées de GBS et *S. suis* (faible/absence de titres d'Ac, profil isotypique réduit à l'IgM) est en adéquation avec la nature TI de ces Ag. En effet, du fait de leur incapacité à se complexer aux molécules de CMH-II, cette catégorie de molécules ne peut pas recruter l'aide des LT dans la mise en place de la réponse humorale. Inaptes à induire la formation robuste de centres germinatifs, ces molécules sont engagées typiquement dans les réactions extrafolliculaires qui résultent principalement en la génération de plasmocytes à profil isotypique limité (251, 252). Bien que la réponse soit majoritairement composée d'IgM, on peut souligner que certaines sous-classes d'IgG, et en particulier l'IgG3 chez la souris, peuvent également être générées contre la CPS purifiée de diverses bactéries incluant *H. influenzae* type b, *N. meningitidis* groupe C, et divers sérotypes de *S. pneumoniae* (251, 414). La détection d'IgG3 a

également été décrite chez la souris immunisée avec la CPS purifiée de GBS type III (412), et des variations des conditions expérimentales (souche de souris, dose de CPS) pourraient expliquer les résultats différents de notre étude. La restriction générale de la réponse IgG anti-CPS à la sous-classe IgG3 peut être due à l'existence d'un répertoire pré-immun des clones de LB CPS-spécifique génétiquement prédisposé à l'IgG3 et/ou à la disposition des gènes de la région constante des Ig (311, 415, 416). Comme expliqué dans partie « Revue de la littérature », les cytokines BAFF/APRIL sécrétées par les APC joueraient un rôle essentiel dans le phénomène de CSR des LB CPS-spécifiques en dehors du contexte TD des réactions folliculaires.

Bien que l'étude de la réponse Ac anti-CPS mémoire face aux bactéries encapsulées ne fût l'objectif principal de cette thèse, il est toutefois intéressant de mentionner que suite à une seconde immunisation des souris avec la CPS purifiée de *S. suis* ou GBS, nous n'avons pas observé de réponse humorale spécifique amplifiée (**ARTICLE III**). Comme expliqué dans la section « Revue de la littérature », certains Ag polysaccharidiques sont capables d'induire une réponse mémoire comprenant à la fois une composante plasmocytaire et lymphocytaire (286). Générés dans les premiers temps de la réponse primaire, les plasmocytes « mémoires », logés principalement dans la moelle osseuse, seraient responsables de la sécrétion constante d'Ac spécifiques plusieurs mois après immunisation. Dans notre étude, l'absence d'Ac sériques spécifiques chez les souris immunisées avec les CPS de *S. suis* types 2 et 14 et GBS type V durant les 6 semaines de la période d'étude suggère que ces CPS sont incapables d'induire la génération de ces cellules. De plus, aucun ASC CPS-spécifique n'a été détecté au niveau de la moelle osseuse de ces souris (données non montrées). Contrairement aux plasmocytes mémoires, les LB mémoires (« composante lymphocytaire ») polysaccharide-spécifiques n'ont pas de fonction effectrice en eux-mêmes et requièrent une restimulation par l'Ag afin de se différencier en plasmocytes. Il a été démontré que les Ac spécifiques générés au cours de la réponse primaire exercent un rétrocontrôle négatif sur la réactivation des LB mémoires qui est beaucoup plus strict dans le cas des réponses TI que TD (286, 288). Les mécanismes de cette inhibition ne sont pas bien connus mais seraient indépendants de l'interaction des Ig avec les récepteurs Fc des LB. Ainsi, il a été établi que la réactivation des LB mémoires polysaccharide-spécifiques ne pouvait être réalisée que suite au transfert adoptif de ces cellules chez un hôte naïf avant la réexposition à l'Ag. Il pourrait être intéressant dans le futur d'utiliser cette méthodologie afin d'évaluer si la CPS purifiée de GBS type III est capable d'induire la génération de LB mémoires.

La faible capacité des souris infectées par *S. suis* et GBS à développer une réponse humorale CPS-spécifique ne semble donc pas s'expliquer par un effet immunosuppresseur des composants non capsulaires bactériens. Au contraire, en ce qui concerne *S. suis* type 2 et GBS type V, la réponse Ac anti-CPS est absolument dépendante de l'expression de la CPS à la surface bactérienne. Les propriétés immunomodulatrices intrinsèques de la CPS sont donc susceptibles de jouer un rôle majeur sur la nature de la réponse Ac anti-CPS induite au cours de l'infection par les deux pathogènes. Face au constat que la CPS purifiée de GBS type III est (relativement) plus apte à déclencher une réponse humorale spécifique chez l'hôte contrairement aux CPS de GBS type V et *S. suis*, nous nous sommes penchés sur les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de cette disparité, mais aussi à l'origine du caractère globalement peu immunogénique de ces Ag.

## **2.2. Propriétés immunomodulatrices des CPS purifiées de *S. suis* et GBS sur la réponse inflammatoire des DC**

Les DC sont des acteurs clé dans la détection des pathogènes, via l'expression d'un large panel de PRR, incluant les TLR, ainsi que dans l'orchestration des réponses immunitaires subséquentes. Elles jouent un rôle indispensable dans les réponses humorales TI via la sécrétion de facteurs solubles susceptibles de se substituer aux signaux fournis par les LT durant les réponses TD. Néanmoins, l'interaction des CPS bactériennes avec ces cellules avait été très peu investiguée au début de ce projet. Dans le cadre de cette thèse, nous avons évalué et comparé pour la première fois l'interaction des CPS purifiées de *S. suis* et GBS avec les DC en nous concentrant sur la capacité de ces molécules à induire la production de cytokines *in vitro*. Nous avons réalisé nos expériences avec les DC de souris, le modèle murin étant largement utilisé dans la littérature pour l'étude de l'immunopathogénèse de *S. suis* et GBS (110, 145, 387, 388, 396, 397, 417).

### - Evaluation de la réponse pro-inflammatoire cytokinique

Les CPS de *S. suis* et GBS sont similairement incapables d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, TNF- $\alpha$ ) par les DC (**ARTICLE I**). Aucune production de cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) par les monocytes/macrophages humains/murins stimulés *in vitro* avec la CPS purifiée de *S. suis* type 2 n'avait non plus été détectée auparavant (143, 145), et d'autres composants exprimés au sein de la bactérie et/ou sécrétés seraient principalement



responsables de la réponse inflammatoire de l'hôte infecté par ce pathogène (149, 154-156). En ce qui concerne GBS type III, le PG, le polysaccharide du groupe B, les lipoprotéines et les acides nucléiques contribuent majoritairement à la production de cytokines *in vivo* chez la souris et/ou *in vitro* par les monocytes/macrophages humains/murins (150-152, 157-160). Certaines études mentionnent cependant que la CPS purifiée de GBS type III serait capable d'induire la sécrétion de certaines cytokines (TNF- $\alpha$  et IL-6) par les monocytes/macrophages humains *in vitro* (151-153), et la divergence avec nos résultats pourrait s'expliquer par l'utilisation de différents types cellulaires et/ou par des variations dans la méthode de purification. Finalement, des études réalisées avec la CPS purifiée d'autres pathogènes, incluant *S. pneumoniae* (308), *N. meningitidis* (361), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (418) et *Vibrio vulnificus* (419) ont également démontré la faible capacité de cette molécule à stimuler la production de cytokines et/ou l'expression des molécules de co-stimulation par les leucocytes de l'hôte, incluant les DC.

#### - Evaluation de la réponse pro-inflammatoire chémokinique

En opposition avec l'incapacité des DC à sécréter des cytokines pro-inflammatoires, les cellules produisent des quantités remarquables de CCL2 et CCL3 en présence des CPS purifiées de *S. suis* et GBS (**ARTICLE I**). Alors que la capacité de la CPS purifiée de *S. suis* type 2 à induire l'expression et la sécrétion de CCL2 par les leucocytes humains, murins et porcins avait déjà été rapportée dans la littérature (145, 417), l'induction de CCL3 par la CPS de *S. suis* n'avait jamais été décrite auparavant. De plus, notre étude est la première à mentionner l'aptitude de la CPS purifiée de GBS à promouvoir la sécrétion de chémokines. Ces observations sont en adéquation avec la forte diminution de la production de CCL2 et CCL3 par les leucocytes totaux, les monocytes et/ou les DC stimulés par des souches mutantes non capsulées de *S. suis* et GBS (145, 394, 417). Outre la production de CCL2, la libération d'autres chémokines par les monocytes/macrophages et les DC (incluant CCL5/RANTES, CXCL1/KC, CXCL2/MIP-2, CXCL8/IL-8 et/ou CXCL10/IP-10) a également été rapportée pour les CPS purifiées de *N. meningitidis* (420), *Porphyromonas gingivalis* (421), *B. fragilis* (422) et/ou *S. aureus* (423). Nous n'avons toutefois pas détecté la présence d'autres chémokines (CXCL1, CXCL9/MIG) dans le surnageant de DC stimulées par les CPS purifiées de *S. suis* et GBS (données non montrées).

Alors que les TLR jouent un rôle décisif dans la reconnaissance des bactéries encapsulées et le déclenchement des réponses immunes subséquentes, leur capacité à interagir directement avec les CPS bactériennes est encore sujette à débat. Au vu de l'implication de ces récepteurs, et notamment TLR2, dans la réponse inflammatoire des cellules de l'immunité innée face à *S. suis* (145, 387, 388) et GBS (187, 189), nous avons étudié leur rôle dans la production de CCL2 et CCL3 par les DC stimulées en présence de la CPS purifiée de ces deux bactéries. Alors que la sécrétion de CCL3 est partiellement dépendante de TLR2 et MyD88, la production de CCL2 ne met pas en jeu la voie des TLR MyD88-dépendante (**ARTICLE I**). En adéquation avec ces résultats, la CPS purifiée de *S. suis* type 2 induit la libération de CCL2 par les monocytes humains et les macrophages murins de façon TLR2- et MyD88-indépendante (145). L'expression de CCL2 par les macrophages incubés avec GBS type III (bactérie entière) a aussi été rapportée comme étant TLR2-indépendante, alors que la présence du récepteur est requise pour l'expression optimale de CCL3 (189). Les mécanismes à l'origine de l'implication différentielle des TLR dans la sécrétion de CCL2 et CCL3 restent incompris, les voies de régulation de la synthèse de ces deux molécules étant similaires (implication de la voie des MAPK et du NF- $\kappa$ B par exemple) (424-426).

L'inhibition plus marquée de la sécrétion de CCL3 par les DC MyD88<sup>-/-</sup> par rapport aux DC TLR2<sup>-/-</sup> suggère que d'autres TLR seraient mis en jeu dans la production de cette chémokine. A cet égard, TLR4 a été rapporté comme étant impliqué dans la production de CXCL8 par les macrophages stimulés *in vitro* avec la CPS purifiée de *N. meningitidis* (420). Ce récepteur est aussi engagé dans la réponse inflammatoire des DC et des macrophages activés avec les polysaccharides purifiés des végétaux *Polyporus umbellatus* (427, 428), *Chlorella pyrenoidosa* (429) et *Radix glycyrrhizae* (430). Comme la signalisation en aval de TLR4 peut se faire de façon MyD88-indépendante (mais TRIF-dépendante) (40), la participation de ce récepteur dans la sécrétion de CCL2 induite par les CPS de *S. suis* et GBS ne peut pas être exclue. Finalement, les récepteurs lectines, qui jouent un rôle clé dans la reconnaissance des saccharides microbiens, seraient d'autres candidats potentiels. A cet égard, Siglec-14 a dernièrement été démontré comme participant à la sécrétion de CXCL8 par les monocytes humains infectés par GBS (431). Il est intéressant de noter que la production de CCL2 par les DC murines médiée par la CPS de GBS type III (exprimée dans le contexte de la bactérie entière) a récemment été prouvée comme étant spécifiquement dépendante de la voie de la caveoline-1 (395). Cette molécule est localisée au niveau des radeaux lipidiques, des plateformes membranaires

connues pour faciliter la signalisation des PRR incluant les récepteurs lectines (432, 433).

CCL2 et CCL3 sont deux chémokines qui jouent un rôle majeur dans le recrutement sélectif de monocytes, macrophages, DC et lymphocytes aux sites d'inflammation (434, 435). Les CPS de *S. suis* et GBS pourraient ainsi contribuer de façon critique aux réponses inflammatoires exacerbées typiques de l'immunopathogénèse de ces deux bactéries. A cet égard, la production systémique de CCL2 ainsi que son expression au niveau du cerveau sont des caractéristiques des souris infectées par *S. suis* type 2 (135), et la présence de la chémokine est associée aux signes cliniques de la septicémie à GBS chez les nouveau-nés (436).

#### - Evaluation de la réponse anti-inflammatoire

A côté de la nature faiblement immunogénique des CPS bactériennes, il a été suggéré que ces molécules pouvaient aussi exercer un effet immunosuppresseur conséquent sur les APC de l'hôte en stimulant l'expression d'un profil de cytokines régulatrices au détriment des cytokines pro-inflammatoires. Bien que les CPS purifiées de *S. suis* et GBS ne favorisent pas la génération d'un environnement riche en cytokines pro-inflammatoires, ces molécules ne stimulent pas pour autant la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 par les DC (**ARTICLE I**).

Contrairement à nos résultats, la CPS purifiée de *C. neoformans* provoque la sécrétion d'IL-10 par les monocytes/macrophages (44), et l'ajout de la CPS purifiée de divers sérotypes de *S. pneumoniae* (type 14 ou 19F) aux DC cultivées en présence de LPS conduit à une augmentation de la sécrétion de cette cytokine (308). Similairement, le lipoarabinomannane de la paroi de la bactérie *M. tuberculosis* délivre un signal négatif aux DC qui résulte en l'augmentation de la sécrétion d'IL-10 par les cellules stimulées avec le LPS. On peut noter qu'en plus de favoriser un environnement anti-inflammatoire, certaines CPS, incluant les CPS de *N. meningitidis* groupe C et de *C. neoformans*, seraient aussi susceptibles d'inhiber la capacité de présentation antigénique des APC en réprimant l'expression des molécules de co-stimulation et du CMH-II (44, 361). Alors que ces expériences illustrent le fort potentiel inhibiteur des CPS sur les cellules de l'immunité innée, les conséquences de ces interactions sur la mise en place de l'immunité adaptative ont été très peu explorées. En revanche, une série d'études portant sur les ZPS prouve que ces molécules orchestrent la mise en place de réponses adaptatives de type « suppressif » (437-439).

L'ensemble de ces travaux suggèrent que les CPS possèdent des propriétés immunosuppressives et seraient susceptibles d'orienter la génération de DC vers un profil « tolérogène » (440, 441) interférant potentiellement avec la mise en place de réponses humorales efficaces. Il serait ainsi très intéressant dans le futur d'approfondir l'étude phénotypique et fonctionnelle des DC incubées en présence des CPS purifiées de *S. suis* et GBS, en évaluant notamment l'expression des molécules de co-stimulation, la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme TGF- $\beta$ , ou encore l'expression de marqueurs tolérogènes comme PD-1L («programmed death-1 ligand ») (442, 443).

Pour conclure cette partie, l'incapacité des CPS purifiées de *S. suis* et GBS à induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les DC pourrait expliquer la faible immunogénicité de ces molécules. Nous n'avons pas observé de différences significatives inter- ou intra-espèces dans l'interaction de la CPS avec ces cellules, que ce soit en termes de sécrétion de cytokines pro/anti-inflammatoires (inexistante) ou bien de chémokines (taux similaires). Si on replace ces résultats dans le contexte d'une infection bactérienne, la capacité de la CPS de *S. suis*, contrairement à la CPS de GBS, à interférer drastiquement avec l'internalisation du pathogène par les APC (notamment les DC), résultant en une altération générale de la maturation des cellules et de l'établissement d'un environnement pro-inflammatoire, est plus susceptible d'entrer en compte dans la disparité du profil de la réponse Ac anti-CPS dirigée contre ces deux pathogènes. Il n'en demeure pas moins que ces réponses restent globalement faibles/de nature isotypique limitée pour les deux pathogènes et les trois dernières sections qui suivent vont discuter des mécanismes qui en sont possiblement à l'origine.

### **2.3. Propriétés immunomodulatrices des CPS purifiées de *S. suis* et GBS sur le système BAFF/APRIL**

Les cytokines BAFF/APRIL produites par les APC, incluant les DC, jouent un rôle clé dans le développement des réponses humorales TI, en promouvant notamment la CSR et la différenciation finale des LB en plasmocytes (335-337). Les souris qui présentent un défaut dans l'expression de BAFF ou ses récepteurs (notamment TACI) sont incapables de monter une réponse Ac spécifique optimale suite à l'immunisation par les Ag polysaccharidiques purifiés (327, 329). Nous avons observé que les CPS purifiées de *S. suis* et GBS sont non seulement inaptes à induire l'expression de BAFF par les DC murines *in vitro*, mais elles interfèrent aussi avec la

capacité de l'IFN- $\gamma$  à induire l'expression de cette cytokine par les cellules (**ARTICLE I**). On peut noter qu'ici encore, aucune différence inter- ou intra-espèces n'a été vue. Malgré l'altération de l'expression de BAFF provoquée par les CPS, nous n'avons pas observé de diminution de la capacité des DC prétraitées par les CPS à induire, en présence d'IFN- $\gamma$ , la sécrétion d'IgM et d'IgG (non spécifiques) par les LB spléniques *in vitro* (données non montrées). Les CPS n'interfèrent pas non plus avec la production d'Ig par les LB stimulés en présence de BAFF exogène *in vitro* (**ARTICLE III**).

Un petit nombre de travaux a rapporté que certaines CPS microbiennes exerceraient un certain effet immunosuppresseur sur le système BAFF/APRIL. Par exemple, on constate un défaut d'expression de TACI par les LB du sang des patients souffrant de méningite à *C. neoformans* (444). Aussi, la CPS purifiée de *N. meningitidis* type C inhibe la production de BAFF par les DC murines stimulées *in vitro* par l'IFN- $\gamma$  (445). Cette CPS cause également une diminution de l'expression de TACI et BAFFR par les LB, résultant en une altération de la capacité des cellules à proliférer et à se différencier en plasmocytes sécréteurs d'IgG et d'IgM en réponse à BAFF (445). Les mécanismes responsables du pouvoir immunosuppresseur différentiel des CPS purifiées de *N. meningitidis* type C versus *S. suis* et GBS demeurent incompris. La CPS de *N. meningitidis* étant un homopolymère de Neu5Ac( $\alpha$ 2-9), l'interaction avec différents types de Siglecs et/ou avec une affinité différente pour ces récepteurs pourrait en être à l'origine. Nous reviendrons sur ce point dans la section 2.5. A cet égard, on peut noter que le NP-Ficolin, un Ag TI non sialylé, n'exerce aucun des effets inhibiteurs observés avec la CPS de *N. meningitidis* (445). Il serait toutefois intéressant dans le futur d'étudier plus en détails les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des LB spléniques incubés avec les CPS de *S. suis* et GBS, telles que la modulation de l'expression des récepteurs du système BAFF/APRIL, ainsi que leur réponse proliférative. Il serait aussi pertinent de réaliser ces expériences avec la population de LB-1 des cavités péritonéales qui, tout comme les LB MZ, participe de façon critique aux réponses humorales TI.

Pour contrer l'effet inhibiteur des CPS sur le système BAFF/APRIL, il a été rapporté que l'ajout exogène de BAFF peut améliorer l'efficacité de la réponse humorale anti-CPS en diminuant notamment l'apoptose des LB spécifiques. Ainsi, la co-immunisation du Pneumovax avec BAFF induit une augmentation de la réponse IgM anti-CPS chez la souris (328). Il pourrait ainsi être très intéressant d'évaluer si l'administration de BAFF peut restaurer et/ou optimiser la capacité des souris à monter une réponse Ac *in vivo* face aux CPS purifiées de *S. suis* et GBS.

La plupart des études jusqu'à présent ont porté sur l'interaction du système BAFF/APRIL avec des Ag TI purifiés. Une seule étude réalisée avec le modèle d'infection à *B. hermsii* a démontré que les souris déficientes pour l'expression de BAFF ou BAFFR présentent une altération de la réponse IgM spécifique TI qui est corrélée à une plus grande sensibilité des animaux au pathogène (331). La participation du système BAFF/APRIL dans le développement de la réponse humorale anti-CPS lors des infections bactériennes encapsulées reste un champ de recherche inexploré. Il serait très informatif d'étudier les caractéristiques de la réponse Ac anti-CPS subséquente à l'infection par *S. suis* et GBS chez les souris déficientes pour l'expression des molécules du système BAFF/APRIL, notamment les souris BAFF<sup>-/-</sup>, BAFFR<sup>-/-</sup> et TACI<sup>-/-</sup>.

#### **2.4. Propriétés immunomodulatrices des CPS purifiées de *S. suis* et GBS sur les ligands des TLR**

Outre les cytokines, il a été suggéré que les ligands des TLR constitueraient des acteurs moléculaires indispensables dans le développement des réponses humorales TI en agissant à la fois sur les systèmes immunitaires inné et adaptatif. *In vitro*, ces molécules favorisent notamment la sécrétion de BAFF par les APC (335, 446-448) ainsi que l'expression de TACI et BAFFR par les LB (325, 332, 334, 449, 450), et le co-engagement des TLR et de TACI au niveau des LB garantit une activation optimale de ces cellules (349). Finalement, il a récemment été démontré que l'interaction directe des ligands des TLR, et en particulier les CpG, avec les LB polysaccharide-spécifiques favorise leur survie, leur prolifération ainsi que leur différenciation finale en plasmocytes (289). En adéquation avec ces principes mécanistiques, l'ajout d'agonistes des TLR exerce un effet adjuvant sur la réponse humorale *in vivo* dirigée contre PS3 purifié chez la souris adulte et restaure la capacité des souriceaux à répondre à ce type d'Ag (289, 451). Aussi, l'immunogénicité du vaccin commercial Pneumovax dépendrait de la présence de contaminants en ligands des TLR (352). Malgré ces considérations, l'ajout exogène de ligands de TLR4 (monophosphoryl lipide A) ou TLR9 (CpG) n'a pas permis de rétablir la capacité des souris à monter une réponse humorale face à la CPS purifiée de *S. suis* type 2 (**ARTICLE III**). Tout comme notre étude, les CpG ne potentialisent pas la réponse Ac dirigée contre les CPS purifiées d'*H. influenzae* type b (353), *N. meningitidis* groupe C (445), ni *S. pneumoniae* type 6B, 19F ou 23F (354).

En adéquation avec ces observations, un ensemble de travaux a montré que certains polysaccharides bactériens interfèrent avec la capacité des ligands des TLR à activer les acteurs cellulaires de la réponse humorale. Ainsi, les CPS purifiées de *C. neoformans* (368) et *N. meningitidis* groupe C (361) ainsi que le lipoarabinomannane de *M. tuberculosis* (372) inhibent la maturation et la production de cytokines pro-inflammatoires par les APC stimulées avec le LPS. Une interférence entre les voies de signalisation des TLR et des lectines a été proposée (372, 378). Aussi, alors que nous n'avons pas vu d'effet immunosuppresseur de la CPS purifiée de *S. suis* type 2 sur la capacité des CpG à induire la production d'Ig par les LB spléniques *in vitro* (**ARTICLE III**), une étude a démontré que la CPS purifiée de *N. meningitidis* inhibe l'expression de TACI et BAFFR par les LB stimulés par les CpG, résultant en une moins bonne activation des cellules face à BAFF (445). Des études complémentaires portant sur l'effet immunomodulateur de la CPS de *S. suis* type 2 sur la capacité des CpG à activer les DC (évaluation du profil de la réponse inflammatoire) et les LB (évaluation de l'expression des récepteurs du système BAFF/APRIL) aideraient à comprendre pourquoi l'administration des CpG n'aide pas à induire une réponse Ac spécifique chez les souris immunisées avec la CPS purifiée de *S. suis* type 2.

Enfin, dans la continuité des observations décrites dans les sections 2.3. et 2.4, si les composants bactériens non capsulaires de *S. suis* et GBS (que l'on peut considérer comme des ligands des TLR) sont capables d'induire l'activation du système BAFF/APRIL par les cellules immunitaires de l'hôte, il serait extrêmement pertinent d'analyser l'effet immunomodulateur de la CPS sur cette activation dans le contexte de la bactérie entière. Ceci pourra certainement contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine du profil de la réponse Ac anti-CPS observé chez les souris infectées par *S. suis* et GBS.

## **2.5. Rôle de l'acide sialique sur les propriétés immunomodulatrices des CPS purifiées de *S. suis* et GBS**

L'acide sialique est une famille de sucres ubiquitaires chez les eucaryotes qui interviennent dans de nombreux processus biologiques et notamment dans le maintien de l'homéostasie. A cet égard, l'interaction de l'acide sialique exprimé à la surface des leucocytes avec les Siglecs localisés en *cis* régule les réactions inflammatoires des cellules de l'immunité innée et participe au phénomène de tolérance des LB (37, 49, 51-53). Certains pathogènes ont développé l'habileté remarquable d'incorporer des molécules d'acide sialique et cela leur permettrait d'échapper aux défenses immunes

de l'hôte (37, 452). Face au constat de la faible immunogénicité des CPS de *S. suis* et GBS, des polysaccharides contenant de l'acide sialique, nous avons évalué l'effet immunomodulateur de ce sucre sur l'interaction des CPS avec l'immunité de l'hôte. Etant donné que l'inactivation des gènes impliqués dans la synthèse de l'acide sialique capsulaire induit une perte considérable voire totale de l'expression de la CPS à la surface de *S. suis* et GBS (84, 453, 454), nous avons analysé l'influence de ce sucre en utilisant des CPS purifiées chimiquement désialylées des deux pathogènes. L'absence d'acide sialique a été rigoureusement confirmée par divers tests physicochimiques et immunologiques (**ARTICLE I**).

La présence de l'acide sialique n'exerce aucune influence majeure sur les interactions *in vitro* des CPS purifiées de *S. suis* et GBS avec les DC (**ARTICLE I**). En particulier, le sucre n'est pas responsable de l'inaptitude des CPS à induire la production de cytokines. L'acide sialique n'est pas non plus impliqué dans la capacité des CPS purifiées des deux pathogènes à interférer avec l'expression de BAFF par les DC médiée par l'IFN- $\gamma$ . Aucune étude jusqu'à présent n'avait examiné l'effet immunomodulateur de l'acide sialique d'une CPS microbienne soluble sur les cellules immunitaires innées. Ces résultats peuvent être surprenants à la vue des études *in vitro*, au nombre croissant ces cinq dernières années, démontrant que les pathogènes sialylés (entiers) entravent l'activation de l'immunité innée de l'hôte. Par exemple, la reconnaissance de l'acide sialique des mucines de *T. cruzi* par Siglec-E module la réaction inflammatoire des DC humaines, en orientant la réponse vers un profil anti-inflammatoire. Bien que le parasite soit capable d'inhiber la production d'IL-12 et de stimuler la libération d'IL-10 par les cellules, on peut toutefois souligner qu'aucun effet de l'acide sialique n'a été observé sur la synthèse de CCL2, IL-6 ou TNF- $\alpha$  (378). Aussi, l'interaction de l'acide sialique du LOS de *C. jejuni* avec Siglec-1 résulte en une inhibition de la production d'IL-12 par les DC humaines, polarisant la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> vers un profil de type Th2 (379). Finalement, l'interaction de GBS type III avec Siglec-E et -9 médiée par l'acide sialique capsulaire altère non seulement les fonctions bactéricides des macrophages et des neutrophiles, respectivement, mais interfère aussi avec la génération d'un environnement cytokinique pro-inflammatoire (195, 399).

Au début de ce projet, très peu d'études avaient évalué l'effet immunomodulateur de l'acide sialique sur la génération de la réponse humorale anti-CPS. Dans le cadre de cette thèse, nous avons décrit pour la première fois que l'acide sialique n'exerce aucune influence sur le profil *in vivo* de la réponse Ac dirigée contre



les CPS purifiées de *S. suis* et GBS (**ARTICLE III**). En particulier, la présence de l'acide sialique n'est pas responsable de l'inaptitude des souris immunisées avec les CPS purifiées de *S. suis* types 2 et 14 et GBS type V à développer une réponse humorale spécifique. L'incapacité des ligands de TLR (CpG, monophosphoryl lipide A) à adjuvanter cette réponse ne peut pas non plus être imputée à la présence du sucre (**ARTICLE III**). On peut mentionner que contrairement à l'acide sialique des CPS de *S. suis* types 2 et 14 et GBS type V [(76, 247) + **ANNEXE, ARTICLE VI**], l'acide sialique de la CPS de GBS type III exerce un contrôle conformationnel sur la structure hélicoïdale de l'épitope immunodominant (455, 456), expliquant l'altération de l'immunogénicité de la CPS désialylée. La disposition différentielle de l'acide sialique par rapport à la chaîne principale de l'unité répétitive (étant séparé d'un sucre de moins dans la CPS de GBS type III) serait responsable de l'effet observé. Contrairement à nos résultats, l'incorporation artificielle de résidus d'acide sialique dans la structure de l'Ag TI synthétique NP-polyacrylamide (NP-PA) abolit totalement la capacité de la molécule à induire une réponse Ac spécifique chez la souris, et cela est directement lié à l'interaction de l'Ag sialylé avec les récepteurs CD22 et Siglec-G exprimés à la surface des LB (457).

L'incapacité de l'acide sialique des CPS purifiées de *S. suis* et GBS à entrer en compétition avec les ligands sialylés en *cis* des leucocytes murins pour la liaison aux Siglecs pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas observé d'effet immunomodulateur du sucre. Les expériences pré-citées démontrant un effet immunosuppresseur de l'acide sialique sur la réponse immunitaire innée ont été réalisées avec un pathogène entier, ce qui peut faciliter l'interaction de l'acide sialique microbien avec les Siglecs de l'hôte. En effet, certains pathogènes sialylés comme *C. jejuni* et *T. cruzi* expriment des sialidases qui pourraient perturber l'interaction des Siglecs avec les ligands sialylés en *cis* (379, 458). A notre connaissance, la présence de telles enzymes n'a toutefois pas été rapportée chez *S. suis* ou GBS. L'interaction de la bactérie avec les TLR exprimés à la surface cellulaire pourrait aussi éventuellement faciliter son interaction avec les Siglecs (379). Aussi, dans l'étude de Duong *et al.*, l'Ag NP-PA sialylé a été spécialement conçu afin d'être un ligand de forte affinité pour CD22 (457). Ainsi, nous ne pouvons pas totalement exclure un éventuel rôle immunosuppresseur de l'acide sialique des CPS de *S. suis* et GBS exprimées dans le contexte de la bactérie entière. Des expériences complémentaires sont donc nécessaires afin de mieux appréhender le rôle de ce sucre dans l'immunopathogénèse des deux bactéries. Il serait notamment intéressant de comparer l'interaction *in vitro* des CPS purifiées natives et désialylées des deux pathogènes avec les leucocytes

préalablement traités avec des sialidases ou bien isolés de souris déficientes pour l'expression du gène *ST6Gal* codant pour une  $\alpha$ 2-6 sialyltransférase qui génère des ligands sialylés de CD22 (459). Il serait aussi particulièrement pertinent d'évaluer l'interaction des deux bactéries avec les cellules provenant de souris génétiquement déficientes pour l'expression de Siglecs telles que les souris Siglec-E<sup>-/-</sup> (460), CD22<sup>-/-</sup> (457, 461) ou Siglec-G<sup>-/-</sup> (52, 457). L'évaluation des caractéristiques de la réponse humorale anti-CPS suite à l'immunisation avec la CPS purifiée (native *versus* désialylée) de *S. suis* et GBS ou suite à l'infection par la bactérie entière chez ces souris serait aussi très informative.

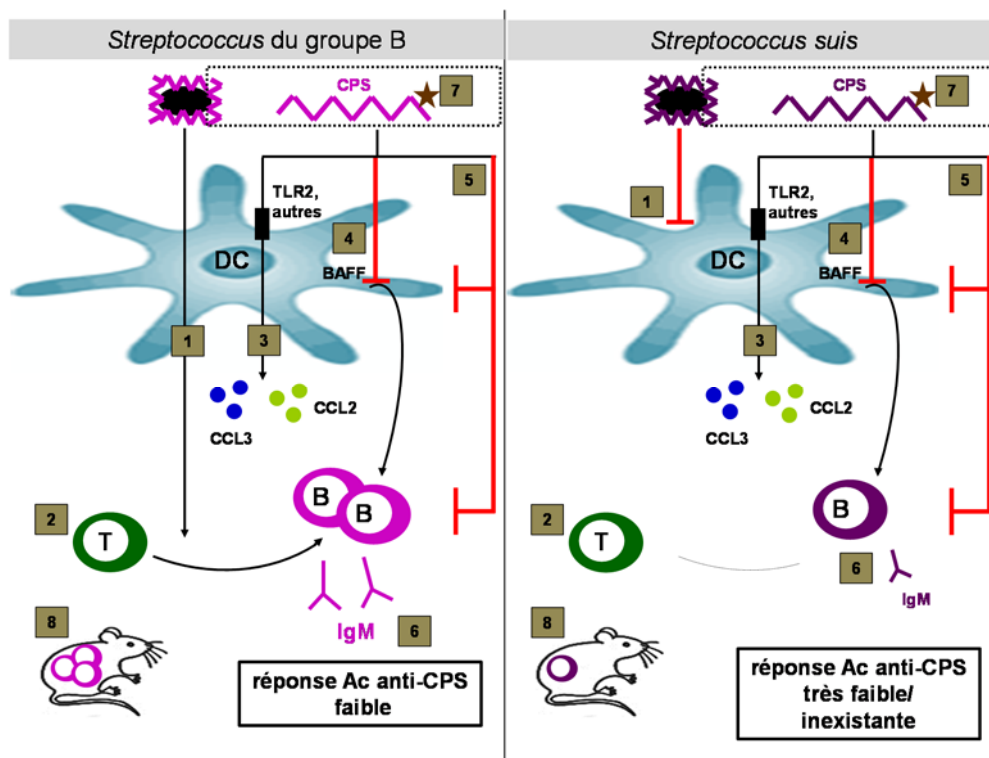
Finalement, on peut noter qu'outre la présence d'acide sialique, d'autres propriétés biochimiques intrinsèques des CPS de *S. suis* et GBS pourraient influencer leur capacité à induire une réponse humorale. La masse moléculaire de la CPS pourrait être un premier critère. En comparant l'immunogénicité de différentes fractions obtenues après séparation de la CPS de GBS type III native par filtration sur gel, une étude a démontré que la magnitude de la réponse Ac induite chez la souris est directement proportionnelle à la taille de la CPS (413). Toutefois, ces conclusions diffèrent selon le type de CPS étudié et par exemple, la dépolymérisation de la CPS de GBS type II (462) ou de *S. pneumoniae* type 19F (463) augmente leur immunogénicité chez l'animal. Aussi, une étude a conclu qu'un glycoconjugué composé de la CPS de GBS type III dont la taille est à la fois suffisamment petite pour pouvoir favoriser les interactions LB/LT et suffisamment grande pour conserver l'épitope conformationnel complet de la CPS native, confère une protection optimale (464). On peut noter que l'immunisation des souris avec la CPS purifiée de *S. suis* type 2 dépolymérisée à 100 kDa (*versus* 400 kDa sous forme native) ne nous a pas permis d'observer une meilleure immunogénicité de la molécule, la réponse Ac anti-CPS demeurant indétectable (Goyette-Desjardins G, manuscrit en préparation).

Hormis la taille, la charge est un autre facteur qui peut influencer le pouvoir immunostimulateur des CPS. En particulier, la présence d'un motif zwitterionique au sein de la structure de certaines CPS assure leur fixation sur les molécules du CMH-II en favorisant les interactions électrostatiques et en conférant une conformation tridimensionnelle adéquate à la CPS (30, 465, 466). L'introduction d'une charge zwitterionique dans la CPS purifiée de GBS type III lui attribue des propriétés immunostimulatrices similaires à celles d'une ZPS naturelle. En particulier, celle-ci présente une plus grande capacité à activer les APC et subséquemment les LT *in vitro* (467) et induit une meilleure réponse Ac anti-CPS chez la souris (468). Néanmoins, à l'état naturel, les CPS de *S. suis* et GBS sont des molécules anioniques non

zwitterioniques et donc la charge ne serait pas à l'origine de leur différence d'immunogénicité.

Ainsi, pour conclure cette partie, l'incapacité globale de l'hôte à monter une réponse Ac efficace contre les CPS de *S. suis* et GBS ainsi que les différences d'immunogénicité que ces CPS présentent entre elles ne seraient pas liées à la présence de molécules d'acide sialique. D'autres critères dans la composition et/ou la structure entreraient donc en compte. Ces propriétés biochimiques pourraient gouverner l'interaction des CPS avec des récepteurs inhibiteurs (différents) exprimés par les leucocytes de l'hôte mais pourraient aussi définir des épitopes moléculaires (trop) similaires à certains composants cellulaires/moléculaires des eucaryotes. La mauvaise réponse de l'hôte face aux CPS de *S. suis* et/GBS serait alors due à la délétion de clones de LB spécifique du répertoire au cours de l'ontogénèse (car considérés comme « auto-réactifs »).

La **Figure 11** propose un modèle des mécanismes du développement de la réponse humorale dirigée contre les CPS de *S. suis* et GBS selon les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ainsi que de ceux de la littérature.



**Figure 11. Modèle proposé des mécanismes du développement de la réponse humorale dirigée contre les CPS de *S. suis* et GBS.**

(1) La reconnaissance de GBS par les APC, incluant les DC, conduit à son internalisation, à la sécrétion de diverses cytokines/chémokines ainsi qu'à l'augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation par les cellules. Contrairement à la CPS de GBS, la CPS de *S. suis* inhibe l'internalisation du pathogène. (2) Cette interaction différente avec les APC est susceptible d'induire une mobilisation et/ou une activation différente des acteurs de la réponse Ac anti-CPS par *S. suis* et GBS. En particulier, il a été suggéré que GBS recruterait l'aide des LT dans la mise en place de la réponse humorale CPS-spécifique. Au contraire, les LT ne participeraient pas de façon capitale à cette réponse concernant *S. suis*. (3) Au sein de GBS et *S. suis*, la CPS joue un rôle majeur dans l'induction, par les DC, de la production de CCL3, via une voie partiellement dépendante de TLR2/MyD88, et de CCL2, via une voie MyD88-indépendante. En revanche, ce constituant bactérien reste une molécule faiblement immunoactivatrice incapable d'induire la sécrétion de cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IL-10) par ces cellules. (4) En plus d'être faiblement immunostimulatrices, les CPS de GBS et *S. suis* interfèrent avec la capacité des DC à exprimer BAFF. Cette cytokine a une importance cruciale au cours des réponses humorales anti-polysaccharidique. (5) Les CPS de *S. suis* et GBS pourraient exercer d'autres effets immunosuppresseurs sur les cellules du système immunitaire inné et/ou adaptatif impliqués dans la mise en place de la réponse humorale CPS-spécifique, mais cela reste à être démontré. (6) Il en résulte la génération d'une réponse Ac anti-CPS globalement faible et de profil isotypique restreint à l'IgM face à *S. suis* et GBS, même si la magnitude de cette réponse est plus forte pour GBS (notamment GBS type III). Une étude a également suggéré que GBS pouvait stimuler la sécrétion d'IgG anti-CPS. (7) L'acide sialique

ne joue aucun rôle immunosuppresseur majeur dans le développement de la réponse Ac dirigée contre les CPS de *S. suis* ou GBS. (8) Le profil dissemblable de la réponse Ac anti-CPS entre GBS (notamment GBS type III) et *S. suis* pourrait aussi s'expliquer par l'existence d'un répertoire (pré-immun) différent de clones de LB CPS-spécifiques.

**Abréviations** : Ac, anticorps; APC, cellule présentatrice d'antigène; BAFF, « B cell-activating factor of the TNF family »; CCL, « chemokine ligand »; CPS, capsule polysaccharidique; DC, cellule dendritique; Ig, immunoglobuline; IL, interleukine; LB, lymphocyte B; LT, lymphocyte T; MyD88, « myeloid differentiation primary response gene 88 »; TLR, « Toll-like receptor »; TNF, « tumor necrosis factor ».

## **V – CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Dans le cadre de cette thèse, nous avons observé les points suivants :

- L'hôte (souris et/ou porc) infecté par *S. suis* développe une réponse Ac anti-CPS sérique présentant toutes les caractéristiques d'une réaction TI. La magnitude est extrêmement faible (*S. suis* type 2) voire inexistante (*S. suis* type 14), le profil isotypique est restreint à l'IgM et aucune altération majeure de la réponse n'est observée chez les souris déficientes en LT CD4<sup>+</sup>.
- TLR2 ne joue pas de rôle primordial dans la mise en place de la réponse humorale anti-CPS au cours de l'infection par *S. suis* type 2.
- Les propriétés immunomodulatrices intrinsèques à la CPS, et non aux composants bactériens non capsulaires, régiraient majoritairement le développement de cette réponse.
- Contrairement à *S. suis*, l'hôte (souris) infecté par GBS (type III ou V) monte une réponse IgM anti-CPS notoire. Toutefois, la magnitude reste faible et aucune CSR n'est observée.
- Les CPS hautement purifiées de GBS et *S. suis* possèdent des caractéristiques immunoactivatrices distinctes. La CPS de GBS type III administrée aux souris conserve des propriétés immunogéniques similaires à celles observées durant l'infection par la bactérie intacte, alors que les souris immunisées avec les CPS purifiées de *S. suis* types 2 et 14 et GBS type V sont incapables de monter une réponse humorale spécifique.
- Les CPS purifiées de *S. suis* et GBS stimulent la production de taux conséquents et similaires de chémokines par les DC murines *in vitro*, via des voies à la fois TLR2/MyD88-dépendantes et MyD88-indépendantes. Néanmoins, ces molécules sont incapables d'induire la sécrétion de cytokines pro- ou anti-inflammatoires par les DC et elles interfèrent avec l'expression de BAFF par ces cellules, ce qui pourrait ainsi expliquer la nature globalement faible de la réponse humorale face à ces Ag.

- L'acide sialique ne joue aucun rôle immunosuppresseur majeur sur le développement de la réponse Ac dirigée contre les CPS purifiées de *S. suis* ou GBS. *In vitro*, l'expression du sucre n'exerce d'influence notable ni sur l'incapacité des CPS à induire la production de cytokines par les DC, ni sur l'inhibition de l'expression de BAFF médiée par les CPS. *In vivo*, l'inaptitude des souris immunisées avec les CPS de *S. suis* types 2 et 14 et GBS type V à développer une réponse humorale spécifique ne peut pas non plus être imputée à la présence du sucre. D'autres propriétés biochimiques intrinsèques aux CPS seraient ainsi responsables de l'incapacité de l'hôte infecté à reconnaître et/ou à monter une réponse Ac adéquate contre ces Ag.



## PERSPECTIVES

Des avenues potentielles à la suite de cette thèse seraient :

- Identifier les populations cellulaires mises en jeu dans le développement de la réponse Ac anti-CPS au cours de l'infection par *S. suis* et GBS, et en particulier les types/sous-types d'APC (DC, monocytes/macrophages) et de LB (LB FO, LB MZ, LB-1). Préciser également l'implication des LT dans le développement de cette réponse face à GBS.
- Poursuivre la recherche sur les récepteurs impliqués dans la réponse Ac anti-CPS face à *S. suis* et GBS, et notamment examiner l'implication des Siglecs et des CLR.
- Evaluer plus en détails la participation du système « BAFF/APRIL » dans le développement de cette réponse et approfondir l'étude de l'effet immunomodulateur de la CPS sur ce système, aussi bien au niveau des cellules de l'immunité innée qu'adaptative.
- Compléter l'évaluation de l'effet immunomodulateur de l'acide sialique sur le développement de cette réponse chez la souris déficiente pour l'expression de Siglecs et/ou grâce à l'utilisation de systèmes biologiques favorisant l'interaction de l'acide sialique avec ces récepteurs en *trans*.
- Orienter la recherche vaccinale contre *S. suis* vers la conception de glycoconjugués afin de contrer les propriétés peu immunogéniques voire immunosuppressives de la CPS de ce pathogène.

## **VI – BIBLIOGRAPHIE**

1. **Gottschalk M.** 2012. Streptococcosis, p. 841-855. *In* K. L. Zimmerman JJ, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (ed.), Diseases of swine, 10th ed. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, IA.
2. **Perch B, Kristjansen P, Skadhaug K.** 1968. Group R *streptococci* pathogenic for man. Two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. *Acta Pathol Microbiol Scand* **74**:69-76.
3. **Goyette-Desjardins G, Auger JP, Xu J, Segura M, Gottschalk M.** 2014. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg Microbes Infect* **3**:e45.
4. **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.
5. **Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, Chengappa MM.** 1997. *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res Commun* **21**:381-407.
6. **Nocard N, Mollereau R.** 1887. Sur une mammite contagieuse des vaches laitières. *Ann Inst Pasteur* **1**:109-126.
7. **Le Doare K, Heath PT.** 2013. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine* **31 Suppl 4**:D7-12.
8. **Chen VL, Avci FY, Kasper DL.** 2013. A maternal vaccine against group B *Streptococcus*: past, present, and future. *Vaccine* **31 Suppl 4**:D13-19.
9. **Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Zansky SM, Gershman K, Stefonek KR, Albanese BA, Zell ER, Schuchat A, Schrag SJ, Active Bacterial Core surveillance/Emerging Infections Program N.** 2008. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA* **299**:2056-2065.
10. **Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, Schrag SJ, Zaidi AK, Cousens S, Heath PT.** 2012. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet* **379**:547-556.
11. **Edwards MS, Baker CJ.** 2005. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* **41**:839-847.
12. **Sendi P, Johansson L, Norrby-Teglund A.** 2008. Invasive group B Streptococcal disease in non-pregnant adults : a review with emphasis on skin and soft-tissue infections. *Infection* **36**:100-111.
13. **Heath PT.** 2011. An update on vaccination against group B *streptococcus*. *Expert Rev Vaccines* **10**:685-694.
14. **Teatero S, McGeer A, Low DE, Li A, Demczuk W, Martin I, Fittipaldi N.** 2014. Characterization of invasive group B *streptococcus* strains from the greater Toronto area, Canada. *J Clin Microbiol* **52**:1441-1447.
15. **Paoletti LC, Pinel J, Johnson KD, Reinap B, Ross RA, Kasper DL.** 1999. Synthesis and preclinical evaluation of glycoconjugate vaccines against group B *Streptococcus* types VI and VIII. *J Infect Dis* **180**:892-895.
16. **Robertson ID, Blackmore DK.** 1989. Prevalence of *Streptococcus suis* types 1 and 2 in domestic pigs in Australia and New Zealand. *Vet Rec* **124**:391-394.
17. **Reams RY, Harrington DD, Glickman LT, Thacker HL, Bowersock TL.** 1996. Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. *J Vet Diagn Invest* **8**:119-121.
18. **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.
19. **Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M.** 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol* **7**:259-279.
20. **Opriessnig T, Gimenez-Lirola LG, Halbur PG.** 2011. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev* **12**:133-148.
21. **Schmitt CS, Halbur PG, Roth JA, Kinyon JM, Kasorndorkbua C, Thacker B.** 2001. Influence of ampicillin, ceftiofur, attenuated live PRRSV vaccine, and reduced dose *Streptococcus suis* exposure on disease associated with PRRSV and *S. suis* coinfection. *Vet Microbiol* **78**:29-37.

22. **Dee SA, Carlson AR, Winkelman NL, Corey MM.** 1993. Effect of management practices on the *Streptococcus suis* carrier rate in nursery swine. *J Am Vet Med Assoc* **203**:295-299.
23. **Melin P, Efstratiou A.** 2013. Group B streptococcal epidemiology and vaccine needs in developed countries. *Vaccine* **31 Suppl 4**:D31-42.
24. **Muller AE, Oostvogel PM, Steegers EA, Dorr PJ.** 2006. Morbidity related to maternal group B streptococcal infections. *Acta Obstet Gynecol Scand* **85**:1027-1037.
25. **Mazmanian SK, Kasper DL.** 2006. The love-hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system. *Nat Rev Immunol* **6**:849-858.
26. **Cress BF, Englaender JA, He W, Kasper D, Linhardt RJ, Koffas MA.** 2014. Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. *FEMS Microbiol Rev* **38**:660-697.
27. **Jones C.** 2005. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. *An Acad Bras Cienc* **77**:293-324.
28. **Hanson BR, Neely MN.** 2012. Coordinate regulation of Gram-positive cell surface components. *Curr Opin Microbiol* **15**:204-210.
29. **Ovodov YS.** 2006. Bacterial capsular antigens. Structural patterns of capsular antigens. *Biochemistry (Mosc)* **71**:937-954.
30. **Avci FY, Kasper DL.** 2010. How bacterial carbohydrates influence the adaptive immune system. *Annu Rev Immunol* **28**:107-130.
31. **Angata T, Varki A.** 2002. Chemical diversity in the sialic acids and related  $\alpha$ -keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* **102**:439-469.
32. **Severi E, Hood DW, Thomas GH.** 2007. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology* **153**:2817-2822.
33. **Varki A, Gagneux P.** 2012. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann N Y Acad Sci* **1253**:16-36.
34. **Kawai T, Akira S.** 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* **21**:317-337.
35. **Geijtenbeek TB, Gringhuis SI.** 2009. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**:465-479.
36. **Crocker PR, Paulson JC, Varki A.** 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* **7**:255-266.
37. **Pillai S, Netravali IA, Cariappa A, Mattoo H.** 2012. Siglecs and immune regulation. *Annu Rev Immunol* **30**:357-392.
38. **Kufer TA, Sansonetti PJ.** 2011. NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat Immunol* **12**:121-128.
39. **Yan H, Ohno N, Tsuji NM.** 2013. The role of C-type lectin receptors in immune homeostasis. *Int Immunopharmacol* **16**:353-357.
40. **Kawai T, Akira S.** 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**:373-384.
41. **Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, Martin M.** 2011. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J Dent Res* **90**:417-427.
42. **Kawai T, Akira S.** 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**:637-650.
43. **Um SH, Rhee DK, Pyo S.** 2002. Involvement of protein kinase C and tyrosin kinase in tumoricidal activation of macrophage induced by *Streptococcus pneumoniae* type II capsular polysaccharide. *Int Immunopharmacol* **2**:129-137.
44. **Monari C, Bistoni F, Casadevall A, Pericolini E, Pietrella D, Kozel TR, Vecchiarelli A.** 2005. Glucuronoxylomannan, a microbial compound, regulates expression of costimulatory molecules and production of cytokines in macrophages. *J Infect Dis* **191**:127-137.
45. **McGreal EP, Martinez-Pomares L, Gordon S.** 2004. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol Immunol* **41**:1109-1121.
46. **Kang YS, Kim JY, Bruening SA, Pack M, Charalambous A, Pritsker A, Moran TM, Loeffler JM, Steinman RM, Park CG.** 2004. The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* in the marginal zone of mouse spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:215-220.
47. **Koppel EA, Saeland E, de Cooker DJ, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB.** 2005. DC-SIGN specifically recognizes *Streptococcus pneumoniae* serotypes 3 and 14. *Immunobiology* **210**:203-210.

48. **Zamze S, Martinez-Pomares L, Jones H, Taylor PR, Stillion RJ, Gordon S, Wong SY.** 2002. Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* **277**:41613-41623.
49. **Crocker PR, McMillan SJ, Richards HE.** 2012. CD33-related siglecs as potential modulators of inflammatory responses. *Ann N Y Acad Sci* **1253**:102-111.
50. **Boyd CR, Orr SJ, Spence S, Burrows JF, Elliott J, Carroll HP, Brennan K, Ni Gabhann J, Coulter WA, Jones C, Crocker PR, Johnston JA, Jefferies CA.** 2009. Siglec-E is up-regulated and phosphorylated following lipopolysaccharide stimulation in order to limit TLR-driven cytokine production. *J Immunol* **183**:7703-7709.
51. **Nitschke L, Carsetti R, Ocker B, Kohler G, Lamers MC.** 1997. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol* **7**:133-143.
52. **Hoffmann A, Kerr S, Jellusova J, Zhang J, Weisel F, Wellmann U, Winkler TH, Kneitz B, Crocker PR, Nitschke L.** 2007. Siglec-G is a B1 cell-inhibitory receptor that controls expansion and calcium signaling of the B1 cell population. *Nat Immunol* **8**:695-704.
53. **Cariappa A, Takematsu H, Liu H, Diaz S, Haider K, Boboila C, Kalloo G, Connole M, Shi HN, Varki N, Varki A, Pillai S.** 2009. B cell antigen receptor signal strength and peripheral B cell development are regulated by a 9-O-acetyl sialic acid esterase. *J Exp Med* **206**:125-138.
54. **Carroll MC, Isenman DE.** 2012. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity* **37**:199-207.
55. **Joiner KA.** 1988. Complement evasion by bacteria and parasites. *Annu Rev Microbiol* **42**:201-230.
56. **Ferreira VP, Pangburn MK, Cortes C.** 2010. Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol* **47**:2187-2197.
57. **Thornton BP, Vetvicka V, Pitman M, Goldman RC, Ross GD.** 1996. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the  $\beta$ -glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol* **156**:1235-1246.
58. **Albanyan EA, Edwards MS.** 2000. Lectin site interaction with capsular polysaccharide mediates nonimmune phagocytosis of type III group B *streptococci*. *Infect Immun* **68**:5794-5802.
59. **Rietdijk ST, Burwell T, Bertin J, Coyle AJ.** 2008. Sensing intracellular pathogens-NOD-like receptors. *Curr Opin Pharmacol* **8**:261-266.
60. **Kumar H, Kumagai Y, Tsuchida T, Koenig PA, Satoh T, Guo Z, Jang MH, Saitoh T, Akira S, Kawai T.** 2009. Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal  $\beta$ -glucan. *J Immunol* **183**:8061-8067.
61. **Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS.** 2010. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect Immun* **78**:704-715.
62. **Moxon ER, Kroll JS.** 1988. Type b capsular polysaccharide as a virulence factor of *Haemophilus influenzae*. *Vaccine* **6**:113-115.
63. **O'Riordan K, Lee JC.** 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* **17**:218-234.
64. **Verbrugh HA, Peterson PK, Nguyen BY, Sisson SP, Kim Y.** 1982. Opsonization of encapsulated *Staphylococcus aureus*: the role of specific antibody and complement. *J Immunol* **129**:1681-1687.
65. **Jarvis GA, Vedros NA.** 1987. Sialic acid of group B *Neisseria meningitidis* regulates alternative complement pathway activation. *Infect Immun* **55**:174-180.
66. **Brown EJ, Joiner KA, Gaither TA, Hammer CH, Frank MM.** 1983. The interaction of C3b bound to pneumococci with factor H ( $\beta$ 1H globulin), factor I (C3b/C4b inactivator), and properdin factor B of the human complement system. *J Immunol* **131**:409-415.
67. **Van Dijk WC, Verbrugh HA, van der Tol ME, Peters R, Verhoef J.** 1979. Role of *Escherichia coli* K capsular antigens during complement activation, C3 fixation, and opsonization. *Infect Immun* **25**:603-609.
68. **Ram S, Lewis LA, Agarwal S.** 2011. Meningococcal group W-135 and Y capsular polysaccharides paradoxically enhance activation of the alternative pathway of complement. *J Biol Chem* **286**:8297-8307.
69. **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.
70. **Rosini R, Campisi E, De Chiara M, Tettelin H, Rinaudo D, Toniolo C, Metruccio M, Guidotti S, Sorensen UB, Kilian M, Consortium D, Ramirez M, Janulczyk R, Donati C, Grandi G, Margarit I.** 2015. Genomic analysis reveals the molecular basis for capsule loss in the group B *streptococcus* population. *PLoS One* **10**:e0125985.
  71. **Smith HE, de Vries R, van't Slot R, Smits MA.** 2000. The *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: genetic determinant for the synthesis of sialic acid. *Microb Pathog* **29**:127-134.
  72. **Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, Saunders D, Rabinowitsch E, Collins M, Donohoe K, Harris D, Murphy L, Quail MA, Samuel G, Skovsted IC, Kalltoft MS, Barrell B, Reeves PR, Parkhill J, Spratt BG.** 2006. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* **2**:e31.
  73. **Okura M, Takamatsu D, Maruyama F, Nozawa T, Nakagawa I, Osaki M, Sekizaki T, Gottschalk M, Kumagai Y, Hamada S.** 2013. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters from all serotypes of *Streptococcus suis*: potential mechanisms for generation of capsular variation. *Appl Environ Microbiol* **79**:2796-2806.
  74. **Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, Rodrigues S, Fahey J, Wessels MR, Rubens CE.** 2005. Structural and genetic diversity of group B *streptococcus* capsular polysaccharides. *Infect Immun* **73**:3096-3103.
  75. **Berti F, Campisi E, Toniolo C, Morelli L, Crotti S, Rosini R, Romano MR, Pinto V, Brogioni B, Torricelli G, Janulczyk R, Grandi G, Margarit I.** 2014. Structure of the type IX group B *Streptococcus* capsular polysaccharide and its evolutionary relationship with types V and VII. *J Biol Chem* **289**:23437-23448.
  76. **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.
  77. **Wessels MR, Pozsgay V, Kasper DL, Jennings HJ.** 1987. Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsular polysaccharide of type III group B *Streptococcus*. A revised structure for the type III group B streptococcal polysaccharide antigen. *J Biol Chem* **262**:8262-8267.
  78. **Wessels MR, DiFabio JL, Benedi VJ, Kasper DL, Michon F, Brisson JR, Jelinkova J, Jennings HJ.** 1991. Structural determination and immunochemical characterization of the type V group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *J Biol Chem* **266**:6714-6719.
  79. **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.
  80. **Maisey HC, Doran KS, Nizet V.** 2008. Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Expert Rev Mol Med* **10**:e27.
  81. **Landwehr-Kenzel S, Henneke P.** 2014. Interaction of *Streptococcus agalactiae* and cellular innate immunity in colonization and disease. *Front Immunol* **5**:519.
  82. **Rubens CE, Wessels MR, Heggen LM, Kasper DL.** 1987. Transposon mutagenesis of type III group B *Streptococcus*: correlation of capsule expression with virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:7208-7212.
  83. **Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S, Gottschalk M.** 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* **144**:325-332.
  84. **Roy D, Auger JP, Segura M, Fittipaldi N, Takamatsu D, Okura M, Gottschalk M.** 2015. Role of the capsular polysaccharide as a virulence factor for *Streptococcus suis* serotype 14. *Can J Vet Res* **79**:141-146.
  85. **Madsen LW, Bak H, Nielsen B, Jensen HE, Aalbaek B, Riising HJ.** 2002. Bacterial colonization and invasion in pigs experimentally exposed to *Streptococcus suis* serotype 2 in aerosol. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **49**:211-215.
  86. **Salles MW, Perez-Casal J, Willson P, Middleton DM.** 2002. Changes in the leucocyte subpopulations of the palatine tonsillar crypt epithelium of pigs in response to *Streptococcus suis* type 2 infection. *Vet Immunol Immunopathol* **87**:51-63.
  87. **Lalonde M, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M.** 2000. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology* **146**:1913-1921.

88. **Wang Y, Gagnon CA, Savard C, Music N, Srednik M, Segura M, Lachance C, Bellehumeur C, Gottschalk M.** 2013. Capsular sialic acid of *Streptococcus suis* serotype 2 binds to swine influenza virus and enhances bacterial interactions with virus-infected tracheal epithelial cells. *Infect Immun* **81**:4498-4508.
89. **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.
90. **Tamura GS, Kuypers JM, Smith S, Raff H, Rubens CE.** 1994. Adherence of group B streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. *Infect Immun* **62**:2450-2458.
91. **Teti G, Tomasello F, Chiofalo MS, Orefici G, Mastroeni P.** 1987. Adherence of group B streptococci to adult and neonatal epithelial cells mediated by lipoteichoic acid. *Infect Immun* **55**:3057-3064.
92. **Goldschmidt JC, Jr., Panos C.** 1984. Teichoic acids of *Streptococcus agalactiae*: chemistry, cytotoxicity, and effect on bacterial adherence to human cells in tissue culture. *Infect Immun* **43**:670-677.
93. **Winram SB, Jonas M, Chi E, Rubens CE.** 1998. Characterization of group B streptococcal invasion of human chorion and amnion epithelial cells *in vitro*. *Infect Immun* **66**:4932-4941.
94. **Rubens CE, Raff HV, Jackson JC, Chi EY, Bielitzki JT, Hillier SL.** 1991. Pathophysiology and histopathology of group B streptococcal sepsis in *Macaca nemestrina* primates induced after intraamniotic inoculation: evidence for bacterial cellular invasion. *J Infect Dis* **164**:320-330.
95. **Gibson RL, Lee MK, Soderland C, Chi EY, Rubens CE.** 1993. Group B streptococci invade endothelial cells: type III capsular polysaccharide attenuates invasion. *Infect Immun* **61**:478-485.
96. **Bodaszewska-Lubas M, Brzychczy-Wloch M, Adamski P, Gosiewski T, Strus M, Heczko PB.** 2013. Adherence of group B streptococci to human rectal and vaginal epithelial cell lines in relation to capsular polysaccharides as well as  $\alpha$ -like protein genes - pilot study. *Pol J Microbiol* **62**:85-90.
97. **Mikamo H, Johri AK, Paoletti LC, Madoff LC, Onderdonk AB.** 2004. Adherence to, invasion by, and cytokine production in response to serotype VIII group B *Streptococci*. *Infect Immun* **72**:4716-4722.
98. **Kallman J, Schollin J, Hakansson S, Andersson A, Kihlstrom E.** 1993. Adherence of group B streptococci to human endothelial cells *in vitro*. *APMIS* **101**:403-408.
99. **Soriani M, Santi I, Taddei A, Rappuoli R, Grandi G, Telford JL.** 2006. Group B *Streptococcus* crosses human epithelial cells by a paracellular route. *J Infect Dis* **193**:241-250.
100. **Hulse ML, Smith S, Chi EY, Pham A, Rubens CE.** 1993. Effect of type III group B streptococcal capsular polysaccharide on invasion of respiratory epithelial cells. *Infect Immun* **61**:4835-4841.
101. **Tazi A, Disson O, Bellais S, Bouaboud A, Dmytruk N, Dramsi S, Mistou MY, Khun H, Mechler C, Tardieux I, Trieu-Cuot P, Lecuit M, Poyart C.** 2010. The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *J Exp Med* **207**:2313-2322.
102. **Sellin M, Hakansson S, Norgren M.** 1995. Phase-shift of polysaccharide capsule expression in group B streptococci, type III. *Microb Pathog* **18**:401-415.
103. **Beineke A, Bennecke K, Neis C, Schroder C, Waldmann KH, Baumgartner W, Valentin-Weigand P, Baums CG.** 2008. Comparative evaluation of virulence and pathology of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9 in experimentally infected growers. *Vet Microbiol* **128**:423-430.
104. **Vollman JH, Smith WL, Ballard ET, Light IJ.** 1976. Early onset group B streptococcal disease: clinical, roentgenographic, and pathologic features. *J Pediatr* **89**:199-203.
105. **Schuit KE, DeBiasio R.** 1980. Kinetics of phagocyte response to group B streptococcal infections in newborn rats. *Infect Immun* **28**:319-324.
106. **Martin TR, Ruzinski JT, Rubens CE, Chi EY, Wilson CB.** 1992. The effect of type-specific polysaccharide capsule on the clearance of group B streptococci from the lungs of infant and adult rats. *J Infect Dis* **165**:306-314.

107. **Zeligs BJ, Armstrong CD, Walser JB, Bellanti JA.** 1982. Age-dependent susceptibility of neonatal rats to group B streptococcal type III infection: correlation of severity of infection and response of myeloid pools. *Infect Immun* **37**:255-263.
108. **Silva MT, Correia-Neves M.** 2012. Neutrophils and macrophages: the main partners of phagocyte cell systems. *Front Immunol* **3**:174.
109. **Smith JA.** 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* **56**:672-686.
110. **Segura MA, Cleroux P, Gottschalk M.** 1998. *Streptococcus suis* and group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**:189-195.
111. **Benga L, Fulde M, Neis C, Goethe R, Valentin-Weigand P.** 2008. Polysaccharide capsule and sullysin contribute to extracellular survival of *Streptococcus suis* co-cultivated with primary porcine phagocytes. *Vet Microbiol* **132**:211-219.
112. **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.
113. **Houde M, Gottschalk M, Gagnon F, Van Calsteren MR, Segura M.** 2012. *Streptococcus suis* capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition. *Infect Immun* **80**:506-517.
114. **Segura M, Gottschalk M, Olivier M.** 2004. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infect Immun* **72**:5322-5330.
115. **Segura M, Gottschalk M.** 2002. *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity. *Infect Immun* **70**:4312-4322.
116. **Gottschalk M, Segura M.** 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* **76**:259-272.
117. **Edwards MS, Nicholson-Weller A, Baker CJ, Kasper DL.** 1980. The role of specific antibody in alternative complement pathway-mediated opsonophagocytosis of type III, group B *Streptococcus*. *J Exp Med* **151**:1275-1287.
118. **Paoletti LC, Ross RA, Johnson KD.** 1996. Cell growth rate regulates expression of group B *Streptococcus* type III capsular polysaccharide. *Infect Immun* **64**:1220-1226.
119. **Rubens CE, Heggen LM, Haft RF, Wessels MR.** 1993. Identification of cpsD, a gene essential for type III capsule expression in group B *streptococci*. *Mol Microbiol* **8**:843-855.
120. **Edwards MS, Wessels MR, Baker CJ.** 1993. Capsular polysaccharide regulates neutrophil complement receptor interactions with type III group B *streptococci*. *Infect Immun* **61**:2866-2871.
121. **Edwards MS, Kasper DL, Jennings HJ, Baker CJ, Nicholson-Weller A.** 1982. Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B *streptococci*. *J Immunol* **128**:1278-1283.
122. **Marques MB, Kasper DL, Pangburn MK, Wessels MR.** 1992. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B *streptococci*. *Infect Immun* **60**:3986-3993.
123. **Takahashi S, Aoyagi Y, Adderson EE, Okuwaki Y, Bohnsack JF.** 1999. Capsular sialic acid limits C5a production on type III group B *streptococci*. *Infect Immun* **67**:1866-1870.
124. **Antal JM, Cunningham JV, Goodrum KJ.** 1992. Opsonin-independent phagocytosis of group B *streptococci*: role of complement receptor type three. *Infect Immun* **60**:1114-1121.
125. **Valentin-Weigand P, Benkel P, Rohde M, Chhatwal GS.** 1996. Entry and intracellular survival of group B *streptococci* in J774 macrophages. *Infect Immun* **64**:2467-2473.
126. **Cornacchione P, Scaringi L, Fettucciari K, Rosati E, Sabatini R, Orefici G, von Hunolstein C, Modesti A, Modica A, Minelli F, Marconi P.** 1998. Group B *streptococci* persist inside macrophages. *Immunology* **93**:86-95.
127. **Poyart C, Pellegrini E, Gaillot O, Boumaila C, Baptista M, Trieu-Cuot P.** 2001. Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* **69**:5098-5106.
128. **Wilson CB, Weaver WM.** 1985. Comparative susceptibility of group B *streptococci* and *Staphylococcus aureus* to killing by oxygen metabolites. *J Infect Dis* **152**:323-329.



129. **Liu GY, Doran KS, Lawrence T, Turkson N, Puliti M, Tissi L, Nizet V.** 2004. Sword and shield: linked group B streptococcal  $\beta$ -hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:14491-14496.
130. **Charrel-Dennis M, Latz E, Halmen KA, Trieu-Cuot P, Fitzgerald KA, Kasper DL, Golenbock DT.** 2008. TLR-independent type I interferon induction in response to an extracellular bacterial pathogen via intracellular recognition of its DNA. *Cell Host Microbe* **4**:543-554.
131. **Wennekamp J, Henneke P.** 2008. Induction and termination of inflammatory signaling in group B streptococcal sepsis. *Immunol Rev* **225**:114-127.
132. **Ye C, Zheng H, Zhang J, Jing H, Wang L, Xiong Y, Wang W, Zhou Z, Sun Q, Luo X, Du H, Gottschalk M, Xu J.** 2009. Clinical, experimental, and genomic differences between intermediately pathogenic, highly pathogenic, and epidemic *Streptococcus suis*. *J Infect Dis* **199**:97-107.
133. **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.
134. **Dominguez-Punaro Mde L, Segura M, Radzioch D, Rivest S, Gottschalk M.** 2008. Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection. *Infect Immun* **76**:3901-3910.
135. **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.
136. **Berner R, Niemeyer CM, Leititis JU, Funke A, Schwab C, Rau U, Richter K, Tawfeek MS, Clad A, Brandis M.** 1998. Plasma levels and gene expression of granulocyte colony-stimulating factor, tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in neonatal early onset sepsis. *Pediatr Res* **44**:469-477.
137. **Williams PA, Bohnsack JF, Augustine NH, Drummond WK, Rubens CE, Hill HR.** 1993. Production of tumor necrosis factor by human cells *in vitro* and *in vivo*, induced by group B streptococci. *J Pediatr* **123**:292-300.
138. **de Bont ES, Martens A, van Raan J, Samson G, Fetter WP, Okken A, de Leij LH.** 1993. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-6 plasma levels in neonatal sepsis. *Pediatr Res* **33**:380-383.
139. **Teti G, Mancuso G, Tomasello F.** 1993. Cytokine appearance and effects of anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  antibodies in a neonatal rat model of group B streptococcal infection. *Infect Immun* **61**:227-235.
140. **Cusumano V, Genovese F, Mancuso G, Carbone M, Fera MT, Teti G.** 1996. Interleukin-10 protects neonatal mice from lethal group B streptococcal infection. *Infect Immun* **64**:2850-2852.
141. **Andrade EB, Alves J, Madureira P, Oliveira L, Ribeiro A, Cordeiro-da-Silva A, Correia-Neves M, Trieu-Cuot P, Ferreira P.** 2013. TLR2-induced IL-10 production impairs neutrophil recruitment to infected tissues during neonatal bacterial sepsis. *J Immunol* **191**:4759-4768.
142. **Kenzel S, Mancuso G, Malley R, Teti G, Golenbock DT, Henneke P.** 2006. c-Jun kinase is a critical signaling molecule in a neonatal model of group B streptococcal sepsis. *J Immunol* **176**:3181-3188.
143. **Segura M, Stankova J, Gottschalk M.** 1999. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infect Immun* **67**:4646-4654.
144. **Segura M, Vadeboncoeur N, Gottschalk M.** 2002. CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. *Clin Exp Immunol* **127**:243-254.
145. **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.

146. **de Greeff A, Benga L, Wichgers Schreur PJ, Valentin-Weigand P, Rebel JM, Smith HE.** 2010. Involvement of NF- $\kappa$ B and MAP-kinases in the transcriptional response of alveolar macrophages to *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* **141**:59-67.
147. **Peat EB, Augustine NH, Drummond WK, Bohnsack JF, Hill HR.** 1995. Effects of fibronectin and group B *streptococci* on tumour necrosis factor- $\alpha$  production by human culture-derived macrophages. *Immunology* **84**:440-445.
148. **Berner R, Welter P, Brandis M.** 2002. Cytokine expression of cord and adult blood mononuclear cells in response to *Streptococcus agalactiae*. *Pediatr Res* **51**:304-309.
149. **Wichgers Schreur PJ, Rebel JM, Smits MA, van Putten JP, Smith HE.** 2011. Lgt processing is an essential step in *Streptococcus suis* lipoprotein mediated innate immune activation. *PLoS One* **6**:e22299.
150. **Mancuso G, Tomasello F, von Hunolstein C, Orefici G, Teti G.** 1994. Induction of tumor necrosis factor  $\alpha$  by the group- and type-specific polysaccharides from type III group B *streptococci*. *Infect Immun* **62**:2748-2753.
151. **Vallejo JG, Baker CJ, Edwards MS.** 1996. Roles of the bacterial cell wall and capsule in induction of tumor necrosis factor  $\alpha$  by type III group B *streptococci*. *Infect Immun* **64**:5042-5046.
152. **Vallejo JG, Baker CJ, Edwards MS.** 1996. Interleukin-6 production by human neonatal monocytes stimulated by type III group B *streptococci*. *J Infect Dis* **174**:332-337.
153. **von Hunolstein C, Totolian A, Alfarone G, Mancuso G, Cusumano V, Teti G, Orefici G.** 1997. Soluble antigens from group B *streptococci* induce cytokine production in human blood cultures. *Infect Immun* **65**:4017-4021.
154. **Lun S, Perez-Casal J, Connor W, Willson PJ.** 2003. Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microb Pathog* **34**:27-37.
155. **Bonifait L, Grenier D.** 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.
156. **Huang K, Yuan Z, Li J, Zhang Q, Xu Z, Yan S, Zhang A, Jin M.** 2015. Identification and characterisation a surface-associated arginine peptidase in *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbiol Res* **170**:168-176.
157. **Henneke P, Dramsi S, Mancuso G, Chraïbi K, Pellegrini E, Theilacker C, Hubner J, Santos-Sierra S, Teti G, Golenbock DT, Poyart C, Trieu-Cuot P.** 2008. Lipoproteins are critical TLR2 activating toxins in group B streptococcal sepsis. *J Immunol* **180**:6149-6158.
158. **Deshmukh SD, Kremer B, Freudenberg M, Bauer S, Golenbock DT, Henneke P.** 2011. Macrophages recognize *streptococci* through bacterial single-stranded RNA. *EMBO Rep* **12**:71-76.
159. **Deshmukh SD, Muller S, Hese K, Rauch KS, Wennekamp J, Takeuchi O, Akira S, Golenbock DT, Henneke P.** 2012. NO is a macrophage autonomous modifier of the cytokine response to streptococcal single-stranded RNA. *J Immunol* **188**:774-780.
160. **Gupta R, Ghosh S, Monks B, DeOliveira RB, Tzeng TC, Kalantari P, Nandy A, Bhattacharjee B, Chan J, Ferreira F, Rathinam V, Sharma S, Lien E, Silverman N, Fitzgerald K, Firon A, Trieu-Cuot P, Henneke P, Golenbock DT.** 2014. RNA and beta-hemolysin of group B *Streptococcus* induce interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) by activating NLRP3 inflammasomes in mouse macrophages. *J Biol Chem* **289**:13701-13705.
161. **Ring A, Depnering C, Pohl J, Nizet V, Shenep JL, Stremmel W.** 2002. Synergistic action of nitric oxide release from murine macrophages caused by group B streptococcal cell wall and  $\beta$ -hemolysin/cytolysin. *J Infect Dis* **186**:1518-1521.
162. **Tanabe S, Gottschalk M, Grenier D.** 2008. Hemoglobin and *Streptococcus suis* cell wall act in synergy to potentiate the inflammatory response of monocyte-derived macrophages. *Innate Immun* **14**:357-363.
163. **Mancuso G, Midiri A, Beninati C, Piraino G, Valenti A, Nicocia G, Teti D, Cook J, Teti G.** 2002. Mitogen-activated protein kinases and NF- $\kappa$ B are involved in TNF- $\alpha$  responses to group B *streptococci*. *J Immunol* **169**:1401-1409.
164. **Charland N, Nizet V, Rubens CE, Kim KS, Lacouture S, Gottschalk M.** 2000. *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **68**:637-643.
165. **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.

166. **Vanier G, Segura M, Gottschalk M.** 2007. Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Can J Vet Res* **71**:81-89.
167. **Benga L, Friedl P, Valentin-Weigand P.** 2005. Adherence of *Streptococcus suis* to porcine endothelial cells. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **52**:392-395.
168. **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.
169. **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.
170. **Jobin MC, Gottschalk M, Grenier D.** 2006. Upregulation of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase 9 production by human macrophage-like cells: synergistic effect of capsular material and cell wall from *Streptococcus suis*. *Microb Pathog* **40**:29-34.
171. **Nizet V, Kim KS, Stins M, Jonas M, Chi EY, Nguyen D, Rubens CE.** 1997. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci. *Infect Immun* **65**:5074-5081.
172. **Tenenbaum T, Papandreou T, Gellrich D, Friedrichs U, Seibt A, Adam R, Wewer C, Galla HJ, Schwerk C, Schrotten H.** 2009. Polar bacterial invasion and translocation of *Streptococcus suis* across the blood-cerebrospinal fluid barrier *in vitro*. *Cell Microbiol* **11**:323-336.
173. **Tenenbaum T, Adam R, Eggelpohler I, Matalon D, Seibt A, GE KN, Galla HJ, Schrotten H.** 2005. Strain-dependent disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier by *Streptococcus suis* *in vitro*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **44**:25-34.
174. **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.
175. **Doran KS, Liu GY, Nizet V.** 2003. Group B streptococcal  $\beta$ -hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. *J Clin Invest* **112**:736-744.
176. **Zheng H, Punaro MC, Segura M, Lachance C, Rivest S, Xu J, Houde M, Gottschalk M.** 2011. Toll-like receptor 2 is partially involved in the activation of murine astrocytes by *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent of meningitis. *J Neuroimmunol* **234**:71-83.
177. **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.
178. **Dominguez-Punaro Mde 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.
179. **Al-Numani D, Segura M, Dore M, Gottschalk M.** 2003. Up-regulation of ICAM-1, CD11a/CD18 and CD11c/CD18 on human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *Clin Exp Immunol* **133**:67-77.
180. **Grenier D, Bodet C.** 2008. *Streptococcus suis* stimulates ICAM-1 shedding from microvascular endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **54**:271-276.
181. **Lachance C, Segura M, Gerber PP, Xu J, Gottschalk M.** 2013. Toll-like receptor 2-independent host innate immune response against an epidemic strain of *Streptococcus suis* that causes a toxic shock-like syndrome in humans. *PLoS One* **8**:e65031.
182. **Zheng H, Luo X, Segura M, Sun H, Ye C, Gottschalk M, Xu J.** 2012. The role of toll-like receptors in the pathogenesis of *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* **156**:147-156.
183. **Wichgers Schreur PJ, Rebel JM, Smits MA, van Putten JP, Smith HE.** 2010. Differential activation of the Toll-like receptor 2/6 complex by lipoproteins of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9. *Vet Microbiol* **143**:363-370.
184. **Charland N, Kellens JT, Caya F, Gottschalk M.** 1995. Agglutination of *Streptococcus suis* by sialic acid-binding lectins. *J Clin Microbiol* **33**:2220-2221.

185. **Mancuso G, Midiri A, Beninati C, Biondo C, Galbo R, Akira S, Henneke P, Golenbock D, Teti G.** 2004. Dual role of TLR2 and myeloid differentiation factor 88 in a mouse model of invasive group B streptococcal disease. *J Immunol* **172**:6324-6329.
186. **Puliti M, Uematsu S, Akira S, Bistoni F, Tissi L.** 2009. Toll-like receptor 2 deficiency is associated with enhanced severity of group B streptococcal disease. *Infect Immun* **77**:1524-1531.
187. **Henneke P, Takeuchi O, Malley R, Lien E, Ingalls RR, Freeman MW, Mayadas T, Nizet V, Akira S, Kasper DL, Golenbock DT.** 2002. Cellular activation, phagocytosis, and bactericidal activity against group B *streptococcus* involve parallel myeloid differentiation factor 88-dependent and independent signaling pathways. *J Immunol* **169**:3970-3977.
188. **Henneke P, Takeuchi O, van Strijp JA, Guttormsen HK, Smith JA, Schromm AB, Espevik TA, Akira S, Nizet V, Kasper DL, Golenbock DT.** 2001. Novel engagement of CD14 and multiple toll-like receptors by group B *streptococci*. *J Immunol* **167**:7069-7076.
189. **Draper DW, Bethea HN, He YW.** 2006. Toll-like receptor 2-dependent and -independent activation of macrophages by group B *streptococci*. *Immunol Lett* **102**:202-214.
190. **Ip WK, Sokolovska A, Charriere GM, Boyer L, Dejardin S, Cappillino MP, Yantosca LM, Takahashi K, Moore KJ, Lacy-Hulbert A, Stuart LM.** 2010. Phagocytosis and phagosome acidification are required for pathogen processing and MyD88-dependent responses to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* **184**:7071-7081.
191. **Henneke P, Morath S, Uematsu S, Weichert S, Pfitzenmaier M, Takeuchi O, Muller A, Poyart C, Akira S, Berner R, Teti G, Geyer A, Hartung T, Trieu-Cuot P, Kasper DL, Golenbock DT.** 2005. Role of lipoteichoic acid in the phagocyte response to group B *streptococcus*. *J Immunol* **174**:6449-6455.
192. **Cuzzola M, Mancuso G, Beninati C, Biondo C, von Hunolstein C, Orefici G, Espevik T, Flo TH, Teti G.** 2000. Human monocyte receptors involved in tumor necrosis factor responses to group B streptococcal products. *Infect Immun* **68**:994-998.
193. **Goodrum KJ, McCormick LL, Schneider B.** 1994. Group B *streptococcus*-induced nitric oxide production in murine macrophages is CR3 (CD11b/CD18) dependent. *Infect Immun* **62**:3102-3107.
194. **Carlin AF, Lewis AL, Varki A, Nizet V.** 2007. Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. *J Bacteriol* **189**:1231-1237.
195. **Carlin AF, Uchiyama S, Chang YC, Lewis AL, Nizet V, Varki A.** 2009. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood* **113**:3333-3336.
196. **Carlin AF, Chang YC, Areschoug T, Lindahl G, Hurtado-Ziola N, King CC, Varki A, Nizet V.** 2009. Group B *Streptococcus* suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5. *J Exp Med* **206**:1691-1699.
197. **Amass SF, Wu CC, Clark LK.** 1996. Evaluation of antibiotics for the elimination of the tonsillar carrier state of *Streptococcus suis* in pigs. *J Vet Diagn Invest* **8**:64-67.
198. **Zhang A, Chen B, Li R, Mu X, Han L, Zhou H, Chen H, Meilin J.** 2009. Identification of a surface protective antigen, HP0197 of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vaccine* **27**:5209-5213.
199. **Baums CG, Kock C, Beineke A, Bennecke K, Goethe R, Schroder C, Waldmann KH, Valentin-Weigand P.** 2009. *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9. *Clin Vaccine Immunol* **16**:200-208.
200. **Charland N, Jacques M, Lacouture S, Gottschalk M.** 1997. Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 1/2. *Microbiology* **143**:3607-3614.
201. **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.
202. **Holt ME, Enright MR, Alexander TJ.** 1988. Immunisation of pigs with live cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Res Vet Sci* **45**:349-352.

203. **Holt ME, Enright MR, Alexander TJ.** 1989. Studies of the protective effect of different fractions of sera from pigs immune to *Streptococcus suis* type 2 infection. *J Comp Pathol* **100**:435-442.
204. **Holt ME, Enright MR, Alexander TJ.** 1990. Protective effect of sera raised against different fractions of *Streptococcus suis* type 2. *J Comp Pathol* **103**:85-94.
205. **Blouin C, Higgins R, Gottschalk M, Simard J.** 1994. Evaluation of the antibody response in pigs vaccinated against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Can J Vet Res* **58**:49-54.
206. **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.
207. **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.
208. **Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Hilgers LA, Smith HE.** 2002. Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol* **84**:155-168.
209. **Stills HF, Jr.** 2005. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J* **46**:280-293.
210. **Buttner N, Beineke A, de Buhr N, Lilienthal S, Merkel J, Waldmann KH, Valentin-Weigand P, Baums CG.** 2012. *Streptococcus suis* serotype 9 bacterin immunogenicity and protective efficacy. *Vet Immunol Immunopathol* **146**:191-200.
211. **Dekker CN, Bouma A, Daemen AJ, van Leengoed LA, Jonker FH, Wagenaar JA, Stegeman JA.** 2012. Homologous whole bacterin vaccination is not able to reduce *Streptococcus suis* serotype 9 strain 7997 transmission among pigs or colonization. *Vaccine* **30**:1379-1387.
212. **Baums CG, Bruggemann C, Kock C, Beineke A, Waldmann KH, Valentin-Weigand P.** 2010. Immunogenicity of an autogenous *Streptococcus suis* bacterin in preparturient sows and their piglets in relation to protection after weaning. *Clin Vaccine Immunol* **17**:1589-1597.
213. **Amass SF, Stevenson GW, Vyverberg BD, Huxford TW, Knox KE, Grote LA.** 2000. Administration of a homologous bacterin to sows preparturient provided partial protection against streptococcosis in their weaned pigs. *Swine Health Prod* **8**:217-219.
214. **Busque P, Higgins R, Caya F, Quessy S.** 1997. Immunization of pigs against *Streptococcus suis* serotype 2 infection using a live avirulent strain. *Can J Vet Res* **61**:275-279.
215. **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.
216. **Yao X, Li M, Wang J, Wang C, Hu D, Zheng F, Pan X, Tan Y, Zhao Y, Hu L, Tang J, Hu F.** 2015. Isolation and characterization of a native avirulent strain of *Streptococcus suis* serotype 2: a perspective for vaccine development. *Sci Rep* **5**:9835.
217. **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.
218. **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.
219. **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.
220. **Geng H, Zhu L, Yuan Y, Zhang W, Li W, Wang J, Zheng Y, Wei K, Cao W, Wang H, Jiang Y.** 2008. Identification and characterization of novel immunogenic proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. *J Proteome Res* **7**:4132-4142.
221. **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.

222. **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.
223. **Gomez-Gascon L, Luque I, Olaya-Abril A, Jimenez-Munguia I, Orbegozo-Medina RA, Peralbo E, Tarradas C, Rodriguez-Ortega MJ.** 2012. Exploring the pan-surfome of *Streptococcus suis*: looking for common protein antigens. *J Proteomics* **75**:5654-5666.
224. **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.
225. **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.
226. **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.
227. **Chen B, Zhang A, Li R, Mu X, He H, Chen H, Jin M.** 2010. Evaluation of the protective efficacy of a newly identified immunogenic protein, HP0272, of *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett* **307**:12-18.
228. **Li J, Xia J, Tan C, Zhou Y, Wang Y, Zheng C, Chen H, Bei W.** 2011. Evaluation of the immunogenicity and the protective efficacy of a novel identified immunogenic protein, SsPepO, of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vaccine* **29**:6514-6519.
229. **Hsueh KJ, Lee JW, Hou SM, Chen HS, Chang TC, Chu CY.** 2014. Evaluation on a *Streptococcus suis* vaccine using recombinant sao-I protein manufactured by bioreactors as the antigen in pigs. *Transbound Emerg Dis* **61**:e35-43.
230. **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.
231. **Koenig JM, Keenan WJ.** 2009. Group B *streptococcus* and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatr Clin North Am* **56**:689-708.
232. **Heath PT, Feldman RG.** 2005. Vaccination against group B *streptococcus*. *Expert Rev Vaccines* **4**:207-218.
233. **Brodeur BR, Boyer M, Charlebois I, Hamel J, Couture F, Rioux CR, Martin D.** 2000. Identification of group B streptococcal Sip protein, which elicits cross-protective immunity. *Infect Immun* **68**:5610-5618.
234. **Seepersaud R, Hanniffy SB, Mayne P, Sizer P, Le Page R, Wells JM.** 2005. Characterization of a novel leucine-rich repeat protein antigen from group B *streptococci* that elicits protective immunity. *Infect Immun* **73**:1671-1683.
235. **Cheng Q, Debol S, Lam H, Eby R, Edwards L, Matsuka Y, Olmsted SB, Cleary PP.** 2002. Immunization with C5a peptidase or peptidase-type III polysaccharide conjugate vaccines enhances clearance of group B *Streptococci* from lungs of infected mice. *Infect Immun* **70**:6409-6415.
236. **Larsson C, Stalhammar-Carlemalm M, Lindahl G.** 1999. Protection against experimental infection with group B *streptococcus* by immunization with a bivalent protein vaccine. *Vaccine* **17**:454-458.
237. **Gravekamp C, Kasper DL, Paoletti LC, Madoff LC.** 1999.  $\alpha$  C protein as a carrier for type III capsular polysaccharide and as a protective protein in group B streptococcal vaccines. *Infect Immun* **67**:2491-2496.
238. **Madoff LC, Paoletti LC, Tai JY, Kasper DL.** 1994. Maternal immunization of mice with group B streptococcal type III polysaccharide- $\beta$  C protein conjugate elicits protective antibody to multiple serotypes. *J Clin Invest* **94**:286-292.
239. **Maione D, Margarit I, Rinaudo CD, Masignani V, Mora M, Scarselli M, Tettelin H, Brettoni C, Iacobini ET, Rosini R, D'Agostino N, Miorin L, Buccato S, Mariani M, Galli G, Nogarotto R, Nardi-Dei V, Vegni F, Fraser C, Mancuso G, Teti G, Madoff LC, Paoletti LC, Rappuoli R, Kasper DL, Telford JL, Grandi G.** 2005. Identification of a universal Group B *streptococcus* vaccine by multiple genome screen. *Science* **309**:148-150.
240. **Baker CJ, Kasper DL.** 1976. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *N Engl J Med* **294**:753-756.

241. **Lin FY, Philips JB, 3rd, Azimi PH, Weisman LE, Clark P, Rhoads GG, Regan J, Concepcion NF, Frasch CE, Troendle J, Brenner RA, Gray BM, Bhushan R, Fitzgerald G, Moyer P, Clemens JD.** 2001. Level of maternal antibody required to protect neonates against early-onset disease caused by group B *Streptococcus* type Ia: a multicenter, seroepidemiology study. *J Infect Dis* **184**:1022-1028.
242. **Lin FY, Weisman LE, Azimi PH, Philips JB, 3rd, Clark P, Regan J, Rhoads GG, Frasch CE, Gray BM, Troendle J, Brenner RA, Moyer P, Clemens JD.** 2004. Level of maternal IgG anti-group B *streptococcus* type III antibody correlated with protection of neonates against early-onset disease caused by this pathogen. *J Infect Dis* **190**:928-934.
243. **Baker CJ, Edwards MS.** 2003. Group B streptococcal conjugate vaccines. *Arch Dis Child* **88**:375-378.
244. **Baker CJ, Rench MA, McInnes P.** 2003. Immunization of pregnant women with group B streptococcal type III capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *Vaccine* **21**:3468-3472.
245. **Baker CJ, Rench MA, Fernandez M, Paoletti LC, Kasper DL, Edwards MS.** 2003. Safety and immunogenicity of a bivalent group B streptococcal conjugate vaccine for serotypes II and III. *J Infect Dis* **188**:66-73.
246. **Madhi SA, Dangor Z, Heath PT, Schrag S, Izu A, Sobanjo-Ter Meulen A, Dull PM.** 2013. Considerations for a phase-III trial to evaluate a group B *Streptococcus* polysaccharide-protein conjugate vaccine in pregnant women for the prevention of early- and late-onset invasive disease in young-infants. *Vaccine* **31 Suppl 4**:D52-57.
247. **Guttormsen HK, Paoletti LC, Mansfield KG, Jachymek W, Jennings HJ, Kasper DL.** 2008. Rational chemical design of the carbohydrate in a glycoconjugate vaccine enhances IgM-to-IgG switching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:5903-5908.
248. **Palazzi DL, Rench MA, Edwards MS, Baker CJ.** 2004. Use of type V group B streptococcal conjugate vaccine in adults 65-85 years old. *J Infect Dis* **190**:558-564.
249. **Elliott SD, Clifton-Hadley F, Tai J.** 1980. Streptococcal infection in young pigs. V. An immunogenic polysaccharide from *Streptococcus suis* type 2 with particular reference to vaccination against streptococcal meningitis in pigs. *J Hyg (Lond)* **85**:275-285.
250. **del Campo Sepulveda EM, Altman E, Kobisch M, D'Allaire S, Gottschalk M.** 1996. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. *Vet Microbiol* **52**:113-125.
251. **Mond JJ, Lees A, Snapper CM.** 1995. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* **13**:655-692.
252. **Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ.** 2000. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev* **176**:154-170.
253. **Snapper CM, Mond JJ.** 1996. A model for induction of T cell-independent humoral immunity in response to polysaccharide antigens. *J Immunol* **157**:2229-2233.
254. **Fruman DA, Satterthwaite AB, Witte ON.** 2000. Xid-like phenotypes: a B cell signalosome takes shape. *Immunity* **13**:1-3.
255. **Snapper CM.** 2006. Differential regulation of protein- and polysaccharide-specific Ig isotype production *in vivo* in response to intact *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Protein Pept Sci* **7**:295-305.
256. **Snapper CM.** 2012. Mechanisms underlying *in vivo* polysaccharide-specific immunoglobulin responses to intact extracellular bacteria. *Ann N Y Acad Sci* **1253**:92-101.
257. **Allman D, Pillai S.** 2008. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol* **20**:149-157.
258. **Fairfax KA, Kallies A, Nutt SL, Tarlinton DM.** 2008. Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches. *Semin Immunol* **20**:49-58.
259. **Genestier L, Taillardet M, Mondiere P, Gheit H, Bella C, Defrance T.** 2007. TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J Immunol* **178**:7779-7786.
260. **Bekeredjian-Ding I, Jego G.** 2009. Toll-like receptors-sentries in the B-cell response. *Immunology* **128**:311-323.
261. **Erickson LD, Tygrett LT, Bhatia SK, Grabstein KH, Waldschmidt TJ.** 1996. Differential expression of CD22 (Lyb8) on murine B cells. *Int Immunol* **8**:1121-1129.

262. **Zhang JQ, Biedermann B, Nitschke L, Crocker PR.** 2004. The murine inhibitory receptor mSiglec-E is expressed broadly on cells of the innate immune system whereas mSiglec-F is restricted to eosinophils. *Eur J Immunol* **34**:1175-1184.
263. **Oracki SA, Walker JA, Hibbs ML, Corcoran LM, Tarlinton DM.** 2010. Plasma cell development and survival. *Immunol Rev* **237**:140-159.
264. **Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K.** 2006. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol* **7**:293-301.
265. **Wardemann H, Boehm T, Dear N, Carsetti R.** 2002. B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. *J Exp Med* **195**:771-780.
266. **Casola S.** 2007. Control of peripheral B-cell development. *Curr Opin Immunol* **19**:143-149.
267. **Rickert RC, Jellusova J, Miletic AV.** 2011. Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease. *Immunol Rev* **244**:115-133.
268. **Song H, Cerny J.** 2003. Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J Exp Med* **198**:1923-1935.
269. **MacLennan IC, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DM, Zuniga E, Cook MC, Vinuesa CG.** 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* **194**:8-18.
270. **Paus D, Phan TG, Chan TD, Gardam S, Basten A, Brink R.** 2006. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med* **203**:1081-1091.
271. **Pone EJ, Xu Z, White CA, Zan H, Casali P.** 2012. B cell TLRs and induction of immunoglobulin class-switch DNA recombination. *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**:2594-2615.
272. **Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE.** 2008. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* **26**:261-292.
273. **Tarlinton D, Radbruch A, Hiepe F, Dorner T.** 2008. Plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol* **20**:162-169.
274. **Yoshida T, Mei H, Dorner T, Hiepe F, Radbruch A, Fillatreau S, Hoyer BF.** 2010. Memory B and memory plasma cells. *Immunol Rev* **237**:117-139.
275. **Kurosaki T, Aiba Y, Kometani K, Moriyama S, Takahashi Y.** 2010. Unique properties of memory B cells of different isotypes. *Immunol Rev* **237**:104-116.
276. **Guinamard R, Okigaki M, Schlessinger J, Ravetch JV.** 2000. Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat Immunol* **1**:31-36.
277. **Colino J, Chattopadhyay G, Sen G, Chen Q, Lees A, Canaday DH, Rubtsov A, Torres R, Snapper CM.** 2009. Parameters underlying distinct T cell-dependent polysaccharide-specific IgG responses to an intact gram-positive bacterium *versus* a soluble conjugate vaccine. *J Immunol* **183**:1551-1559.
278. **Alugupalli KR, Gerstein RM, Chen J, Szomolanyi-Tsuda E, Woodland RT, Leong JM.** 2003. The resolution of relapsing fever borreliosis requires IgM and is concurrent with expansion of B1b lymphocytes. *J Immunol* **170**:3819-3827.
279. **Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF.** 2005. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* **23**:7-18.
280. **Martin F, Oliver AM, Kearney JF.** 2001. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* **14**:617-629.
281. **Foote JB, Kearney JF.** 2009. Generation of B cell memory to the bacterial polysaccharide  $\alpha$ -1,3 dextran. *J Immunol* **183**:6359-6368.
282. **Garcia de Vinuesa C, O'Leary P, Sze DM, Toellner KM, MacLennan IC.** 1999. T-independent type 2 antigens induce B cell proliferation in multiple splenic sites, but exponential growth is confined to extrafollicular foci. *Eur J Immunol* **29**:1314-1323.
283. **Hsu MC, Toellner KM, Vinuesa CG, MacLennan IC.** 2006. B cell clones that sustain long-term plasmablast growth in T-independent extrafollicular antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:5905-5910.
284. **de Vinuesa CG, Cook MC, Ball J, Drew M, Sunners Y, Cascalho M, Wabl M, Klaus GG, MacLennan IC.** 2000. Germinal centers without T cells. *J Exp Med* **191**:485-494.



285. **Shih TA, Roederer M, Nussenzweig MC.** 2002. Role of antigen receptor affinity in T cell-independent antibody responses *in vivo*. *Nat Immunol* **3**:399-406.
286. **Defrance T, Taillardet M, Genestier L.** 2011. T cell-independent B cell memory. *Curr Opin Immunol* **23**:330-336.
287. **Alugupalli KR, Leong JM, Woodland RT, Muramatsu M, Honjo T, Gerstein RM.** 2004. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* **21**:379-390.
288. **Obukhanych TV, Nussenzweig MC.** 2006. T-independent type II immune responses generate memory B cells. *J Exp Med* **203**:305-310.
289. **Taillardet M, Haffar G, Mondiere P, Asensio MJ, Pleau-Pison T, Burdin N, Defrance T, Genestier L.** 2010. Toll-like receptor agonists allow generation of long-lasting antipneumococcal humoral immunity in response to a plain polysaccharidic vaccine. *J Infect Dis* **202**:470-479.
290. **Miyasaka T, Aoyagi T, Uchiyama B, Oishi K, Nakayama T, Kinjo Y, Miyazaki Y, Kunishima H, Hirakata Y, Kaku M, Kawakami K.** 2012. A possible relationship of natural killer T cells with humoral immune response to 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in clinical settings. *Vaccine* **30**:3304-3310.
291. **Bai L, Deng S, Reboulet R, Mathew R, Teyton L, Savage PB, Bendelac A.** 2013. Natural killer T (NKT)-B-cell interactions promote prolonged antibody responses and long-term memory to pneumococcal capsular polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:16097-16102.
292. **Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A.** 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* **31**:563-604.
293. **Belz GT, Nutt SL.** 2012. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol* **12**:101-113.
294. **Iwasaki A, Medzhitov R.** 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**:987-995.
295. **Jin B, Sun T, Yu XH, Yang YX, Yeo AE.** 2012. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clin Dev Immunol* **2012**:836485.
296. **Hubbell JA, Thomas SN, Swartz MA.** 2009. Materials engineering for immunomodulation. *Nature* **462**:449-460.
297. **Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K.** 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**:767-811.
298. **Pulendran B.** 2004. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunol Rev* **199**:227-250.
299. **Cerutti A, Qiao X, He B.** 2005. Plasmacytoid dendritic cells and the regulation of immunoglobulin heavy chain class switching. *Immunol Cell Biol* **83**:554-562.
300. **Cerutti A, Puga I, Cols M.** 2011. Innate control of B cell responses. *Trends Immunol* **32**:202-211.
301. **Bergtold A, Desai DD, Gavhane A, Clynes R.** 2005. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity* **23**:503-514.
302. **Boswell HS, Sharrow SO, Singer A.** 1980. Role of accessory cells in B cell activation. I. Macrophage presentation of TNP-Ficoll: evidence for macrophage-B cell interaction. *J Immunol* **124**:989-996.
303. **Garg M, Luo W, Kaplan AM, Bondada S.** 1996. Cellular basis of decreased immune responses to pneumococcal vaccines in aged mice. *Infect Immun* **64**:4456-4462.
304. **Chen Y, Pikkarainen T, Elomaa O, Soininen R, Kodama T, Kraal G, Tryggvason K.** 2005. Defective microarchitecture of the spleen marginal zone and impaired response to a thymus-independent type 2 antigen in mice lacking scavenger receptors MARCO and SR-A. *J Immunol* **175**:8173-8180.
305. **Taylor PR, Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Gordon S.** 2004. The role of SIGNR1 and the  $\beta$ -glucan receptor (dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages. *J Immunol* **172**:1157-1162.
306. **Balazs M, Martin F, Zhou T, Kearney J.** 2002. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* **17**:341-352.
307. **Garcia De Vinuesa C, Gulbranson-Judge A, Khan M, O'Leary P, Cascalho M, Wabl M, Klaus GG, Owen MJ, MacLennan IC.** 1999. Dendritic cells associated with plasmablast survival. *Eur J Immunol* **29**:3712-3721.

308. **Meltzer U, Goldblatt D.** 2006. Pneumococcal polysaccharides interact with human dendritic cells. *Infect Immun* **74**:1890-1895.
309. **Poeck H, Wagner M, Battiany J, Rothenfusser S, Wellisch D, Hornung V, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G.** 2004. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* **103**:3058-3064.
310. **Mond JJ, Farrar J, Paul WE, Fuller-Farrar J, Schaefer M, Howard M.** 1983. T cell dependence and factor reconstitution of *in vitro* antibody responses to TNP-*B. Abortus* and TNP-Ficoll: restoration of depleted responses with chromatographed fractions of a T cell-derived factor. *J Immunol* **131**:633-637.
311. **Mongini PK, Stein KE, Paul WE.** 1981. T cell regulation of IgG subclass antibody production in response to T-independent antigens. *J Exp Med* **153**:1-12.
312. **Dullforce P, Sutton DC, Heath AW.** 1998. Enhancement of T cell-independent immune responses in vivo by CD40 antibodies. *Nat Med* **4**:88-91.
313. **Jeurissen A, Wuyts M, Kasran A, Ramdien-Murli S, Boon L, Ceuppens JL, Bossuyt X.** 2002. Essential role for CD40 ligand interactions in T lymphocyte-mediated modulation of the murine immune response to pneumococcal capsular polysaccharides. *J Immunol* **168**:2773-2781.
314. **Jeurissen A, Billiau AD, Moens L, Shengqiao L, Landuyt W, Wuyts G, Boon L, Waer M, Ceuppens JL, Bossuyt X.** 2006. CD4<sup>+</sup> T lymphocytes expressing CD40 ligand help the IgM antibody response to soluble pneumococcal polysaccharides via an intermediate cell type. *J Immunol* **176**:529-536.
315. **Baker PJ, Reed ND, Stashak PW, Amsbaugh DF, Prescott B.** 1973. Regulation of the antibody response to type 3 pneumococcal polysaccharide. I. Nature of regulatory cells. *J Exp Med* **137**:1431-1441.
316. **Jeurissen A, Wuyts G, Kasran A, Ramdien-Murli S, Blanckaert N, Boon L, Ceuppens JL, Bossuyt X.** 2004. The human antibody response to pneumococcal capsular polysaccharides is dependent on the CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol* **34**:850-858.
317. **Boudewijns M, Jeurissen A, Wuyts M, Moens L, Boon L, Van Neerven JJ, Kasran A, Overbergh L, Lenaerts C, Waer M, Mathieu C, Ceuppens JL, Bossuyt X.** 2005. Blockade of CTLA-4 (CD152) enhances the murine antibody response to pneumococcal capsular polysaccharides. *J Leukoc Biol* **78**:1060-1069.
318. **Lee KS, Sen G, Snapper CM.** 2005. Endogenous CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells play no apparent role in the acute humoral response to intact *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **73**:4427-4431.
319. **Harding CV, Roof RW, Allen PM, Unanue ER.** 1991. Effects of pH and polysaccharides on peptide binding to class II major histocompatibility complex molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:2740-2744.
320. **Moens L, Jeurissen A, Nierkens S, Boon L, Van Kaer L, Kasran A, Wuyts G, Ceuppens JL, Bossuyt X.** 2009. Generation of antibody responses to pneumococcal capsular polysaccharides is independent of CD1 expression in mice. *Infect Immun* **77**:1976-1980.
321. **Guttormsen HK, Sharpe AH, Chandraker AK, Brigtsen AK, Sayegh MH, Kasper DL.** 1999. Cognate stimulatory B-cell-T-cell interactions are critical for T-cell help recruited by glycoconjugate vaccines. *Infect Immun* **67**:6375-6384.
322. **Khan AQ, Lees A, Snapper CM.** 2004. Differential regulation of IgG anti-capsular polysaccharide and antiprotein responses to intact *Streptococcus pneumoniae* in the presence of cognate CD4<sup>+</sup> T cell help. *J Immunol* **172**:532-539.
323. **Chen Q, Cannons JL, Paton JC, Akiba H, Schwartzberg PL, Snapper CM.** 2008. A novel ICOS-independent, but CD28- and SAP-dependent, pathway of T cell-dependent, polysaccharide-specific humoral immunity in response to intact *Streptococcus pneumoniae* versus pneumococcal conjugate vaccine. *J Immunol* **181**:8258-8266.
324. **Mackay F, Schneider P.** 2009. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* **9**:491-502.
325. **Zhang Y, Li J, Zhang YM, Zhang XM, Tao J.** 2015. Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases. *J Immunol Res* **2015**:247426.
326. **Vincent FB, Saulep-Easton D, Figgitt WA, Fairfax KA, Mackay F.** 2013. The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev* **24**:203-215.

327. **Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, Frew E, Scott ML.** 2001. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* **293**:2111-2114.
328. **Do RK, Hatada E, Lee H, Tourigny MR, Hilbert D, Chen-Kiang S.** 2000. Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. *J Exp Med* **192**:953-964.
329. **von Bulow GU, van Deursen JM, Bram RJ.** 2001. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* **14**:573-582.
330. **Stein JV, Lopez-Fraga M, Elustondo FA, Carvalho-Pinto CE, Rodriguez D, Gomez-Caro R, De Jong J, Martinez AC, Medema JP, Hahne M.** 2002. APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest* **109**:1587-1598.
331. **Dickinson GS, Sun G, Bram RJ, Alugupalli KR.** 2014. Efficient B cell responses to *Borrelia hermsii* infection depend on BAFF and BAFFR but not TACI. *Infect Immun* **82**:453-459.
332. **Kanswal S, Katsenelson N, Selvapandiyam A, Bram RJ, Akkoyunlu M.** 2008. Deficient TACI expression on B lymphocytes of newborn mice leads to defective Ig secretion in response to BAFF or APRIL. *J Immunol* **181**:976-990.
333. **Uslu K, Coleman AS, Allman WR, Katsenelson N, Bram RJ, Alugupalli KR, Akkoyunlu M.** 2014. Impaired B cell receptor signaling is responsible for reduced TACI expression and function in X-linked immunodeficient mice. *J Immunol* **192**:3582-3595.
334. **Dickinson GS, Akkoyunlu M, Bram RJ, Alugupalli KR.** 2015. BAFF receptor and TACI in B-1b cell maintenance and antibacterial responses. *Ann N Y Acad Sci*. doi: 10.1111/nyas.12772.
335. **Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A.** 2002. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol* **3**:822-829.
336. **Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, Bryce P, Jabara H, Bhan AK, Mizoguchi E, Geha RS.** 2004. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3903-3908.
337. **Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu S, Lam KP, Bram RJ, Jabara H, Geha RS.** 2005. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med* **201**:35-39.
338. **Mantchev GT, Cortesao CS, Rebrovich M, Cascalho M, Bram RJ.** 2007. TACI is required for efficient plasma cell differentiation in response to T-independent type 2 antigens. *J Immunol* **179**:2282-2288.
339. **MacLennan I, Vinuesa C.** 2002. Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses. *Immunity* **17**:235-238.
340. **Pulendran B.** 2004. Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. *Immunol Res* **29**:187-196.
341. **Schmalzer M, Jann NJ, Ferracin F, Landmann R.** 2011. T and B cells are not required for clearing *Staphylococcus aureus* in systemic infection despite a strong TLR2-MyD88-dependent T cell activation. *J Immunol* **186**:443-452.
342. **Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR, Vitetta ES.** 1988. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* **334**:255-258.
343. **Finkelman FD, Katona IM, Mosmann TR, Coffman RL.** 1988. IFN- $\gamma$  regulates the isotypes of Ig secreted during *in vivo* humoral immune responses. *J Immunol* **140**:1022-1027.
344. **Rawlings DJ, Schwartz MA, Jackson SW, Meyer-Bahlburg A.** 2012. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat Rev Immunol* **12**:282-294.
345. **Reynolds JM, Dong C.** 2013. Toll-like receptor regulation of effector T lymphocyte function. *Trends Immunol* **34**:511-519.
346. **Hwang IY, Park C, Harrison K, Kehrl JH.** 2009. TLR4 signaling augments B lymphocyte migration and overcomes the restriction that limits access to germinal center dark zones. *J Exp Med* **206**:2641-2657.
347. **Gavin AL, Hoebe K, Duong B, Ota T, Martin C, Beutler B, Nemazee D.** 2006. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science* **314**:1936-1938.

348. **Lanzavecchia A, Sallusto F.** 2007. Toll-like receptors and innate immunity in B-cell activation and antibody responses. *Curr Opin Immunol* **19**:268-274.
349. **He B, Santamaria R, Xu W, Cols M, Chen K, Puga I, Shan M, Xiong H, Bussel JB, Chiu A, Puel A, Reichenbach J, Marodi L, Doffinger R, Vasconcelos J, Issekutz A, Krause J, Davies G, Li X, Grimbacher B, Plebani A, Meffre E, Picard C, Cunningham-Rundles C, Casanova JL, Cerutti A.** 2010. The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat Immunol* **11**:836-845.
350. **Picard C, von Bernuth H, Ghandil P, Chrabieh M, Levy O, Arkwright PD, McDonald D, Geha RS, Takada H, Krause JC, Creech CB, Ku CL, Ehl S, Marodi L, Al-Muhsen S, Al-Hajjar S, Al-Ghoniaim A, Day-Good NK, Holland SM, Gallin JI, Chapel H, Speert DP, Rodriguez-Gallego C, Colino E, Garty BZ, Roifman C, Hara T, Yoshikawa H, Nonoyama S, Domachowski J, Issekutz AC, Tang M, Smart J, Zitnik SE, Hoarau C, Kumararatne DS, Thrasher AJ, Davies EG, Bethune C, Sirvent N, de Ricaud D, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Guedes M, Vitor AB, Rodrigo C, Almazan F, Mendez M, Arostegui JI, Alsina L, Fortuny C, Reichenbach J, Verbsky JW, Bossuyt X, Doffinger R, Abel L, Puel A, Casanova JL.** 2010. Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine (Baltimore)* **89**:403-425.
351. **Ku CL, von Bernuth H, Picard C, Zhang SY, Chang HH, Yang K, Chrabieh M, Issekutz AC, Cunningham CK, Gallin J, Holland SM, Roifman C, Ehl S, Smart J, Tang M, Barrat FJ, Levy O, McDonald D, Day-Good NK, Miller R, Takada H, Hara T, Al-Hajjar S, Al-Ghoniaim A, Speert D, Sanlaville D, Li X, Geissmann F, Vivier E, Marodi L, Garty BZ, Chapel H, Rodriguez-Gallego C, Bossuyt X, Abel L, Puel A, Casanova JL.** 2007. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* **204**:2407-2422.
352. **Sen G, Khan AQ, Chen Q, Snapper CM.** 2005. *In vivo* humoral immune responses to isolated pneumococcal polysaccharides are dependent on the presence of associated TLR ligands. *J Immunol* **175**:3084-3091.
353. **von Hunolstein C, Teloni R, Mariotti S, Recchia S, Orefici G, Nisini R.** 2000. Synthetic oligodeoxynucleotide containing CpG motif induces an anti-polysaccharide type 1-like immune response after immunization of mice with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Int Immunol* **12**:295-303.
354. **Kovarik J, Bozzotti P, Tougne C, Davis HL, Lambert PH, Krieg AM, Siegrist CA.** 2001. Adjuvant effects of CpG oligodeoxynucleotides on responses against T-independent type 2 antigens. *Immunology* **102**:67-76.
355. **Khan AQ, Chen Q, Wu ZQ, Paton JC, Snapper CM.** 2005. Both innate immunity and type 1 humoral immunity to *Streptococcus pneumoniae* are mediated by MyD88 but differ in their relative levels of dependence on toll-like receptor 2. *Infect Immun* **73**:298-307.
356. **Knapp S, Wieland CW, van 't Veer C, Takeuchi O, Akira S, Florquin S, van der Poll T.** 2004. Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. *J Immunol* **172**:3132-3138.
357. **Pozdnyakova O, Guttormsen HK, Lalani FN, Carroll MC, Kasper DL.** 2003. Impaired antibody response to group B streptococcal type III capsular polysaccharide in C3- and complement receptor 2-deficient mice. *J Immunol* **170**:84-90.
358. **Griffioen AW, Rijkers GT, Janssens-Korpela P, Zegers BJ.** 1991. Pneumococcal polysaccharides complexed with C3d bind to human B lymphocytes via complement receptor type 2. *Infect Immun* **59**:1839-1845.
359. **Wessels MR, Paoletti LC, Rodewald AK, Michon F, DiFabio J, Jennings HJ, Kasper DL.** 1993. Stimulation of protective antibodies against type Ia and Ib group B *streptococci* by a type Ia polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *Infect Immun* **61**:4760-4766.
360. **Tuomanen E, Tomasz A, Hengstler B, Zak O.** 1985. The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* **151**:535-540.
361. **Kocabas C, Katsenelson N, Kanswal S, Kennedy MN, Cui X, Blake MS, Segal DM, Akkoyunlu M.** 2007. *Neisseria meningitidis* type C capsular polysaccharide inhibits

- lipooligosaccharide-induced cell activation by binding to CD14. *Cell Microbiol* **9**:1297-1310.
362. **Gold R, Lepow ML, Goldschneider I, Draper TL, Gotschlich EC.** 1975. Clinical evaluation of group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines in infants. *J Clin Invest* **56**:1536-1547.
363. **Torling J, Hedlund J, Konradsen HB, Ortqvist A.** 2003. Revaccination with the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in middle-aged and elderly persons previously treated for pneumonia. *Vaccine* **22**:96-103.
364. **Murphy JW, Cozad GC.** 1972. Immunological unresponsiveness induced by cryptococcal capsular polysaccharide assayed by the hemolytic plaque technique. *Infect Immun* **5**:896-901.
365. **Rodriguez ME, van den Dobbelsteen GP, Oomen LA, de Weers O, van Buren L, Beurret M, Poolman JT, Hoogerhout P.** 1998. Immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* type 6B and 14 polysaccharide-tetanus toxoid conjugates and the effect of uncoupled polysaccharide on the antigen-specific immune response. *Vaccine* **16**:1941-1949.
366. **Peeters CC, Tenbergen-Meekes AM, Poolman JT, Zegers BJ, Rijkers GT.** 1992. Immunogenicity of a *Streptococcus pneumoniae* type 4 polysaccharide-protein conjugate vaccine is decreased by admixture of high doses of free saccharide. *Vaccine* **10**:833-840.
367. **Monari C, Pericolini E, Bistoni G, Casadevall A, Kozel TR, Vecchiarelli A.** 2005. *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan induces expression of fas ligand in macrophages. *J Immunol* **174**:3461-3468.
368. **Monari C, Kozel TR, Paganelli F, Pericolini E, Perito S, Bistoni F, Casadevall A, Vecchiarelli A.** 2006. Microbial immune suppression mediated by direct engagement of inhibitory Fc receptor. *J Immunol* **177**:6842-6851.
369. **Hajishengallis G, Lambris JD.** 2011. Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. *Nat Rev Immunol* **11**:187-200.
370. **Finlay BB, McFadden G.** 2006. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* **124**:767-782.
371. **Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmek B, Van Kooyk Y.** 2003. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* **197**:7-17.
372. **Nigou J, Zelle-Rieser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G.** 2001. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol* **166**:7477-7485.
373. **Moens L, Jeurissen A, Wuyts G, Fallon PG, Louis B, Ceuppens JL, Bossuyt X.** 2007. Specific intracellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin R1 is not involved in the murine antibody response to pneumococcal polysaccharides. *Infect Immun* **75**:5748-5752.
374. **Leyva-Cobian F, Unanue ER.** 1988. Intracellular interference with antigen presentation. *J Immunol* **141**:1445-1450.
375. **Moreno C, Mehlert A, Lamb J.** 1988. The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. *Clin Exp Immunol* **74**:206-210.
376. **Gonzalez-Fernandez M, Carrasco-Marin E, Alvarez-Dominguez C, Outschoorn IM, Leyva-Cobian F.** 1997. Inhibitory effects of thymus-independent type 2 antigens on MHC class II-restricted antigen presentation: comparative analysis of carbohydrate structures and the antigen presenting cell. *Cell Immunol* **176**:1-13.
377. **Ram S, Sharma AK, Simpson SD, Gulati S, McQuillen DP, Pangburn MK, Rice PA.** 1998. A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* **187**:743-752.
378. **Erdmann H, Steeg C, Koch-Nolte F, Fleischer B, Jacobs T.** 2009. Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). *Cell Microbiol* **11**:1600-1611.
379. **Bax M, Kuijff ML, Heikema AP, van Rijs W, Bruijns SC, Garcia-Vallejo JJ, Crocker PR, Jacobs BC, van Vliet SJ, van Kooyk Y.** 2011. *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharides modulate dendritic cell-mediated T cell polarization in a sialic acid linkage-dependent manner. *Infect Immun* **79**:2681-2689.

380. **Courtney AH, Puffer EB, Pontrello JK, Yang ZQ, Kiessling LL.** 2009. Sialylated multivalent antigens engage CD22 in trans and inhibit B cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:2500-2505.
381. **Arjunaraja S, Massari P, Wetzler LM, Lees A, Colino J, Snapper CM.** 2012. The nature of an *in vivo* anti-capsular polysaccharide response is markedly influenced by the composition and/or architecture of the bacterial subcapsular domain. *J Immunol* **188**:569-577.
382. **Briles DE, Nahm M, Marion TN, Perlmutter RM, Davie JM.** 1982. Streptococcal group A carbohydrate has properties of both a thymus-independent (TI-2) and a thymus-dependent antigen. *J Immunol* **128**:2032-2035.
383. **Avci FY, Li X, Tsuji M, Kasper DL.** 2011. A mechanism for glycoconjugate vaccine activation of the adaptive immune system and its implications for vaccine design. *Nat Med* **17**:1602-1609.
384. **Colino J, Shen Y, Snapper CM.** 2002. Dendritic cells pulsed with intact *Streptococcus pneumoniae* elicit both protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses *in vivo* through distinct mechanisms. *J Exp Med* **195**:1-13.
385. **Chen Q, Snapper CM.** 2013. Inflammatory monocytes are critical for induction of a polysaccharide-specific antibody response to an intact bacterium. *J Immunol* **190**:1048-1055.
386. **Takeuchi O, Hoshino K, Akira S.** 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* **165**:5392-5396.
387. **Lecours MP, Segura M, Fittipaldi N, Rivest S, Gottschalk M.** 2012. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS One* **7**:e44746.
388. **Lecours MP, Segura M, Lachance C, Mussa T, Surprenant C, Montoya M, Gottschalk M.** 2011. Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. *Vet Res* **42**:72.
389. **Wooten RM, Ma Y, Yoder RA, Brown JP, Weis JH, Zachary JF, Kirschning CJ, Weis JJ.** 2002. Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* **168**:348-355.
390. **Vasilevsky S, Chattopadhyay G, Colino J, Yeh TJ, Chen Q, Sen G, Snapper CM.** 2008. B and CD4<sup>+</sup> T-cell expression of TLR2 is critical for optimal induction of a T-cell-dependent humoral immune response to intact *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Immunol* **38**:3316-3326.
391. **Chang YC, Olson J, Louie A, Crocker PR, Varki A, Nizet V.** 2014. Role of macrophage sialoadhesin in host defense against the sialylated pathogen group B *Streptococcus*. *J Mol Med (Berl)* **92**:951-959.
392. **Koppel EA, Wieland CW, van den Berg VC, Litjens M, Florquin S, van Kooyk Y, van der Poll T, Geijtenbeek TB.** 2005. Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1 (SIGNR1) expressed by marginal zone macrophages is essential for defense against pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur J Immunol* **35**:2962-2969.
393. **Arjunaraja S, Paoletti LC, Snapper CM.** 2012. Structurally identical capsular polysaccharide expressed by intact group B *streptococcus* versus *Streptococcus pneumoniae* elicits distinct murine polysaccharide-specific IgG responses *in vivo*. *J Immunol* **188**:5238-5246.
394. **Lemire P, Roy D, Fittipaldi N, Okura M, Takamatsu D, Bergman E, Segura M.** 2014. Implication of TLR- but not of NOD2-signaling pathways in dendritic cell activation by group B *Streptococcus* serotypes III and V. *PLoS One* **9**:e113940.
395. **Lemire P, Houde M, Segura M.** 2012. Encapsulated group B *Streptococcus* modulates dendritic cell functions via lipid rafts and clathrin-mediated endocytosis. *Cell Microbiol* **14**:1707-1719.
396. **Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, Segura M.** 2011. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis* **204**:919-929.
397. **Meijerink M, Ferrando ML, Lammers G, Taverne N, Smith HE, Wells JM.** 2012. Immunomodulatory effects of *Streptococcus suis* capsule type on human dendritic cell responses, phagocytosis and intracellular survival. *PLoS One* **7**:e35849.

398. **Lemire P, Houde M, Lecours MP, Fittipaldi N, Segura M.** 2012. Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells. *Microbes Infect* **14**:1064-1076.
399. **Chang YC, Olson J, Beasley FC, Tung C, Zhang J, Crocker PR, Varki A, Nizet V.** 2014. Group B *Streptococcus* engages an inhibitory Siglec through sialic acid mimicry to blunt innate immune and inflammatory responses in vivo. *PLoS Pathog* **10**:e1003846.
400. **Chattopadhyay G, Chen Q, Colino J, Lees A, Snapper CM.** 2009. Intact bacteria inhibit the induction of humoral immune responses to bacterial-derived and heterologous soluble T cell-dependent antigens. *J Immunol* **182**:2011-2019.
401. **Saumyaa, Arjunaraja S, Pujanauski L, Colino J, Torres RM, Snapper CM.** 2013. Immunosuppressive property within the *Streptococcus pneumoniae* cell wall that inhibits generation of T follicular helper, germinal center, and plasma cell response to a coimmunized heterologous protein. *Infect Immun* **81**:3426-3433.
402. **Hu J, You W, Wang B, Hu X, Tan C, Liu J, Chen H, Bei W.** 2015. Construction, characterization and evaluation of the protective efficacy of the *Streptococcus suis* double mutant strain DeltaSsPep/DeltaSsPspC as a live vaccine candidate in mice. *Microbiol Res* **170**:87-94.
403. **Holt ME, Enright MR, Alexander TJ.** 1990. Immunisation of pigs with killed cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Res Vet Sci* **48**:23-27.
404. **Andresen LO, Tegtmeier C.** 2001. Passive immunization of pigs against experimental infection with *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol* **81**:331-344.
405. **Unkeless JC, Scigliano E, Freedman VH.** 1988. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol* **6**:251-281.
406. **Neuberger MS, Rajewsky K.** 1981. Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *Eur J Immunol* **11**:1012-1016.
407. **Michaelsen TE, Kolberg J, Aase A, Herstad TK, Hoiby EA.** 2004. The four mouse IgG isotypes differ extensively in bactericidal and opsonophagocytic activity when reacting with the P1.16 epitope on the outer membrane PorA protein of *Neisseria meningitidis*. *Scand J Immunol* **59**:34-39.
408. **Oishi K, Koles NL, Guelde G, Pollack M.** 1992. Antibacterial and protective properties of monoclonal antibodies reactive with *Escherichia coli* O111:B4 lipopolysaccharide: relation to antibody isotype and complement-fixing activity. *J Infect Dis* **165**:34-45.
409. **Malley R, Trzcinski K, Srivastava A, Thompson CM, Anderson PW, Lipsitch M.** 2005. CD4<sup>+</sup> T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:4848-4853.
410. **McCool TL, Weiser JN.** 2004. Limited role of antibody in clearance of *Streptococcus pneumoniae* in a murine model of colonization. *Infect Immun* **72**:5807-5813.
411. **Weber SE, Tian H, Pirofski LA.** 2011. CD8<sup>+</sup> cells enhance resistance to pulmonary serotype 3 *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *J Immunol* **186**:432-442.
412. **Lagergard T, Shiloach J, Robbins JB, Schneerson R.** 1990. Synthesis and immunological properties of conjugates composed of group B *streptococcus* type III capsular polysaccharide covalently bound to tetanus toxoid. *Infect Immun* **58**:687-694.
413. **Wessels MR, Paoletti LC, Guttormsen HK, Michon F, D'Ambra AJ, Kasper DL.** 1998. Structural properties of group B streptococcal type III polysaccharide conjugate vaccines that influence immunogenicity and efficacy. *Infect Immun* **66**:2186-2192.
414. **McLay J, Leonard E, Petersen S, Shapiro D, Greenspan NS, Schreiber JR.** 2002.  $\gamma$ 3 gene-disrupted mice selectively deficient in the dominant IgG subclass made to bacterial polysaccharides. II. Increased susceptibility to fatal pneumococcal sepsis due to absence of anti-polysaccharide IgG3 is corrected by induction of anti-polysaccharide IgG1. *J Immunol* **168**:3437-3443.
415. **Moreno C, Esdaile J.** 1983. Immunoglobulin isotype in the murine response to polysaccharide antigens. *Eur J Immunol* **13**:262-264.
416. **Barrett DJ, Ayoub EM.** 1986. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin Exp Immunol* **63**:127-134.
417. **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.
418. **Iwata T, Mitani A, Ishihara Y, Tanaka S, Yamamoto G, Kikuchi T, Naganawa T, Matsumura Y, Suga T, Koide M, Sobue T, Suzuki T, Noguchi T.** 2005. *Actinobacillus*

- actinomycetemcomitans* Y4 capsular polysaccharide induces IL-1 $\beta$  mRNA expression through the JNK pathway in differentiated THP-1 cells. Clin Exp Immunol **141**:261-269.
419. **Powell JL, Wright AC, Wasserman SS, Hone DM, Morris JG, Jr.** 1997. Release of tumor necrosis factor  $\alpha$  in response to *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide in *in vivo* and *in vitro* models. Infect Immun **65**:3713-3718.
420. **Zughaier SM.** 2011. *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharides induce inflammatory responses via TLR2 and TLR4-MD-2. J Leukoc Biol **89**:469-480.
421. **d'Empaire G, Baer MT, Gibson FC, 3rd.** 2006. The K1 serotype capsular polysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* elicits chemokine production from murine macrophages that facilitates cell migration. Infect Immun **74**:6236-6243.
422. **Wang Q, McLoughlin RM, Cobb BA, Charrel-Dennis M, Zaleski KJ, Golenbock D, Tzianabos AO, Kasper DL.** 2006. A bacterial carbohydrate links innate and adaptive responses through Toll-like receptor 2. J Exp Med **203**:2853-2863.
423. **Soell M, Diab M, Haan-Archipoff G, Beretz A, Herbelin C, Poutrel B, Klein JP.** 1995. Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. Infect Immun **63**:1380-1386.
424. **Mitchell D, Olive C.** 2010. Regulation of Toll-like receptor-induced chemokine production in murine dendritic cells by mitogen-activated protein kinases. Mol Immunol **47**:2065-2073.
425. **Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Hashimoto K.** 2008. The NF- $\kappa$ B, p38 MAPK and STAT1 pathways differentially regulate the dsRNA-mediated innate immune responses of epidermal keratinocytes. Int Immunol **20**:901-909.
426. **Kim JY, Ahn MH, Song HO, Choi JH, Ryu JS, Min DY, Cho MH.** 2006. Involvement of MAPK activation in chemokine or COX-2 productions by *Toxoplasma gondii*. Korean J Parasitol **44**:197-207.
427. **Li X, Xu W, Chen J.** 2010. Polysaccharide purified from *Polyporus umbellatus* (Per) Fr induces the activation and maturation of murine bone-derived dendritic cells via toll-like receptor 4. Cell Immunol **265**:50-56.
428. **Li X, Xu W.** 2011. TLR4-mediated activation of macrophages by the polysaccharide fraction from *Polyporus umbellatus*(pers.) Fries. J Ethnopharmacol **135**:1-6.
429. **Hsu HY, Jeyashoke N, Yeh CH, Song YJ, Hua KF, Chao LK.** 2010. Immunostimulatory bioactivity of algal polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa* activates macrophages via Toll-like receptor 4. J Agric Food Chem **58**:927-936.
430. **Li X, He X, Liu B, Xu L, Lu C, Zhao H, Niu X, Chen S, Lu A.** 2012. Maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells induced by *Radix Glycyrrhizae* polysaccharide. Molecules **17**:6557-6568.
431. **Ali SR, Fong JJ, Carlin AF, Busch TD, Linden R, Angata T, Areschoug T, Parast M, Varki N, Murray J, Nizet V, Varki A.** 2014. Siglec-5 and Siglec-14 are polymorphic paired receptors that modulate neutrophil and amnion signaling responses to group B *Streptococcus*. J Exp Med **211**:1231-1242.
432. **Lei MG, Tan X, Qureshi N, Morrison DC.** 2005. Regulation of cellular caveolin-1 protein expression in murine macrophages by microbial products. Infect Immun **73**:8136-8143.
433. **Xu S, Huo J, Gunawan M, Su IH, Lam KP.** 2009. Activated dectin-1 localizes to lipid raft microdomains for signaling and activation of phagocytosis and cytokine production in dendritic cells. J Biol Chem **284**:22005-22011.
434. **Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE.** 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. J Interferon Cytokine Res **29**:313-326.
435. **Maurer M, von Stebut E.** 2004. Macrophage inflammatory protein-1. Int J Biochem Cell Biol **36**:1882-1886.
436. **Okazaki K, Kondo M, Kato M, Nishida A, Takahashi H, Noda M, Kimura H.** 2008. Temporal alterations in concentrations of sera cytokines/chemokines in sepsis due to group B *streptococcus* infection in a neonate. Jpn J Infect Dis **61**:382-385.
437. **Round JL, Lee SM, Li J, Tran G, Jabri B, Chatila TA, Mazmanian SK.** 2011. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. Science **332**:974-977.
438. **Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL.** 2008. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. Nature **453**:620-625.



439. **Mertens J, Fabri M, Zingarelli A, Kubacki T, Meemboor S, Groneck L, Seeger J, Bessler M, Hafke H, Odenthal M, Bieler JG, Kalka C, Schneck JP, Kashkar H, Kalka-Moll WM.** 2009. *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 capsular polysaccharide induces CD8CD28 regulatory T lymphocytes by TCR crosslinking. *PLoS Pathog* **5**:e1000596.
440. **Gordon JR, Ma Y, Churchman L, Gordon SA, Dawicki W.** 2014. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Front Immunol* **5**:7.
441. **Lutz MB, Schuler G.** 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* **23**:445-449.
442. **Chen C, Qu QX, Huang JA, Zhu YB, Ge Y, Wang Q, Zhang XG.** 2007. Expression of programmed-death receptor ligands 1 and 2 may contribute to the poor stimulatory potential of murine immature dendritic cells. *Immunobiology* **212**:159-165.
443. **Maldonado RA, von Andrian UH.** 2010. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol* **108**:111-165.
444. **Xia R, Han Z, Zhou Y, Chen S, Chen B, Gu M, Deng A, Zhong R, Wen H.** 2010. BLYS and APRIL expression in peripheral blood mononuclear cells of cryptococcal meningitis patients and their clinical significance. *Clin Biochem* **43**:397-400.
445. **Kanswal S, Katsenelson N, Allman W, Uslu K, Blake MS, Akkoyunlu M.** 2011. Suppressive effect of bacterial polysaccharides on BAFF system is responsible for their poor immunogenicity. *J Immunol* **186**:2430-2443.
446. **Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, Moore PA, Olsen HS, Migone TS, Sosnovtseva S, Carrell JA, Feng P, Giri JG, Hilbert DM.** 2001. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood* **97**:198-204.
447. **Zhang M, Ko KH, Lam QL, Lo CK, Srivastava G, Zheng B, Lau YL, Lu L.** 2005. Expression and function of TNF family member B cell-activating factor in the development of autoimmune arthritis. *Int Immunol* **17**:1081-1092.
448. **Suzuki K, Maruya M, Kawamoto S, Sitnik K, Kitamura H, Agace WW, Fagarasan S.** 2010. The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* **33**:71-83.
449. **Katsenelson N, Kanswal S, Puig M, Mostowski H, Verthelyi D, Akkoyunlu M.** 2007. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion. *Eur J Immunol* **37**:1785-1795.
450. **Abu-Rish EY, Amrani Y, Browning MJ.** 2013. Toll-like receptor 9 activation induces expression of membrane-bound B-cell activating factor (BAFF) on human B cells and leads to increased proliferation in response to both soluble and membrane-bound BAFF. *Rheumatology (Oxford)* **52**:1190-1201.
451. **Taillardet M, Haffar G, Mondiere P, Asensio MJ, Gheit H, Burdin N, Defrance T, Genestier L.** 2009. The thymus-independent immunity conferred by a pneumococcal polysaccharide is mediated by long-lived plasma cells. *Blood* **114**:4432-4440.
452. **Chang YC, Nizet V.** 2014. The interplay between Siglecs and sialylated pathogens. *Glycobiology* **24**:818-825.
453. **Chaffin DO, Mentele LM, Rubens CE.** 2005. Sialylation of group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by *cpsK* and is required for optimal capsule polymerization and expression. *J Bacteriol* **187**:4615-4626.
454. **Lecours MP, Fittipaldi N, Takamatsu D, Okura M, Segura M, Goyette-Desjardins G, Van Calsteren MR, Gottschalk M.** 2012. Sialylation of *Streptococcus suis* serotype 2 is essential for capsule expression but is not responsible for the main capsular epitope. *Microbes Infect* **14**:941-950.
455. **Gonzalez-Outeirino J, Kadirvelraj R, Woods RJ.** 2005. Structural elucidation of type III group B *Streptococcus* capsular polysaccharide using molecular dynamics simulations: the role of sialic acid. *Carbohydr Res* **340**:1007-1018.
456. **Jennings HJ, Lugowski C, Kasper DL.** 1981. Conformational aspects critical to the immunospecificity of the type III group B streptococcal polysaccharide. *Biochemistry* **20**:4511-4518.
457. **Duong BH, Tian H, Ota T, Completo G, Han S, Vela JL, Ota M, Kubitz M, Bovin N, Paulson JC, Nemazee D.** 2010. Decoration of T-independent antigen with ligands for CD22 and Siglec-G can suppress immunity and induce B cell tolerance *in vivo*. *J Exp Med* **207**:173-187.
458. **Corfield T.** 1992. Bacterial sialidases-roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiology* **2**:509-521.

459. **Hennet T, Chui D, Paulson JC, Marth JD.** 1998. Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:4504-4509.
460. **McMillan SJ, Sharma RS, McKenzie EJ, Richards HE, Zhang J, Prescott A, Crocker PR.** 2013. Siglec-E is a negative regulator of acute pulmonary neutrophil inflammation and suppresses CD11b  $\beta$ 2-integrin-dependent signaling. *Blood* **121**:2084-2094.
461. **O'Keefe TL, Williams GT, Davies SL, Neuberger MS.** 1996. Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice. *Science* **274**:798-801.
462. **Michon F, Uitz C, Sarkar A, D'Ambra AJ, Laude-Sharp M, Moore S, Fusco PC.** 2006. Group B streptococcal type II and III conjugate vaccines: physicochemical properties that influence immunogenicity. *Clin Vaccine Immunol* **13**:936-943.
463. **Laferriere CA, Sood RK, de Muys JM, Michon F, Jennings HJ.** 1997. The synthesis of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-tetanus toxoid conjugates and the effect of chain length on immunogenicity. *Vaccine* **15**:179-186.
464. **Paoletti LC, Kasper DL, Michon F, DiFabio J, Jennings HJ, Tosteson TD, Wessels MR.** 1992. Effects of chain length on the immunogenicity in rabbits of group B *Streptococcus* type III oligosaccharide-tetanus toxoid conjugates. *J Clin Invest* **89**:203-209.
465. **Cobb BA, Wang Q, Tzianabos AO, Kasper DL.** 2004. Polysaccharide processing and presentation by the MHCII pathway. *Cell* **117**:677-687.
466. **Cobb BA, Kasper DL.** 2008. Characteristics of carbohydrate antigen binding to the presentation protein HLA-DR. *Glycobiology* **18**:707-718.
467. **Gallorini S, Berti F, Parente P, Baronio R, Aprea S, D'Oro U, Pizza M, Telford JL, Wack A.** 2007. Introduction of zwitterionic motifs into bacterial polysaccharides generates TLR2 agonists able to activate APCs. *J Immunol* **179**:8208-8215.
468. **Gallorini S, Berti F, Mancuso G, Cozzi R, Tortoli M, Volpini G, Telford JL, Beninati C, Maione D, Wack A.** 2009. Toll-like receptor 2 dependent immunogenicity of glycoconjugate vaccines containing chemically derived zwitterionic polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:17481-17486.

## **VII – ANNEXES**

## ANNEXE, ARTICLE IV

# Immunology of *Streptococcus suis* infection: advances and future challenges

Cynthia Calzas<sup>a</sup>, Marcelo Gottschalk<sup>a</sup>, Mariela Segura<sup>a</sup>

Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada<sup>a</sup>

Manuscrit en préparation pour soumission à *Microbes and Infection*

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

Je suis la première auteure de l'article. J'ai participé activement à l'écriture de l'article.

## Abstract

*Streptococcus suis* is a major pig pathogen responsible for important economic losses in the swine industry, as well as an emerging zoonotic agent in humans, with deadly outbreaks reported in Asian countries. This encapsulated extracellular bacterium is highly invasive. After penetration of host mucosal barriers, *S. suis* can reach and survive in the blood, and finally invade multiple organs including spleen, liver, kidney, lung and heart. In addition, the bacteria are able to cross the brain microvascular endothelial cells (BMECs) and/or the epithelial cells of the choroid plexus at the blood-brain barrier (BBB) to gain access to central nervous system (CNS). Septicemia, meningitis, endocarditis, pneumonia and arthritis are the most common forms of *S. suis* disease. The pathogenicity of *S. suis* is ensured through a collection of virulence factors/markers, including capsular polysaccharide (CPS), suilysin, extracellular factor (EF), muraminidase-released protein (MRP), adhesins (1, 2) and enzymes. For complete reviews on virulence factors and the pathogenesis of the infection see (1, 2). Among the 35 serotypes described, type 2 is the most virulent and frequently isolated from both diseased pigs and humans, and consequently research has almost exclusively focused on this serotype. Despite the increasing number of studies, the pathogenesis of *S. suis* infection is still not completely understood and, to date, attempts to control the disease are hampered by the lack of an effective vaccine.

In this review, we describe the innate and adaptive immune responses implemented by the host to counteract *S. suis* infection as well as the role played by *S. suis* virulence factors/markers on the interaction with host defense cells and on immune evasion mechanisms. The mouse model has been attested to reproduce some of the clinical characteristics observed in pigs (3-5) and thus, mouse cells have been legitimately used alongside of cells from pig and human origins to explore the immunology of *S. suis* infection.

## **S. suis interaction with mucosal barriers**

In infected pigs, *S. suis* usually colonizes the upper respiratory tract, in particular the pharyngeal and palatine tonsils, but alimentary and genital tracts can also be colonization sites. In humans, especially in people working in close contact with infected animals, such as butchers and abattoir workers, *S. suis* nasopharyngeal carriage has been reported. The bacteria may also colonize the gastro-intestinal tract in people consuming fresh/raw contaminated pork meat (6). The mucosa of respiratory and gastrointestinal tracts, composed of epithelial cells and the underlying lymphoid tissue, is the first line of defense of the host against pathogens. Colonization of the upper respiratory tract by *S. suis* may lead to an asymptomatic carriage, but is also considered the first step for the development of an invasive disease in pigs characterized by hematogenous and lymphogenous dissemination. It is still unknown how *S. suis* usually found in very low quantities in tonsils of pigs, manages to penetrate the mucosal surface (7). Both inadequate host immune responses and environmental factors are likely to play a role.

### 1. Interaction of *S. suis* with mucosal epithelial cells

Aerosol experimental infections in pigs have demonstrated the presence of *S. suis* in the crypt epithelium and in the subepithelial lymphoid tissue of the palatine tonsils, suggesting that bacteria are able to breach the mucosal epithelium barrier (8, 9). Few studies are available regarding the interactions between *S. suis* serotype 2 and mucosal epithelial cells.

*In vitro* experiments investigating the capacity of the bacteria to adhere and/or invade human or porcine epithelial cells are a matter of controversial discussions. Whereas some studies have shown an adhesion of well encapsulated *S. suis* (10, 11), others have demonstrated that CPS expression could decrease (12, 13) or completely inhibit (14) adhesion. On the other hand, most of the studies indicate that *S. suis* owns low/absence of invasive abilities towards mucosal epithelial cells (10-12). As it is the case for adhesion, the presence of CPS seems to inhibit the invasion of epithelial cells by *S. suis* (13, 14). One explanation is that CPS hinders bacterial molecules contributing to adhesion and/or invasion. Several adhesins expressed by *S. suis* have been indeed described to interact *in vitro* with epithelial cells and/or components of the extracellular matrix, an intermediate interface between the epithelium and the underlying mucosal tissue (1). In addition, suilysin, a thiol-activated hemolysin that

targets cholesterol in the membrane of eukaryotic cells, has been demonstrated to exhibit a significant role in the invasion of host epithelial cells by *S. suis*. However, virulent *S. suis* strains that do not produce suilysin are still able to generate disease in pigs. Thus, suilysin-positive *S. suis* strains may use cytotoxicity and intercellular invasion as mechanisms to breach the respiratory epithelia, at opposite to direct intracellular invasion by suilysin-negative strains (12). Nonetheless, a recent study using mutant strains of *S. suis* expressing a suilysin without cytolytic activity has indicated that suilysin-mediated invasion of human laryngeal epithelial cells by the bacteria could occur in the absence of pore formation (15).

Environmental factors, such as the sugar composition, have been shown to possibly influence the *in vitro* ability of *S. suis* to interact with epithelial cells by regulating genes coding described/putative adhesins and invasins (16). The effect of environmental signals on the regulation of CPS expression and the subsequent interaction with epithelial cells needs to be better explored (14). Finally, *S. suis* exhibits a better adhesion and/or invasion of swine tracheal epithelial cells previously infected with swine influenza H1N1 virus, which indicates that a weakening of host mucosal response may allow bacteria to cross the epithelial barrier. Indeed, binding of *S. suis* to virus-infected cells or directly to the virus could both play a role in the invasion and in the systemic dissemination of the bacteria (13).

Studies described above mostly used respiratory epithelial cells *in vitro*. Administration of *S. suis* in pigs, via oral route or through a duodenal canula, has evidenced that bacteria manage to translocate from the gut to mesenteric lymph nodes and organs and has validated that intestinal tract can be another infection route of the pathogen (17, 18). Finally, *S. suis* is also able to translocate across human intestinal epithelial cells *in vitro* mainly via a paracellular route, without disrupting monolayer integrity, confirming the zoonotic potential of *S. suis* via oral contamination. In this study, expression of CPS impairs the adhesion and invasion of the bacteria (18).

## 2. Role of host antimicrobial peptides and enzymes in resistance to *S. suis* colonization and dissemination

Ciliated and goblet cells of epithelial surfaces and submucosal glands participate in innate mucosal immunity. In addition of being a physical barrier, epithelial cells form a powerful biochemical barrier via secretion of mucus, antimicrobial

molecules and cytokines (19, 20). However, little is known about the role of these effector molecules in counteracting *S. suis* serotype 2 colonization and infection.

The mucus is composed of glycoprotein molecules of mucin and forms a continuous gel at the epithelial surface, entrapping microorganisms which are then removed by ciliary activity. Many bacteria overcome this innate defense mechanism by damaging epithelial cell cilia or decreasing mucin production (21). No study has focused on the interactions between *S. suis* and mucus of the respiratory epithelium. Whereas one work has demonstrated that *S. suis* is able to adhere *in vitro* to porcine gastric mucus via the carbohydrate-degrading enzyme ApuA (11), the ability of the bacteria to penetrate the mucus layer has never been examined.

Antimicrobial polypeptides produced by epithelial cells include the large enzymatic protein lysozyme and small cationic antimicrobial peptides (CAMPs). Whereas the general mechanism of action of those effectors has been quite well described in both humans and swine, including microbicidal and/or chemotactic activities towards leukocytes, their implication in resistance to *S. suis* colonization and dissemination has been poorly studied.

The lysozyme, a large and abundant antimicrobial protein, is found in high concentrations in several bodily secretions, including mucus. It induces bacterial lysis by hydrolyzing the glycosidic bond between *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylmuraminic acid in peptidoglycan (PG) cell wall. To resist against lysozyme digestion, bacteria have evolved mechanisms which modify the PG residues surrounding the cleavage site for lysozyme and reduce enzyme affinity to its substrate. Even if such mechanisms have been described in *S. suis*, a direct influence of lysozyme sensibility/resistance on colonization/dissemination has never been proven. Experimental infections in mice and pigs have demonstrated that isogenic mutant strain of *S. suis* deficient in *pgdA* gene, which is involved in *N*-deacetylation of *N*-acetylglucosamine, exhibits an impaired virulence associated with a decrease of bacterial loads in the blood and organs. However, a higher lysozyme sensibility of  $\Delta$ *pgdA* mutant strain could not be observed *in vitro*, probably due to the low degree of PG *N*-deacetylation of the wild-type (WT) strain during growth in normal laboratory culture medium (22). A comparative whole genome analysis between a lysozyme-sensitive strain and selected resistant derivatives has identified the *oatA* gene, encoding a PG O-acetyltransferase, as another factor involved in lysozyme resistance of *S. suis* (23). Interestingly, lysozyme resistance is highly variable among *S. suis* serotypes, serotypes 1 and 2 being more sensitive than serotype 9 isolates. In parallel,



a low sensibility of *S. suis* to the enzyme could be associated with a diminution or an absence of both CPS expression and autolysin activity (23). An extrapolation of those results can be done where lysozyme-sensitive isolates may be more prone to disseminate and cause systemic disease, whereas lysozyme-resistant strains could be mainly involved in mucosal colonization (24). A similar correlation between lysozyme resistance and successful mucosal colonization was suggested for *Streptococcus pneumoniae* (25).

CAMPs are ubiquitous and broadly effective components of host innate immunity. Electrostatic interactions of CAMPs with negatively charged phospholipids induce physical disruption of bacterial cell membranes resulting in pathogen killing. Defensins and cathelicidins are the two major families of CAMPs produced by mammal mucosal epithelial cells (26, 27). Recently, an *in vitro* experiment has displayed the susceptibility of a Chinese *S. suis* serotype 2 strain to the porcine  $\beta$ -defensin 2 (28), known to be produced by intestinal epithelial cells (29). Several Gram-positive bacteria have developed mechanisms to prevent CAMPs crossing bacterial cell wall by increasing the positive charge of lipoteichoic acids (LTA) by D-alanylation (30-32). In *S. suis*, the *dltA* gene is implicated in this chemical modification. The  $\Delta dltA$  mutant strain of *S. suis* shows an attenuated virulence in pigs and mice, reflected by a diminution of bacteremia in blood and organs in infected animals (33). Although the  $\Delta dltA$  strain exhibits an *in vitro* decrease resistance against bacterium- and frog-derived CAMPs, the sensibility towards those produced by porcine or human epithelial cells has not been assessed. It is important to note that in addition to epithelial cells, neutrophils are also implicated in lysozyme and CAMP production. The interaction between *S. suis* and these leukocytes will be described in the next sections.

Finally, mucosal epithelial cells promote recruitment and activation of immune system cells, including neutrophils, monocytes, dendritic cells (DCs) and lymphocytes, via the secretion of cytokines and chemokines. Whereas the ability of epithelial cells to produce those inflammatory mediators has been well demonstrated in reaction to several bacteria (20), the inflammatory response of respiratory or intestinal epithelial cells generated by *S. suis* remains largely uninvestigated. One study has shown that *S. suis* induces CXCL8/IL-8 and IL-6 expression after *in vitro* incubation with porcine tracheal epithelial cells (13). The influence of cytokine and chemokine secretion by epithelial cells on colonization and/or dissemination of *S. suis* stays undiscovered.

### 3. Interaction of *S. suis* with mucosa-associated lymphoid tissues

Mucosa-associated lymphoid tissues (MALT) are implicated in the development of specific mucosal immunity. In general, MALT of nasopharyngeal and intestinal tracts are composed of organized inductive sites located in close contact to the mucosal surface and composed of B cell-follicles and interfollicular T cell-areas, and effector sites, consisting of the diffuse tissue of lamina propria. MALT are overlaid by specialized epithelial antigen-sampling M cells and by a specific epithelium called lymphoepithelium, which is extensively infiltrated by leucocytes including lymphocytes, macrophages and neutrophils (34-36). In inductive sites, M cells can transfer microbial antigens from the luminal surface to mucosal DCs, which then initiate adaptive immune responses by interacting with naive cognate T and B cells. In germinal centers of follicles, B cells efficiently undergo mainly immunoglobulin (Ig) A-isotype switching and affinity maturation. Then, activated IgA<sup>+</sup> B cells reach local draining lymph nodes where they undergo further proliferation and differentiation. Plasmablasts migrate finally into the bloodstream and accumulate in the effector sites of MALT where they sustain final differentiation to IgA-producing plasma cells. Other models for the development of humoral immunity in MALT have been described, such as the generation of IgA responses outside of inductive sites (35, 36).

Although it is well admitted that *S. suis* infects the host primary through the upper respiratory tract, limited works have focused on the role of MALT in the pathogenesis of *S. suis* infection. Researches have concentrated almost exclusively on *in vivo* interactions of *S. suis* with MALT of porcine nasopharyngeal tonsils after nasal or oral inoculation. The first evidence that tonsillar MALT are able to trigger immune responses against *S. suis* has been brought by the detection of bacterial antigens not only in epithelium, but in germinal centers and interfollicular tissues as well (37). In the epithelium and the underlying tissue, *S. suis* is closely associated with mature or differentiated cells of the myeloid lineage, likely macrophages and DCs (38). Finally, a study evaluating the changes in the leukocyte subpopulations of tonsillar lymphoepithelium after exposure to *S. suis* has concluded that infected pigs present an increased number of both innate and adaptive immune cells, including neutrophils, macrophages, B lymphocytes and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. However, the early recruitment of lymphocytes might reflect a polyclonal non-specific response and further studies are needed to evaluate the specificity of T and B cell responses. Nonetheless, this study confirms a potential of tonsillar MALT for the initiation of both humoral and cellular responses against *S. suis* (9).

As described above, IgA is the predominant Ig class produced by MALT. It prevents the adhesion of microorganisms to epithelial cells and facilitates their elimination from the host. However, several bacteria have acquired counter-mechanisms, including the secretion of proteases which cleave IgA in its hinge region and render the Ig immunologically inactive (39). In addition, bacteria can use the released Fab fragments to enhance their surface hydrophobicity, allowing a better interaction with mucosal cells. Even if the mechanisms of the development of mucosal IgA response following *S. suis* infection have never been studied, bacteria have been shown to secrete an active IgA protease encoded by the *iga* gene. The decreased lethality and the absence of bacterial blood loads of convalescent pigs after experimental infection with the  $\Delta$ *iga* mutant strain suggest that mucosal IgA plays a crucial role in resistance to *S. suis* invasion of mucosal barriers and dissemination in the host (40, 41). An association between *in vitro* upregulation of the *iga* gene expression and the increase in adhesion/invasion of epithelial cells has recently been observed (16).

In the particular case of gut-associated lymphoid tissue (or GALT, which is also part of the MALT), no changes in leukocyte populations in the lymphoepithelium, in lamina propria or in mesenteric lymph nodes have been observed after intestinal experimental infection of pigs with *S. suis* (18), even if bacteria is detected in the draining lymph nodes (17, 18).

### ***S. suis* interactions with professional phagocytes and complement resistance**

Once infectious agents have crossed mucosal barriers, they face myeloid phagocyte system (MPS) in deep tissues and/or the blood circulation (42, 43). MPS is a group of dedicated phagocytic cells functioning in a cooperative way in the host defense against microbial infection, whose main arms are polymorphonuclear cells, mainly neutrophils, and mononuclear macrophages. Under the influence of cytokines/chemokines produced in an inflammatory context by local cells, neutrophils become activated and migrate to the infectious sites. In a similar way, monocytes are recruited and give rise to inflammatory macrophages. As a result of a common origin from a late bone marrow precursor, macrophages and neutrophils share several microbe-killing functionalities, including an avid phagocytosis and a use of a large array of antimicrobial molecules involving oxidants like nitric oxide (NO) and granule proteins/peptides (in the case of neutrophils). Antimicrobial molecules of neutrophil granules include proteins (lysozyme, lactoferrin) and CAMPs, which can act both within

the phagolysosome and in the extracellular environment after degranulation (44-46). Neutrophils and macrophages also share immunomodulatory activities and cooperate in the orchestration of the adaptive immune responses via the secretion of cytokines/chemokines. Both cells have overlapping expression of cell surface receptors for several chemokines, and are thus concomitantly recruited under infectious/inflammatory situations. They also express receptors for Ig and complement, which facilitate the recognition, internalization and killing of opsonized pathogens with host serum components. However, consequent to specialization during their differentiation, the two types of phagocytes have acquired distinctive but complementary features that originate different levels of antimicrobial capacities and different tissue localization. The antimicrobial capacity of neutrophils is higher compared with that of macrophages and whereas neutrophils are preferentially present in blood, macrophages are mostly tissue-resident cells (42, 43). Interaction of *S. suis* with these innate immune cells is a key step in the pathogenesis of the bacteria as the elimination of the pathogen in the blood circulation is crucial to counter the progression of the disease, in particular invasion of CNS.

#### 1. Interactions with neutrophils and role of pattern recognition receptors

Neutrophils are the predominant leukocytes in the bloodstream and are among the first cells attracted in *S. suis* penetration sites such as respiratory mucosa (9). Histopathological lesions of infected humans and/or pigs are also characterized by substantial neutrophilic infiltrate in the splenic red pulp and in the CNS (24, 47, 48). *In vitro* experiments of interaction between *S. suis* and neutrophils have been mainly carried out with serotype 2 and demonstrate that bacteria have developed several strategies to evade killing by interfering with both intra- and extracellular bactericidal activity of these cells.

Although several virulence markers have been proposed, only the CPS has been proven so far to be critical to the pathogenesis of *S. suis* infection. Indeed, non-encapsulated mutants are avirulent and rapidly eliminated from the bloodstream in both mouse and pig models of infection (1, 2). In this regard, the presence of CPS allows *S. suis* to resist against *in vitro* killing by porcine neutrophils as indicated by the higher sensitivity of isogenic unencapsulated mutant strains (49, 50). An increase in CPS thickness after *in vivo* bacterial growth is linked to a better resistance to killing by porcine neutrophils (51).

The precise mechanisms of *S. suis* CPS-mediated resistance to neutrophils are still poorly known. Non-encapsulated strains present a higher *in vitro* sensibility to phagocytosis by neutrophils (52). The absence of CPS is correlated with a higher adherence at the surface of neutrophils (50) and could thus facilitate the internalization. It remains to be determined if *S. suis* CPS hinders cell wall components essential to the recognition and the activation of phagocytic mechanisms by neutrophils. In addition, the capacity of CPS to actively inhibit the phagocytic signaling machinery of neutrophils, as observed with macrophages (see next section), needs to be explored. An interference of *S. suis* CPS with complement-mediated antimicrobial ability of neutrophils is unlikely as opsonization by complete naïve serum influences neither the resistance of well-encapsulated *S. suis*, nor the sensibility of non-encapsulated mutants against killing and/or phagocytosis by neutrophils (49, 52). This result is unexpected for a sialylated CPS such as *S. suis* CPS (53). Sialic acid of Group B *Streptococcus* (GBS) CPS blocks activation of the alternative complement pathways, conferring resistance of the bacteria to opsonin-dependent microbial activity of phagocytes (54-56). The lower concentration of sialic acid in *S. suis* (57) or the difference in the chemical link between sialic acid and the adjacent sugar (53, 58) may explain the contrasting immunomodulation effect of this sugar between the two streptococci. Finally, even if it has not yet been proven, CPS might also physically block access of antimicrobial molecules to the underlying bacterial cell membrane as reported for *Neisseria meningitidis* CPS (59). Interestingly, addition of the cytokines GM-CSF, TNF- $\alpha$  and CXCL8, known to promote phagocytic activity and expression of neutrophil receptors during bacterial infections (60-62), induces a significant increase in *S. suis* killing by these cells *in vitro* (49).

In addition to CPS, suilysin is another factor helping *S. suis* to escape from killing by neutrophils. First, suilysin exhibits cytotoxicity towards porcine neutrophils and appears to be the only toxic factor produced by the bacteria toward these cells (49). Then, studies using chemical neutralization of suilysin or a suilysin-negative isogenic mutant ( $\Delta sly$ ) strain support that this hemolysin allows bacteria to impede complement-dependent killing by porcine neutrophils (49). A factor H-binding surface protein (Fhb) expressed by *S. suis* serotype 2 has recently been shown to inhibit the complement-mediated destruction ability of human neutrophils by preventing complement deposition at the surface of the pathogen and by activating complement pathway conducting to the reduction of available complement for opsonization (63). Suilysin hampers complement fixation on *S. suis* (64) and may thus use the same

mechanisms that Fhb to interfere with neutrophil killing. A similar action has been described for pneumolysin, a suliyisin-related toxin produced by *S. pneumoniae* (65). Besides interfering with complement, suliyisin may also use other strategies to prevent neutrophil action. A direct interference with internalization is unlikely as depicted by the resistance of well encapsulated  $\Delta sly$  mutant (49). However, suliyisin may inhibit migration of neutrophils to infection sites similarly to pneumolysin (66). In this regard, a surface-associated subtilisin-like protease (SspA) induces degradation of CXCL8 produced by BMECs and has been suggested to be a mechanism used by *S. suis* to invade CNS by affecting the recruitment of neutrophils to the site of inflammation (67).

Finally, numerous studies have proven that *S. suis* uses several stratagems to resist against antimicrobial polypeptides of neutrophils. *In vitro* experiments have demonstrated that the aforementioned modifications of the cell wall components (PG *N*-deacetylation and LTA D-alanylation) may be strategies used by *S. suis* to evade antimicrobial molecules of neutrophils (22, 33). Both  $\Delta pgdA$  and  $\Delta dltA$  mutant strains present a higher *in vitro* sensibility to killing by porcine neutrophils (22, 33). In addition, the *pgdA* gene is upregulated upon *in vitro* interaction with these cells (22). If cell wall modifications exert resistance against intra- or extracellular killing by antimicrobial molecules remains ignored. In addition, a work investigating the activity of porcine neutrophilic secretions, containing lactoferrin and cathelicidin, against different bacterial pathogens of swine indicates a significantly lower bactericidal action against *S. suis* in comparison with *Escherichia coli* or *Actinobacillus suis* (44). Thus, *S. suis* may preferentially impede extracellular activities of antimicrobial molecules, for example in the context of neutrophil extracellular traps (NETs) formation. NETs are extracellular fibers of DNA with embedded antimicrobial molecules and proteases released by activated neutrophils that trapped and killed microbes. Even if *S. suis* can be entrapped by NETs formed by activated human neutrophils, a DNA-nuclease Ssna is able to disrupt the structure and protect bacteria against the extracellular antimicrobial activity of those NETs (68). It is not actually known if additional factors expressed or secreted by *S. suis* interact with the entrapment and/or killing by NETs. Resistance of  $\Delta pgdA$  and  $\Delta dltA$  strains against NETs-mediated antimicrobial activity warrants examinations. Finally, a cell wall anchored adenosine synthase expressed by *S. suis* serotype 2 has recently been identified as a factor impairing degranulation and oxidative activities of human neutrophils, and a mutant strain deficient in this enzyme presents a diminished virulence in a pig infection model (69).

Receptors participating in *S. suis* interaction with neutrophils have not been characterized, but pattern recognition receptors (PRRs) such as Toll-like receptors (TLRs), lectins and complement receptor (CR) are potential candidates (70, 71). The lectin site of CR3 (72) and sialic acid-recognizing Ig superfamily lectin (Siglec)-9 of human neutrophils are engaged in GBS CPS recognition and may thus also be receptors for *S. suis* CPS, as both molecules share very similar structure and composition (53). Interestingly, recognition of sialic acid of GBS CPS by Siglec-9 dampens neutrophil killing functions such as degranulation, oxidative burst, NETs formation and promotes up-regulation of the expression of the inhibitory cytokine IL-10 (73). Studies on the interactions between sialic acid-expressing *S. suis* CPS with neutrophil Siglecs would be pertinent.

## 2. Interactions with macrophages and role of pattern recognition receptors

Concomitantly to the efflux of neutrophils, the exposure of pigs and/or mice to *S. suis* is followed by the recruitment of macrophages in infection sites such as tonsillar MALT (9, 38) and meningeal lesions (3, 24). This macrophage enrollment plays an ambiguous role in *S. suis* infection, since it may protect host by preventing the entry of pathogen in blood and brain, but can also be diverted by the bacteria to allow dissemination in the infected organism. In addition, *S. suis* infection is associated with an uncontrolled production of inflammatory mediators and macrophages are mainly present in the inflammatory exudates.

*In vitro* interaction assays between *S. suis* serotype 2 and mouse macrophages indicate that bacteria remain mainly extracellular bound to the plasma membrane and protrusions of the cell surface (74). Sialic acid of CPS may be partially engaged in this adherence, yet other bacterial molecules might be also involved (74). Considering that receptors implicated in *S. suis* binding on macrophages have not been well identified, Siglec engagement is worth to be investigated. The presence of suilysin is correlated with high cytotoxicity towards macrophages and suilysin-positive strains may thus use macrophage destruction for evasion of host immune clearance and dissemination, in contrast to suilysin-negative strains which may use macrophage-association mediated dissemination (74). The presence of serum increased bacterial adhesion to macrophages. Complement, would be partially implicated in the serum-enhanced binding of *S. suis* to these cells (74). Yet, other undefined factors, such as fibronectin, might also contribute to the interactions between *S. suis* and macrophages.

The low internalization rate of *S. suis* serotype 2 by mouse and/or porcine monocytes and macrophages is explained by the antiphagocytic properties of CPS (75-78). Remarkably, *S. suis* CPS does not act simply as an inert physical barrier against macrophages, but as an active modulator of the phagocytic signaling machinery of these phagocytic cells. Experiments using latex beads covalently linked with purified *S. suis* CPS or non-encapsulated mutant strains have demonstrated that CPS adherence to mouse macrophages induces the destabilization of lipid microdomains at the cell surface preventing lactosylceramide (LacCer) accumulation at the phagocytic cup known to act as a PRRs (79). This results in a blockade of downstream intracellular signaling pathways involved in phagocytosis such as inhibition of kinase activation, including phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K), Akt and protein kinase C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ), by recruiting, at least in part, SH2 domain-containing tyrosine phosphatases (80). It would be relevant to evaluate if the recruitment of others PRRs at the LacCer signaling platform such as CR3, known to be implicated in the phagocytosis of non-opsonized particules (81), is also inhibited by *S. suis* CPS. Finally, it is important to note that the few internalized bacteria do not survive inside cells (75). Thus under non-opsonizing conditions, *S. suis* likely remains preferentially extracellular throughout infection, either free in circulation or associated, but not ingested, to the surface of macrophages as stipulated by the modified Trojan horse theory (82).

Similarly that what is observed during interaction with neutrophils, *S. suis* is still able to resist against the bactericidal activity of porcine macrophages under opsonizing conditions with complete naïve serum (49). Whereas suilysin is involved in bacterial resistance to complement-mediated killing by macrophages (49), the role of CPS has not been clearly examined. Likewise, the influence of complement opsonization on *S. suis* internalization by macrophages awaits further studies.

As described above, *S. suis* disease is characterized by an exacerbated inflammatory response which may be responsible for the clinical septic shock associated to septicemia as well as for the increase in the permeability of BBB with subsequent development of meningitis. However, at which stages of *S. suis* infection occurs the initiation of production of these mediators is still largely unidentified. *S. suis* serotype 2 induces significant release of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) and chemokines (CXCL8, CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10, CXCL2/MIP-2 $\alpha$ ) by mouse and/or human monocytes and macrophages in a dose and time-dependent fashion (78, 83-85)(unpublished observations). Bacterial internalization is not required for the ability of *S. suis* to induce cytokine release by mouse macrophages and thus the initial



attachment of bacteria to cells may be sufficient to generate a signal for cytokine induction (83). Studies of the interaction between purified *S. suis* components and human or mouse monocytes/macrophages have established that cell wall components of *S. suis* are mainly involved in cytokine and chemokine production (83, 85). This is in agreement with the global higher secretion of these molecules by mouse and/or human monocytes and macrophages incubated with non-encapsulated strains (78, 85). Interestingly, hemoglobin, which may be released by the action of *S. suis* suilysin on red blood cells, acts in synergy with *S. suis* cell wall to increase the inflammatory response of human macrophages (86). Purified CPS solely stimulates the secretion of CCL2, which explains the diminished production of this chemokine by monocytes and macrophages incubated with the non-encapsulated mutants. Other factors can also contribute to macrophage inflammation such as a surface-associated peptidase AbpB (87) and SspA, which presents a concentration-dependent modulation of the inflammation state (88). Suilysin, besides its cytotoxicity effect (74), also induces TNF- $\alpha$  and IL-6 secretion by human and porcine monocytes and/or macrophages (89). Both mitogen-activated protein kinase (MAPK) and NF- $\kappa$ B signal transduction pathways are activated and involved in the proinflammatory response observed after *S. suis* interaction with porcine, mouse and/or human macrophages (78, 86, 90).

Cytokine production by human monocytes and mouse macrophages cultured with whole *S. suis* and purified cell wall components is strongly TLR2-dependent (85). Cell wall associated lipoproteins may be implicated in TLR2-dependent recognition by macrophages, as they have been suspected to be recognized by human TLR2/6 complex (91). In addition, CD14 also participates in cytokine secretion by *S. suis*-stimulated monocytes and the region that interacts with the bacteria could be similar to the LPS-binding site (84). By contrast, chemokine production is less stringently dependent of TLR2 and CD14 expression and may result of the engagement of multiple receptor pathways. CCL2 secretion is part of a pro-inflammatory cascade where TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  cytokines are produced early and modulate secretion of downstream chemokines (84). The incomplete inhibition of this chemokine production by MyD88<sup>-/-</sup> mouse macrophages incubated with whole *S. suis* suggests that a third pathway, which is TLR-independent, is involved in chemokine production. This is confirmed by similar CCL2 secretion levels by WT or MyD88<sup>-/-</sup> mouse macrophages stimulated with purified CPS.

Beside cytokine and chemokine production, *S. suis* induces the liberation of other inflammatory mediators by macrophages, which are susceptible to participate in

the physiopathology of *S. suis*-induced disease. CPS and cell wall components of *S. suis* synergistically induce the release of prostaglandin E2 (PGE2) and matrix metalloproteinase 9 by human macrophages (92). Interestingly, in addition to cause BBB permeability, PGE2 also interferes with the maturation and survival of B and T lymphocytes and could be another subterfuge of *S. suis* to escape from the host immunity. Finally, *S. suis*-infected mouse macrophages produce NO (78, 79), known to participate in bactericidal functions (93).

Once *S. suis* gains access to the CNS, the bacteria interact with meningeal and perivascular macrophages and with microglia, the macrophage-like population within the brain (3, 78). Two studies have demonstrated that *S. suis* induces the release of TNF- $\alpha$ , CCL2, CXCL10, IL-1 $\beta$ , and IL-6 and enhances TLR2 and NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2) expression by murine microglial cells *in vitro* (78, 94). In addition, these studies reported enhanced expression or activation levels of phosphotyrosine, PKC, different MAPK signaling events and transcription factors, overall indicating the high capacity of *S. suis* to activate microglial cells. As shown with other phagocytes, CPS also contributes to *S. suis* resistance to microglia phagocytosis and regulated the inflammatory response by hiding proinflammatory components from the bacterial cell wall, while the absence of hemolysin did not have a major impact on *S. suis* interactions with microglia (78). *S. suis*-infected microglia produce NO (78, 79), known to be implicated in brain damage beyond participating in bactericidal functions (93).

### ***S. suis* interactions with professional antigen-presenting cells: the dendritic cells**

DCs exist in all lymphoid and non-lymphoid organs and are amongst the first responders to infection at the mucosal surface. In steady state conditions, mucosal DCs are continually replenished through the influx of committed DCs, as well as the local differentiation of DC precursors and immigrating monocytes. Immature DCs have a sentinel role in capturing antigens but after encountering microorganisms, DCs are activated and undergo a complex maturation process characterized by the up-regulation of co-stimulatory molecules and the production of pro-inflammatory mediators. Mature DCs migrate to the adjacent lymphoid organs where they can induce antigen-specific T and B cell responses. In this respect, DCs are the most important professional antigen-presenting cells (APCs) and express 10 to 100 fold more MHC molecules than monocytes or macrophages (95, 96). Thus, DCs represent an essential

link between the innate and adaptive immunity and interactions between DCs and microorganisms, such as *S. suis* serotype 2, strongly influence the outcome of a disease.

*In vitro* bactericidal and phagocytosis assays combined with confocal and electron microscopy have established that under non-opsonic conditions, *S. suis* possesses a relatively high resistance to phagocytosis by mouse, porcine and/or human DCs (99-101, unpublished observations). Those internalized bacteria are destroyed in a time-dependent manner (97-99). However, the levels of phagocytosis and intracellular survival of *S. suis* type 2 are higher in human monocyte-derived DCs than in porcine bone marrow-derived DCs (97, 99). This may be due to the use of different strains and/or differences in the phagocytosis/killing capacity between the two DC types. Interestingly, *S. suis* can still be recovered, albeit at very low numbers, from the intracellular compartment of human DCs 24 h post-incubation. As DCs traffic from the mucosa to the lymphoid tissues via bloodstream, even such reduced intracellular persistence may enable the bacteria to rapidly disseminate in the human body (99).

Mechanisms of *S. suis* resistance to phagocytosis/killing by DCs remain largely unexplored. Non-encapsulated mutant strains are readily internalized by cells independently of the presence of complete serum (97, 98). Thus, CPS may actively interfere with the phagocytic signaling machinery of those cells, similarly to what is observed during interaction of the bacteria with macrophages (79). Indeed, beads covalently linked with purified *S. suis* CPS were sufficient to block the internalization of uncoated latex beads by mouse DCs (79). Yet, if internalized, bacteria are easily destroyed and the presence/absence of CPS does not influence the rate or the kinetics of this intracellular killing (97, 99) Whereas CPS inhibits complement deposition at the bacterial surface, sullysin and cell wall modifications, including PG *N*-deacetylation and LTA D-alanylation, are also crucial to fully protect bacteria against complement-mediated opsonophagocytosis and killing (98).

*S. suis* induces production of both cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IL-23, IL-10) and chemokines (CXCL8, CCL2, CXCL1/KC, CXCL9/MIG, CXCL10) by mouse, porcine and/or human DCs (97-99). As for macrophages, cell wall components may be mainly involved in this immunostimulatory activity, as non-encapsulated mutant strains (in which absence of CPS unmasks molecules of the underlying subcapsular domain), globally induce significantly higher levels of secretion of cytokines/chemokines by DCs (97-99). However, inflammatory properties of purified

cell wall components exerted on DCs have not been evaluated. Interestingly, cell wall modifications play a partial role in the activating capacity of *S. suis* as shown by the impaired secretion of some cytokines by mouse DCs stimulated with  $\Delta pgdA$  and  $\Delta dltA$  mutants.

Similarly to what is observed with macrophages, CPS promotes chemokine production by DCs, as shown by production of CCL2 and CCL3 after *in vitro* stimulation of mouse origin cells with purified *S. suis* serotypes 2 and 14 CPSs. However, CPS is mainly a poor immunogenic molecule and no other cytokine is detected in the supernatant of CPS-stimulated DCs (100). Whereas sialic acid is suspected to contribute in immune evasion (54-56, 58, 73, 101), purified native and chemically desialylated CPSs of *S. suis* do not show difference in the ability to stimulate mouse DCs (100).

Cytokines produced by activated DCs have a major influence on T cell polarization, differentiation and clonal expansion. IL-12 is a pro-inflammatory cytokine that promotes T helper (Th) 1 cell responses, whereas IL-10 is an anti-inflammatory cytokine orienting Th2 cells or regulatory T cells responses depending on the expression of other tolerizing factors. A recent study comparing the interaction of different serotypes of *S. suis* with human DCs demonstrated that serotype 2 is the least effective serotype at inducing cytokine production by these cells and causes the highest IL-10/IL-12 ratio (99). This higher propensity to down-regulate the host cell-mediated response can be connected to the fact that serotype 2 is the most commonly associated with invasive disease in pigs and humans.

TLRs have been demonstrated to be involved in interaction between *S. suis* and DCs. First, bacteria induce the expression of TLR2 and TLR6 by porcine DCs. In addition, the release of cytokines and chemokines by *S. suis*-stimulated mouse DCs is partially TLR2-dependent, and these secretions are dramatically abrogated in the absence of MyD88 molecules. TLR4, TLR9 and NOD2 are only marginally engaged in this inflammatory process (102). The *S. suis* constituents whose interaction with TLRs of DCs results in cytokine/chemokine production have not been precisely identified, but cell wall components are likely to be candidates. In addition, *S. suis* serotype 2 CPS induces production of CCL3 via partially TLR2 and MyD88-dependent pathways, and CCL2, via TLR-independent mechanisms. This results suggest that others receptors, such as members of the large family of lectin receptors, may be involved in the inflammatory process following DC interaction with CPS and/or whole *S. suis* (100).

*S. suis* stimulation results in an increase in surface expression of co-stimulatory molecules by mouse (CD40, CD86 and MHC-II), human (CD83 and CD86) and porcine (MHC-II and CD80/86) DCs. No specific role can be attributed to any of *S. suis* components in this activation, but CPS expression blunts human and porcine DC maturation (98, 99, 102). Once again, serotype 2 is the least effective serotype at inducing human DC maturation in comparison with serotypes 1, 7 and 9. It can be hypothesized that CPS thickness/composition may play a role in the observed differences. In addition, a role of unknown virulence factors differently expressed among serotypes cannot be ruled out. CD86 and MHC-II up-regulation is partially TLR2-dependent, whereas CD40 up-expression is diminished in DCs which have a dual deficiency in TLR2 and TLR9. Neither TLR4 nor NOD2 is implicated in the regulation of the above mentioned co-stimulatory molecules (102).

Overall, *S. suis* uses several strategies to impair phagocytosis ability, maturation and activation of DCs, which may result in reduced antigen processing and T and B cell activation. The consequences of this subversion of DC functions on the development of adaptive immune responses against *S. suis* need to be explored.

### **Humoral immunity, antigenic and immunogenic molecules**

Adaptive immunity to extracellular bacteria is mediated largely by humoral response (103, 104). A good vaccine candidate against such bacteria must be an antigenic molecule that must be recognized and must interact with the host immune system, including T and B cell surface receptors and, consequently, with secreted antibodies (Abs). Thus, surface-exposed, highly expressed and widely distributed antigens are good targets for vaccine development. In addition, it has to be an immunogenic molecule able to induce a protective host humoral immune response. Indeed, albeit *S. suis* is highly resistant to *in vitro* complement-mediated killing by professional phagocytes, addition of specific Abs promotes *in vitro* opsonophagocytosis/killing of bacteria by mouse and/or pig monocytes and neutrophils (49, 105-107). Interestingly, the protective contribution of Abs in *S. suis* killing by porcine neutrophils is observed only in the presence of complete- but not heat inactivated-serum, suggesting a synergic role of complement and/or other heat-sensitive molecules with Abs (unpublished observations). Abs directed to capsular (106-108) and non-capsular antigens (105, 109) may be involved in the protection. Thus, reported data highlight a crucial role of specific humoral response in host defense against *S. suis*.

Induction of the appropriate type of antigen-specific immune responses is crucial for the success of vaccines. The Ig classes produced as a consequence of immunization reflects the type of immune responses. The efficacy of protection of the different Ig classes depends on the specificity and affinity with the targeted antigen and on their biological functions. In mice, IgG2b, IgG2c and IgG3, called “type 1 IgG subclasses” because they are associated with IFN- $\gamma$ -dominant Th1 immune responses, are particularly effective at mediating bacterial lysis by triggering the complement cascade directly at the surface of the pathogen or by favoring bacterial opsonophagocytosis. In contrast, IgG1 (called “type 2 IgG subclass”) elicited during IL-4-dominant Th2 immune responses, usually has a less protective potential. Although the concept of “type 1” or “type 2” IgG subclasses is not well documented for pigs, recent studies have showed that porcine IgG2 had greater complement-activating capacity than IgG1. It has been suggested that swine IgG2 Abs directed against a surface protein might be more effective in directed *S. suis* opsonophagocytosis than the swine IgG1 subclass (109). Yet, this remains to be fully elucidated. Indeed, information of the adaptive immune response, including the role of T and B cells, generated during *S. suis* infection is almost inexistent. A recent study provided some insights into this neglected area of *S. suis* research (110). The features of CPS-specific versus protein-specific Ab responses during experimental infections with live virulent *S. suis* type 2 in mice and pigs were studied for the first time. In mice, the primary protein-specific Ab response to *S. suis* type 2 showed typical features of a T cell-dependent response that was dominated by both type 1 and 2 IgG subclasses, whereas IgM titers were more modest. The secondary protein-specific Ab response showed features of a memory response with faster kinetics and boosted titers of all Ig isotypes. The swine primary protein-specific response was mainly composed of both IgG1 and IgG2 subclasses, indicating a clear isotype switching and a mixed Th1/Th2 response, as observed in mice (110). Yet, induced primary Ab titers are lower in infected pigs when compared to those obtained in mice. This finding might be related to the use of an outbred large animal model vs. an inbred small animal model. The memory protein-specific Ab response against *S. suis* infection has never been evaluated in pigs. At the opposite end of the protein-specific response, the CPS-specific Ab response to *S. suis* type 2 showed features of a T cell-independent response. The primary CPS-specific Ab response is almost nonexistent and only a modest memory anti-CPS response is observed in *S. suis*-infected mice and pigs (110, 111). No isotype switching is observed, and thus this response is essentially composed of anti-CPS IgM class (110). Remarkably, purified CPS exerts immunosuppressive

effects on mouse DC activation, as a diminution of IFN- $\gamma$ -induced B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) expression is observed in CPS-pretreated cells. This could impact in the development of the ongoing specific humoral response given that BAFF cytokine is involved in B cell proliferation, Ig class switching and Ig secretion (112, 113). Finally, and in spite of the importance of TLR2 in the innate inflammatory response, it does not seem to influence the humoral adaptive immunity against *S. suis* type 2 CPS or proteins (110).

Interestingly, experimentally infected, convalescent mice and pigs show better resistance to reinfection with the same strain of *S. suis* type 2 (110, 111). Yet the relative contribution of anti-protein Abs, anti-CPS Abs, cellular immunity or other immunological factors to host resistance to reinfection has never been evaluated. This is particularly important in pigs, in which the overall Ab response is very low (110).

Besides the paucity on our basic knowledge about *S. suis*-induced adaptive immune responses, the development of a good vaccine against *S. suis* is mainly hampered by the high genotypic and phenotypic diversity of strains and serotypes that cause disease in different parts of the world (114). Various approaches to obtain an efficient vaccine against *S. suis* have been used (6). Vaccination with live virulent or avirulent strains of *S. suis* serotype 2 confers a good survival rate to an homologous challenge in piglets. However, the effect is dependent on repeated immunizations and the introduction a live strains into a herd is always at risk (115-117).

Vaccines used in the field are commercial or autogenous whole cell killed bacterins and are considered to offer poor protection (6). A very few experiments carried out on piglets have demonstrated a relatively good protection for animals vaccinated with *S. suis* serotype 2 bacterins against homologous challenge in terms of mortality and morbidity (106, 118, 119). The difference in the used adjuvants (120, 121) and employed method to inactivate bacteria (119, 121) can explain some inconsistent results about the efficiency of *S. suis* serotype 2 bacterins. Whereas the above immunization studies have been done on weaning piglets, only two works have evaluated the effectiveness of vaccination of preparturient sows on their progeny against a homologous challenge. The first study has established that *S. suis* serotype 14 bacterin confers no statistically significant reduction in mortality and morbidity of the progeny of vaccinated sows (122). The second study showed that the immunization of preparturient sows with *S. suis* type 2 bacterin induces the development of an humoral immune response composed of opsonizing Abs (123). The partial protection observed in piglets from vaccinated sows suggests the participation of the passive maternal

immunity. However, a strong inhibitory effect of maternal Abs on active immunization of suckling and weaning piglets is responsible for a susceptibility of growers to bacterial challenge. This work encourages the revision of the *S. suis* vaccination schedule of herds where bacterins are applied to both preparturient sows and piglets (123).

In several European countries, *S. suis* serotype 9 is now predominantly isolated from clinical cases in pigs. The attempt to get a cross-protection in piglets against a serotype 9 strain after vaccination with a serotype 2 bacterin was found to be unsuccessful (106). In addition, the immunization with a serotype 9 bacterin followed by a homologous challenge reveals no protective efficacy on morbidity, colonization or transmission among piglets (124, 125). In both cases, the absence of protection is correlated with the absence or the low rates of opsonizing Abs against the challenge strain. The mechanisms responsible for potency differences between serotypes 2 and 9 bacterins in protection against homologous challenge remain obscure.

One disadvantage of vaccination with bacterins may be the presence of some components in whole-cell vaccine inducing a dominant but non-protective humoral response. Thus, another vaccine strategy is the use of subunit vaccines. An extensive list of antigenic or immunogenic *S. suis* molecules has been reported (1, 2) and most of them has been discovered through immunoproteomics studies using sera from immunized and/or infected animals and humans (126-131). Several of them have been proposed as vaccine candidates, some has been tested only using *in vitro* opsonophagocytosis test and others have been evaluating only on their immunogenic capacity (i.e. Ab production) (126, 127, 130, 132, 133). Few has been tested in mouse models (87, 105, 109, 134-137), and/or in pig models of protection (105, 109, 120, 137-139). Yet, their actual potential and feasibility using vaccine formulations compatible with in vigor regulations remain to be evaluated. For example, several of those immunization studies have used complete Freund's Adjuvant (CFA) (87, 134, 135, 139), known to be highly toxic. Indeed, the use of CFA has been limited to the research production of Abs because the adverse reactions to the adjuvant have prevented its licensure in the United States for either human or veterinary medicine. Even for animal research there are currently guidelines associated with its use, due to its painful reaction and tissue damage (140).

As aforementioned, several new antigenic cell-wall associated proteins, membrane-associated proteins, or secreted proteins of *S. suis* serotypes 2 and 9 have recently been identified by immunoproteomic studies (126-131). In addition, the “pan-surfome” analysis, consisting of a protease treatment of lived bacteria followed by a liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) analysis of



the generated peptides, has allowed to identify a set of surface proteins common to the most prevalent serotypes of *S. suis* in Europe (132). Among the most frequently evaluated subunit vaccine candidates, administration of recombinant suilysin (138), surface antigen one (Sao) (109), or MRP in combination with EF (120) was shown to confer a good protection to piglets against subsequent experimental infection with *S. suis* serotype 2 strains. Yet, a murein-associated protein fraction subunit vaccine composed of different surface-associated proteins, such as MRP and Sao, was shown to be unable in inducing cross-protection against serotypes 2 and 9 strains (106). As such, development of a *S. suis* vaccine with widespread coverage remains a challenge.

### **Acknowledgements**

This work was mainly supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through a grant to MS. Partial contribution was also provided by Canadian Institutes of Health Research grant to MS and MG.

## References

1. **Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M.** 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol* **7**:259-279.
2. **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.
3. **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.
4. **Dominguez-Punaro Mde L, Segura M, Radzioch D, Rivest S, Gottschalk M.** 2008. Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection. *Infect Immun* **76**:3901-3910.
5. **Kataoka Y, Haritani M, Mori M, Kishima M, Sugimoto C, Nakazawa M, Yamamoto K.** 1991. Experimental infections of mice and pigs with *Streptococcus suis* type 2. *J Vet Med Sci* **53**:1043-1049.
6. **Gottschalk M.** 2012. Streptococcosis, p. 841-855. *In* K. L. Zimmerman JJ, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (ed.), *Diseases of swine*, 10th ed. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, IA.
7. **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.
8. **Madsen LW, Bak H, Nielsen B, Jensen HE, Aalbaek B, Riising HJ.** 2002. Bacterial colonization and invasion in pigs experimentally exposed to *Streptococcus suis* serotype 2 in aerosol. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **49**:211-215.
9. **Salles MW, Perez-Casal J, Willson P, Middleton DM.** 2002. Changes in the leucocyte subpopulations of the palatine tonsillar crypt epithelium of pigs in response to *Streptococcus suis* type 2 infection. *Vet Immunol Immunopathol* **87**:51-63.
10. **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 suliyisin. *FEMS Immunol Med Microbiol* **26**:25-35.
11. **Ferrando ML, Fuentes S, de Greeff A, Smith H, Wells JM.** 2010. ApuA, a multifunctional  $\alpha$ -glucan-degrading enzyme of *Streptococcus suis*, mediates adhesion to porcine epithelium and mucus. *Microbiology* **156**:2818-2828.
12. **Lalonde M, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M.** 2000. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology* **146**:1913-1921.
13. **Wang Y, Gagnon CA, Savard C, Music N, Srednik M, Segura M, Lachance C, Bellehumeur C, Gottschalk M.** 2013. Capsular sialic acid of *Streptococcus suis* serotype 2 binds to swine influenza virus and enhances bacterial interactions with virus-infected tracheal epithelial cells. *Infect Immun.* **81**:4498-508.
14. **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.
15. **Seitz M, Baums CG, Neis C, Benga L, Fulde M, Rohde M, Goethe R, Valentin-Weigand P.** 2013. Subcytolytic effects of suliyisin on interaction of *Streptococcus suis* with epithelial cells. *Vet Microbiol* **167**:584-591.
16. **Ferrando ML, van Baarlen P, Orru G, Piga R, Bongers RS, Wels M, De Greeff A, Smith HE, Wells JM.** 2014. Carbohydrate availability regulates virulence gene expression in *Streptococcus suis*. *PLoS One* **9**:e89334.
17. **Swildens B, Stockhofe-Zurwieden N, van der Meulen J, Wisselink HJ, Nielsen M, Niewold TA.** 2004. Intestinal translocation of *Streptococcus suis* type 2 EF<sup>+</sup> in pigs. *Vet Microbiol* **103**:29-33.
18. **Ferrando ML, de Greeff A, van Rooijen WJ, Stockhofe-Zurwieden N, Nielsen J, Wichgers Schreur PJ, Pannekoek Y, Heuvelink A, van der Ende A, Smith H, Schultsz C.** 2015. Host-pathogen interaction at the intestinal mucosa correlates with zoonotic potential of *Streptococcus suis*. *J Infect Dis.* **212**:95-105.

19. **Ryu JH, Kim CH, Yoon JH.** 2010. Innate immune responses of the airway epithelium. *Mol Cells* **30**:173-183.
20. **Oswald IP.** 2006. Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. *Vet Res* **37**:359-368.
21. **DeBey MC, Jacobson CD, Ross RF.** 1992. Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* **53**:1705-1710.
22. **Fittipaldi N, Sekizaki T, Takamatsu D, de la Cruz Dominguez-Punaro M, 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.
23. **Wichgers Schreur PJ, van Weeghel C, Rebel JM, Smits MA, van Putten JP, Smith HE.** 2012. Lysozyme resistance in *Streptococcus suis* is highly variable and multifactorial. *PLoS One* **7**:e36281.
24. **Beineke A, Bennecke K, Neis C, Schroder C, Waldmann KH, Baumgartner W, Valentin-Weigand P, Baums CG.** 2008. Comparative evaluation of virulence and pathology of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9 in experimentally infected growers. *Vet Microbiol* **128**:423-430.
25. **Davis KM, Akinbi HT, Standish AJ, Weiser JN.** 2008. Resistance to mucosal lysozyme compensates for the fitness deficit of peptidoglycan modifications by *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog* **4**:e1000241.
26. **Zhang G, Ross CR, Blecha F.** 2000. Porcine antimicrobial peptides: new prospects for ancient molecules of host defense. *Vet Res* **31**:277-296.
27. **Muller CA, Autenrieth IB, Peschel A.** 2005. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell Mol Life Sci* **62**:1297-1307.
28. **Peng Z, Wang A, Feng Q, Wang Z, Ivanova IV, He X, Zhang B, Song W.** 2014. High-level expression, purification and characterisation of porcine  $\beta$ -defensin 2 in *Pichia pastoris* and its potential as a cost-efficient growth promoter in porcine feed. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**:5487-5497.
29. **Veldhuizen EJ, Hendriks HG, Hogenkamp A, van Dijk A, Gaastra W, Tooten PC, Haagsman HP.** 2006. Differential regulation of porcine  $\beta$ -defensins 1 and 2 upon *Salmonella* infection in the intestinal epithelial cell line IPI-2I. *Vet Immunol Immunopathol* **114**:94-102.
30. **Kovacs M, Halfmann A, Fedtke I, Heintz M, Peschel A, Vollmer W, Hakenbeck R, Bruckner R.** 2006. A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **188**:5797-5805.
31. **Kristian SA, Datta V, Weidenmaier C, Kansal R, Fedtke I, Peschel A, Gallo RL, Nizet V.** 2005. D-alanylation of teichoic acids promotes group a *streptococcus* antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *J Bacteriol* **187**:6719-6725.
32. **Saar-Dover R, Bitler A, Nezer R, Shmuel-Galia L, Firon A, Shimoni E, Trieu-Cuot P, Shai Y.** 2012. D-alanylation of lipoteichoic acids confers resistance to cationic peptides in group B *streptococcus* by increasing the cell wall density. *PLoS Pathog* **8**:e1002891.
33. **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.
34. **Liebler-Tenorio EM, Pabst R.** 2006. MALT structure and function in farm animals. *Veterinary Research* **37**:257-280.
35. **Sato S, Kiyono H.** 2012. The mucosal immune system of the respiratory tract. *Curr Opin Virol* **2**:225-232.
36. **Fagarasan S, Honjo T.** 2003. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* **3**:63-72.
37. **Williams DM, Lawson GH, Rowland AC.** 1973. Streptococcal infection in piglets: the palatine tonsils as portals of entry for *Streptococcus suis*. *Res Vet Sci* **15**:352-362.
38. **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.

39. **Kilian M, Reinholdt J, Lomholt H, Poulsen K, Frandsen EV.** 1996. Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *APMIS* **104**:321-338.
40. **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.
41. **Zhang A, Mu X, Chen B, Han L, Chen H, Jin M.** 2011. IgA1 protease contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* **148**:436-439.
42. **Silva MT.** 2010. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol* **87**:93-106.
43. **Silva MT, Correia-Neves M.** 2012. Neutrophils and macrophages: the main partners of phagocyte cell systems. *Front Immunol* **3**:174.
44. **Scapinello S, Brooks AS, MacInnes JI, Hammermueller J, Clark ME, Caswell JL.** 2011. Bactericidal activity of porcine neutrophil secretions. *Vet Immunol Immunopathol* **139**:113-118.
45. **Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A.** 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**:1532-1535.
46. **Smith JA.** 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* **56**:672-686.
47. **Lun ZR, Wang QP, Chen XG, Li AX, Zhu XQ.** 2007. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis* **7**:201-209.
48. **Sanford SE.** 1987. Gross and histopathological findings in unusual lesions caused by *Streptococcus suis* in pigs. II. Central nervous system lesions. *Can J Vet Res* **51**:486-489.
49. **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.
50. **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.
51. **Quessy S, Dubreuil JD, Jacques M, Malouin F, Higgins R.** 1994. Increase of capsular material thickness following *in vivo* growth of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains. *FEMS Microbiol Lett* **115**:19-26.
52. **Salasia SI, Lammler C, Herrmann G.** 1995. Properties of a *Streptococcus suis* isolate of serotype 2 and two capsular mutants. *Vet Microbiol* **45**:151-156.
53. **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.
54. **Edwards MS, Kasper DL, Jennings HJ, Baker CJ, Nicholson-Weller A.** 1982. Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B *streptococci*. *J Immunol* **128**:1278-1283.
55. **Wessels MR, Rubens CE, Benedi VJ, Kasper DL.** 1989. Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:8983-8987.
56. **Marques MB, Kasper DL, Pangburn MK, Wessels MR.** 1992. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B *streptococci*. *Infect Immun* **60**:3986-3993.
57. **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.
58. **Crocker PR, Paulson JC, Varki A.** 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* **7**:255-266.
59. **Jones A, Georg M, Maudsdotter L, Jonsson AB.** 2009. Endotoxin, capsule, and bacterial attachment contribute to *Neisseria meningitidis* resistance to the human antimicrobial peptide LL-37. *J Bacteriol* **191**:3861-3868.
60. **Campbell JR, Edwards MS.** 2000. Cytokines enhance opsonophagocytosis of type III group B *Streptococcus*. *J Perinatol* **20**:225-230.

61. **Rainard P, Riollot C, Poutrel B, Paape MJ.** 2000. Phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by bovine neutrophils after priming by tumor necrosis factor- $\alpha$  and the des-arginine derivative of C5a. *Am J Vet Res* **61**:951-959.
62. **Kettritz R, Choi M, Rolle S, Wellner M, Luft FC.** 2004. Integrins and cytokines activate nuclear transcription factor- $\kappa$ B in human neutrophils. *J Biol Chem* **279**:2657-2665.
63. **Pian Y, Gan S, Wang S, Guo J, Wang P, Zheng Y, Cai X, Jiang Y, Yuan Y.** 2012. Fhb, a novel factor H-binding surface protein, contributes to the antiphagocytic ability and virulence of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* **80**:2402-2413.
64. **Seitz M, Beineke A, Singpiel A, Willenborg J, Dutow P, Goethe R, Valentin-Weigand P, Klos A, Baums CG.** 2014. Role of capsule and sullysin in mucosal infection of complement-deficient mice with *Streptococcus suis*. *Infect Immun* **82**:2460-2471.
65. **Yuste J, Botto M, Paton JC, Holden DW, Brown JS.** 2005. Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. *J Immunol* **175**:1813-1819.
66. **Paton JC, Rowan-Kelly B, Ferrante A.** 1984. Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect Immun* **43**:1085-1087.
67. **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.
68. **de Buhr N, Neumann A, Jerjomiceva N, von Kockritz-Blickwede M, Baums CG.** 2014. *Streptococcus suis* DNase SsnA contributes to degradation of NETs and evasion of NET-mediated antimicrobial activity. *Microbiology* **160**:385-95.
69. **Liu P, Pian Y, Li X, Liu R, Xie W, Zhang C, Zheng Y, Jiang Y, Yuan Y.** 2014. *Streptococcus suis* adenosine synthase functions as an effector in evasion of PMN-mediated innate immunity. *J Infect Dis* **210**:35-45.
70. **Thomas CJ, Schroder K.** 2013. Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol* **34**:317-328.
71. **Lee WL, Harrison RE, Grinstein S.** 2003. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect* **5**:1299-1306.
72. **Albanyan EA, Edwards MS.** 2000. Lectin site interaction with capsular polysaccharide mediates nonimmune phagocytosis of type III group B *streptococci*. *Infect Immun* **68**:5794-5802.
73. **Carlin AF, Uchiyama S, Chang YC, Lewis AL, Nizet V, Varki A.** 2009. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood* **113**:3333-3336.
74. **Segura M, Gottschalk M.** 2002. *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity. *Infect Immun* **70**:4312-4322.
75. **Segura MA, Cleroux P, Gottschalk M.** 1998. *Streptococcus suis* and group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**:189-195.
76. **Brazeau C, Gottschalk M, Vincelette S, Martineau-Doize B.** 1996. *In vitro* phagocytosis and survival of *Streptococcus suis* capsular type 2 inside murine macrophages. *Microbiology* **142**:1231-1237.
77. **Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S, Gottschalk M.** 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* **144**:325-332.
78. **Dominguez-Punaro Mde 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.
79. **Houde M, Gottschalk M, Gagnon F, Van Calsteren MR, Segura M.** 2012. *Streptococcus suis* capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition. *Infect Immun* **80**:506-517.
80. **Segura M, Gottschalk M, Olivier M.** 2004. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infect Immun* **72**:5322-5330.
81. **Nakayama H, Yoshizaki F, Prinetti A, Sonnino S, Mauri L, Takamori K, Ogawa H, Iwabuchi K.** 2008. Lyn-coupled LacCer-enriched lipid rafts are required for CD11b/CD18-mediated neutrophil phagocytosis of nonopsonized microorganisms. *J Leukoc Biol* **83**:728-741.

82. **Gottschalk M, Segura M.** 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* **76**:259-272.
83. **Segura M, Stankova J, Gottschalk M.** 1999. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infect Immun* **67**:4646-4654.
84. **Segura M, Vadeboncoeur N, Gottschalk M.** 2002. CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. *Clin Exp Immunol* **127**:243-254.
85. **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.
86. **Tanabe S, Gottschalk M, Grenier D.** 2008. Hemoglobin and *Streptococcus suis* cell wall act in synergy to potentiate the inflammatory response of monocyte-derived macrophages. *Innate Immun* **14**:357-363.
87. **Huang K, Yuan Z, Li J, Zhang Q, Xu Z, Yan S, Zhang A, Jin M.** 2015. Identification and characterisation a surface-associated arginine peptidase in *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbiol Res* **170**:168-176.
88. **Bonifait L, Grenier D.** 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.
89. **Lun S, Perez-Casal J, Connor W, Willson PJ.** 2003. Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microb Pathog* **34**:27-37.
90. **de Greeff A, Benga L, Wichgers Schreur PJ, Valentin-Weigand P, Rebel JM, Smith HE.** 2010. Involvement of NF- $\kappa$ B and MAP-kinases in the transcriptional response of alveolar macrophages to *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* **141**:59-67.
91. **Wichgers Schreur PJ, Rebel JM, Smits MA, van Putten JP, Smith HE.** 2010. Differential activation of the Toll-like receptor 2/6 complex by lipoproteins of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9. *Vet Microbiol* **143**:363-370.
92. **Jobin MC, Gottschalk M, Grenier D.** 2006. Upregulation of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase 9 production by human macrophage-like cells: synergistic effect of capsular material and cell wall from *Streptococcus suis*. *Microb Pathog* **40**:29-34.
93. **Kim YS, Tauber MG.** 1996. Neurotoxicity of glia activated by gram-positive bacterial products depends on nitric oxide production. *Infect Immun* **64**:3148-3153.
94. **Zheng H, Punaro MC, Segura M, Lachance C, Rivest S, Xu J, Houde M, Gottschalk M.** 2011. Toll-like receptor 2 is partially involved in the activation of murine astrocytes by *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent of meningitis. *J Neuroimmunol* **234**:71-83.
95. **Inaba K.** 1997. Dendritic cells as antigen-presenting cells *in vivo*. *Immunol Cell Biol* **75**:206-208.
96. **Steinman RM.** 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**:271-296.
97. **Lecours MP, Segura M, Lachance C, Mussa T, Surprenant C, Montoya M, Gottschalk M.** 2011. Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. *Vet Res* **42**:72.
98. **Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, Segura M.** 2011. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis* **204**:919-929.
99. **Meijerink M, Ferrando ML, Lammers G, Taverne N, Smith HE, Wells JM.** 2012. Immunomodulatory effects of *Streptococcus suis* capsule type on human dendritic cell responses, phagocytosis and intracellular survival. *PLoS One* **7**:e35849.
100. **Calzas C, Goyette-Desjardins G, Lemire P, Gagnon F, Lachance C, Van Calsteren MR, Segura M.** 2013. Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* capsular polysaccharides induce chemokine production by dendritic cells via Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent and -independent pathways. *Infect Immun* **81**:3106-3118.
101. **Courtney AH, Puffer EB, Pontrello JK, Yang ZQ, Kiessling LL.** 2009. Sialylated multivalent antigens engage CD22 in trans and inhibit B cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:2500-2505.

102. **Lecours MP, Segura M, Fittipaldi N, Rivest S, Gottschalk M.** 2012. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS One* **7**:e44746.
103. **AlonsoDeVelasco E, Verheul AF, Verhoef J, Snippe H.** 1995. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev* **59**:591-603.
104. **Jones C.** 2005. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. *An Acad Bras Cienc* **77**:293-324.
105. **Zhang A, Chen B, Li R, Mu X, Han L, Zhou H, Chen H, Meilin J.** 2009. Identification of a surface protective antigen, HP0197 of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vaccine* **27**:5209-5213.
106. **Baums CG, Kock C, Beineke A, Bennecke K, Goethe R, Schroder C, Waldmann KH, Valentin-Weigand P.** 2009. *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9. *Clin Vaccine Immunol* **16**:200-208.
107. **Charland N, Jacques M, Lacouture S, Gottschalk M.** 1997. Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 1/2. *Microbiology* **143**:3607-3614.
108. **Elliott SD, Clifton-Hadley F, Tai J.** 1980. Streptococcal infection in young pigs. V. An immunogenic polysaccharide from *Streptococcus suis* type 2 with particular reference to vaccination against streptococcal meningitis in pigs. *J Hyg (Lond)* **85**:275-285.
109. **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.
110. **Calzas C, Lemire P, Auray G, Gerdtts V, Gottschalk M, Segura M.** 2015. Antibody response specific to the capsular polysaccharide is impaired in *Streptococcus suis* serotype 2-infected animals. *Infect Immun* **83**:441-453.
111. **del Campo Sepulveda EM, Altman E, Kobisch M, D'Allaire S, Gottschalk M.** 1996. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. *Vet Microbiol* **52**:113-125.
112. **Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A.** 2002. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol* **3**:822-829.
113. **Craxton A, Magaletti D, Ryan EJ, Clark EA.** 2003. Macrophage- and dendritic cell-dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF. *Blood* **101**:4464-4471.
114. **Goyette-Desjardins G, Auger JP, Xu J, Segura M, Gottschalk M.** 2014. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg Microbes Infect* **3**:e45.
115. **Holt ME, Enright MR, Alexander TJ.** 1988. Immunisation of pigs with live cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Res Vet Sci* **45**:349-352.
116. **Busque P, Higgins R, Caya F, Quessy S.** 1997. Immunization of pigs against *Streptococcus suis* serotype 2 infection using a live avirulent strain. *Can J Vet Res* **61**:275-279.
117. **Yao X, Li M, Wang J, Wang C, Hu D, Zheng F, Pan X, Tan Y, Zhao Y, Hu L, Tang J, Hu F.** 2015. Isolation and characterization of a native avirulent strain of *Streptococcus suis* serotype 2: a perspective for vaccine development. *Sci Rep* **5**:9835.
118. **Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Hilgers LA, Smith HE.** 2002. Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol* **84**:155-168.
119. **Holt ME, Enright MR, Alexander TJ.** 1990. Immunisation of pigs with killed cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Res Vet Sci* **48**:23-27.
120. **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.
121. **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.

122. **Amass SF, Stevenson GW, Vyverberg BD, Huxford TW, Knox KE, Grote LA.** 2000. Administration of a homologous bacterin to sows preparturient provided partial protection against streptococcosis in their weaned pigs. *Swine Health Prod* **8**:217-219.
123. **Baums CG, Bruggemann C, Kock C, Beineke A, Waldmann KH, Valentin-Weigand P.** 2010. Immunogenicity of an autogenous *Streptococcus suis* bacterin in preparturient sows and their piglets in relation to protection after weaning. *Clin Vaccine Immunol* **17**:1589-1597.
124. **Dekker CN, Bouma A, Daemen AJ, van Leengoed LA, Jonker FH, Wagenaar JA, Stegeman JA.** 2012. Homologous whole bacterin vaccination is not able to reduce *Streptococcus suis* serotype 9 strain 7997 transmission among pigs or colonization. *Vaccine* **30**:1379-1387.
125. **Buttner N, Beineke A, de Buhr N, Lilienthal S, Merkel J, Waldmann KH, Valentin-Weigand P, Baums CG.** 2012. *Streptococcus suis* serotype 9 bacterin immunogenicity and protective efficacy. *Vet Immunol Immunopathol* **146**:191-200.
126. **Geng H, Zhu L, Yuan Y, Zhang W, Li W, Wang J, Zheng Y, Wei K, Cao W, Wang H, Jiang Y.** 2008. Identification and characterization of novel immunogenic proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. *J Proteome Res* **7**:4132-4142.
127. **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.
128. **Wu Z, Zhang W, Lu C.** 2008. Comparative proteome analysis of secreted proteins of *Streptococcus suis* serotype 9 isolates from diseased and healthy pigs. *Microb Pathog* **45**:159-166.
129. **Wu Z, Zhang W, Lu C.** 2008. Immunoproteomic assay of surface proteins of *Streptococcus suis* serotype 9. *FEMS Immunol Med Microbiol* **53**:52-59.
130. **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.
131. **Zhang W, Lu CP.** 2007. Immunoproteomic assay of membrane-associated proteins of *Streptococcus suis* type 2 China vaccine strain HA9801. *Zoonoses Public Health* **54**:253-259.
132. **Gomez-Gascon L, Luque I, Olaya-Abril A, Jimenez-Munguia I, Orbegozo-Medina RA, Peralbo E, Tarradas C, Rodriguez-Ortega MJ.** 2012. Exploring the pan-surfome of *Streptococcus suis*: looking for common protein antigens. *J Proteomics* **75**:5654-5666.
133. **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.
134. **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.
135. **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.
136. **Chen B, Zhang A, Li R, Mu X, He H, Chen H, Jin M.** 2010. Evaluation of the protective efficacy of a newly identified immunogenic protein, HP0272, of *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett* **307**:12-18.
137. **Li J, Xia J, Tan C, Zhou Y, Wang Y, Zheng C, Chen H, Bei W.** 2011. Evaluation of the immunogenicity and the protective efficacy of a novel identified immunogenic protein, SsPepO, of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vaccine* **29**:6514-6519.
138. **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.
139. **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.
140. **Stills HF, Jr.** 2005. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J* **46**:280-293.



## ANNEXE, ARTICLE V

### ***Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen?**

Marcelo Gottschalk<sup>a</sup>, Jianguo Xu<sup>b</sup>, Cynthia Calzas<sup>a</sup>, Mariela Segura<sup>a</sup>

Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada<sup>a</sup>; State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control & National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Changping, Beijing, China<sup>b</sup>

Publié dans: *Future Microbiol.* **2010**. 5(3):371-91.

doi: 10.2217/fmb.10.2.

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

J'ai participé au répertoriage du nombre de publications sur les cas d'infection à *Streptococcus suis* chez l'homme.

**Abstract**

Infections caused by *Streptococcus suis* are considered a global and an economical problem in the swine industry. Moreover, *S. suis* is an agent of zoonosis that afflicts people in close contact with infected pigs or pork-derived products. Although sporadic cases of *S. suis* infections in humans (mainly meningitis) have been reported during the last 40 years, a large outbreak due to this pathogen emerged in the summer of 2005 in China. The severity of the infection in humans during the outbreak, such as a shorter incubation time, more rapid disease progression and higher rate of mortality, attracted a lot of attention from the scientific community and the general press. In fact, the number of publications on *S. suis* (including the number of reported human cases) has significantly increased during recent years. In this article we critically review the present knowledge on *S. suis* infection in humans, we discuss the hypotheses that may explain the 2005 outbreak and the repercussion of such an episode on the scientific community.

## Introduction

*Streptococcus suis* infections have been considered a major problem worldwide in the swine industry, particularly during the past 20 years. The natural habitat of *S. suis* is the upper respiratory tract of pigs, particularly the tonsils and nasal cavities, as well as the genital and alimentary tracts [1]. Although the pig carrier rate is near 100%, the incidence of disease in swine varies over time and is generally less than 5%, mainly due to the use of antibiotics [2]. However, in the absence of treatment, mortality rates can reach 20% [3]. In peracute cases, pigs may be found dead with no premonitory signs. Meningitis is the most striking feature and often the basis of a presumptive diagnosis. Other manifestations of *S. suis* infection in swine are septicemia, arthritis, endocarditis, pneumonia, rhinitis, abortion, and vaginitis [4, 5]. In North America, *S. suis* is, by far, the infectious agent most frequently isolated from cases of endocarditis in pigs. Affected pigs may die suddenly or show various levels of dyspnea, cyanosis, and wasting [1]. Although *S. suis* is considered a major swine pathogen, it has been increasingly isolated from a wide range of mammalian species (including humans) and from birds. For example, a dog that had been fed raw pig meat died without prior clinical signs, and *S. suis* was isolated from cerebrum and liver of the deceased animal [6]. We have isolated *S. suis* from an abortion case of a cow that had been transported in a non-disinfected truck that was typically used for swine transportation (unpublished observations). However, direct or indirect contact of affected animal species with swine is not always required. For example, a diagnosis of a *S. suis*-related death in a cat has been reported without any contact with pig or pork-derived products [7]. In addition, *S. suis* is believed to be a normal inhabitant of the intestine of a variety of ruminants [8]. These and other findings suggest complex epidemiological patterns of the infection, since many animal species might occasionally be a source of infection [9-11].

Infections in humans have been considered for a long time to be sporadic, have a low prevalence and only affecting people working with pigs or pork-derived products [12]. However, an important outbreak that occurred during 2005 in China, which affected more than 200 people with a mortality rate of nearly 20%, changed the perspective and/or the perception of the threat posed by this pathogen to human health. Since then, an increased number of reports pointed out *S. suis* as an important emerging zoonotic agent. In the present study, we review the available data on *S. suis* infection in humans. Furthermore, we discuss whether highly virulent *S. suis* strains for humans have really emerged in very recent years or the scientist and health

professional community had rather neglected the importance of this zoonosis in the past.

### **General characteristics of the microorganism and serotypes**

*S. suis* is an encapsulated Gram-positive coccus that possesses cell wall antigenic determinants somewhat related to Lancefield group D. There are 35 serotypes described to date and the composition of the capsular polysaccharides (CPS) defines the serotype [1]. There is some confusion regarding the early terminology of Lancefield groups R, S and T, and the relationship of these groups with group D streptococci and the different *S. suis* serotypes (also referred to in the literature as capsular types or serovars). The fact is that alpha-hemolytic streptococci were ascribed to Lancefield groups R, S, RS and T in 1963 by de Moor [13]. Years later, British researchers, working with encapsulated streptococci similar to de Moor's groups S and R, realized that de Moor had erroneously worked with antigens extracted from the CPS material rather than from the cell wall, and demonstrated that the lipoteichoic acid present in the cell wall of these strains react with group D antiserum [14]. In fact, the conventional method for extracting streptococcal group antigens (heating in HCl at 100°C and pH 2) usually yields sufficient free teichoic acid from most group D streptococci, such as enterococci, to precipitate with potent group D antisera. However, this is not the case with *S. suis*, which may give weak or equivocal results [14]. The "Lancefield groups R and S" were later identified as *Streptococcus suis* (Lancefield group D), and reclassified as capsular types 1 (formerly group S) and 2 (formerly group R) [15]. Some years later, groups RS and T were also reclassified as capsular types 1/2 and 15, respectively [16, 17]. In conclusion, the terminology of Lancefield groups R, S, RS and T, sometimes used in papers describing human infections [18-22], should not be used to avoid confusion.

As noted above, *S. suis* cell wall antigen shares epitopes with Lancefield group D. However, *S. suis* is not closely related genetically to other group D streptococci [23]. Using 16S rRNA gene sequence analysis, Chatellier *et al.* described a major, well-defined group of *S. suis* reference strains which are very closely interrelated but separated from other streptococci and enterococci [24]. Very recently, comparative genomic analysis showed that *S. suis* is phylogenetically distinct from other *Streptococcus* species for which genome sequences are currently available. Accordingly, ~40% of the ~2 Mb genome is unique in comparison to other *Streptococcus* species [25]. It is important to note that genome sequencings have been

performed with *S. suis* serotype 2 strains only [25, 26]. Chatellier *et al.* indicated that serotypes 32, 33 and 34 showed a higher divergence than other serotypes [24]. The analysis of chaperonin 60 gene sequences also revealed that serotypes 32 and 34 may belong to another species [27]. More recently, DNA sequence data and biochemical profiles clearly indicate that these two serotypes would cluster with *Streptococcus orisratti*, a species usually isolated from the teeth of rats [28].

Most *S. suis* organisms isolated from diseased pigs belong to a limited number of serotypes, often between 1 and 8 [29-34]. Although serotype 2 isolates predominate in most countries, the distribution may differ depending on the geographical location. For example, the prevalence of serotype 2 strains recovered from diseased animals in Canada and United States remains relatively low (less than 20%) [33, 34]. In European and Asian countries, however, serotype 2 is isolated much more frequently [35, 36]. Some strains belonging to less common serotypes, such as serotypes 9, 14, 7 and 5, have been associated with severe infections [1, 3, 37, 38]. Presumptive diagnosis of *S. suis* infection in pigs is based on clinical signs and macroscopic lesions. Confirmation of the infection must be achieved by the isolation of the infectious agent and the detection of microscopic lesions in tissue [8]. Veterinary diagnostic laboratories easily identify *S. suis* isolates through use of a minimum of biochemical tests, especially when the samples are recovered from diseased pigs [39]. Serotyping remains an important part of the routine diagnostic procedure. Since the majority of typable isolates belong to capsular types 1–8, it is advisable for veterinary diagnostic laboratories to use only antisera corresponding to those serotypes and to send untypable isolates to a reference laboratory [1]. Isolation and identification of *S. suis* isolates from carrier animals is much more complicated. In fact, most animals harbor *S. suis* in their tonsils and multiple serotypes, and untypable strains may be present in a single herd and even within the same animal [3, 40, 41]. In these cases, final identification of untypable strains must be carried out with the use of *S. suis* species-specific PCR tests [42]. Finally, no reliable serological test to detect the infection in a herd has been described so far [1, 43].

## **General aspects of *S. suis* virulence factors and the pathogenesis of the infection**

Almost all studies on virulence factors, pathogenesis of the infection and mechanisms of protection have been conducted with serotype 2 strains. Indeed, animal models have been almost exclusively standardized using this serotype [44-51]. One of the problems in identifying virulence factors of *S. suis* is the lack of a clear definition of virulence for this pathogen, mainly as a result of the different parameters used to define whether a strain is virulent or avirulent [52]. The single most critical virulence factor validated by two different research groups is the CPS [53, 54]. However, most avirulent strains are encapsulated, indicating that other virulence factors are also essential [55]. Most of other described factors are either not essential for virulence, or are found in both virulent and avirulent strains, or could not be properly studied due to the unavailability of knockout mutants. Knockout mutants of other putative virulence candidates have been obtained, but their virulence has not been tested [56]. Thus, the role in the pathogenesis of *S. suis* infections of most putative virulence factors described so far remains to be confirmed. An interesting and complete review on virulence factors of *S. suis* has recently been published [57].

The literature is also conflicting regarding the differentiation between virulence factors and virulence markers. Despite the lack of evidence that some of these putative virulence factors play a critical role in virulence, they nonetheless may serve as virulence markers and/or for phenotypic comparison of strains. This seems to be the case for the muramidase-released protein (MRP) and the extracellular factor (EF) proteins (and their variants) [58, 59], as well as the suilysin, a thiol-activated hemolysin produced by some strains of *S. suis* [60, 61]. The role of MRP and EF proteins has not been clearly defined; however, suilysin has been identified to be, not only a toxic factor for various cell types, but also an interference factor for complement-mediated phagocytosis and killing [55, 62-67]. Although isogenic mutants lacking either MRP and EF proteins or suilysin were shown to be as virulent to pigs as the respective parent strain [44, 68, 69], there is a positive association between the presence of these proteins and virulence of the strains in some European and Asiatic countries [35, 36, 58, 59]. In addition, avirulent strains possessing MRP, EF and suilysin factors have not been described so far. On the other hand, the absence of one or both of these proteins is not necessarily associated with a lack of virulence. Indeed, some European and Asian as well as most North American virulent isolates do not produce these factors [34, 48, 70-74].

The mechanisms that enable *S. suis* to disseminate throughout the animal are not well understood. The bacterium is able to spread systemically from the nasopharynx, occasionally resulting in septicemia and death [55, 75]. The palatine and pharyngeal tonsils are both potential portals of entry for *S. suis*, leading to subsequent hematogenous or lymphogenous dissemination [75]. It is not known how *S. suis*, despite its low quantities on mucosal surfaces, is able to traverse this first line of host defence to disseminate in the host and initiate disease. To accomplish this, bacteria must be able to breach mucosal epithelia in the upper respiratory tract. Very few studies have investigated the interactions between *S. suis* and epithelial cells, and many of these have produced contradictory results, such as limited invasion [76], no invasion at all [65], or invasion only with non-encapsulated (probably avirulent) strains [77, 78].

A general overview of the pathogenesis of the infection is presented in **FIGURE 1**. Survival of the organism once in the bloodstream may be facilitated by the CPS, which efficiently hampers phagocytosis. The sialic acid component, which is located in a terminal position as recently reported by our group [79], is probably responsible, at least in part, for the antiphagocytic properties of the CPS. Although an early theory suggested that the bacteria are taken up by monocytes (in the absence of specific antibodies), survive intracellularly and then invade the central nervous system (CNS) [80, 81], studies conducted by different laboratories over the past decade clearly indicate that bacteria travel extracellularly, either free in circulation or attached to the surface of monocytes [62, 66]. Indeed, as mentioned above, phagocytic cells are unable to efficiently phagocytose encapsulated *S. suis* in the absence of specific antibodies. Furthermore, sullysin further protect bacteria upon complement-mediated uptake and killing [62, 63]. *S. suis* can thus be considered a truly extracellular systemic pathogen.

In the event that *S. suis* fails to cause acute fatal septicemia, bacteria are able to reach the CNS via mechanisms that are only partially elucidated, such as adhesion to, with or without toxicity, and invasion of brain microvascular endothelial cells (BMEC) [64, 82, 83]. BMEC, together with the choroid plexus epithelial cells (CPEC), constitute the structural basis of the blood-brain barrier. It has been shown that *S. suis* also affects porcine CPEC barrier function and integrity. Although apoptosis may be involved in the process of CPEC cell death, necrosis seems to be the predominant mechanism. In fact, *S. suis* causes massive rearrangement of the tight junction proteins ZO-1, occludin

and claudin-1, and loss of actin at the apical cell pole as well as induces basolateral stress fiber formation. These and probably other mechanisms facilitate *S. suis* invasion of the CNS [84-87].

Clinical presentations of *S. suis* infections varies from asymptomatic bacteremia to fulminant systemic disease with septic shock similar to Gram-negative sepsis, which suggest a massive inflammation process. In addition, clinical signs of meningitis in pigs have also been associated with inflammation in the CNS, and it is suggested that treatment with anti-inflammatory drugs may help the recovery of the affected animal [1]. More recently, Tenenbaum *et al.* [87] showed that dexamethasone significantly prevented *S. suis*-induced protein and morphological tight junction alterations and attenuated extracellular signal regulated kinases and activation of matrix metalloproteinase 3 gene expression, improving the barrier function by preventing tight junction protein reorganization and degradation. Although treatment of *S. suis* meningitis with dexametasone in humans is still controversial (see below), an important number of studies (reviewed by Gottschalk *et al.* [56]) clearly suggest that inflammation plays a key role in the pathogenesis of both, systemic and CNS infections [51]. Also see Fig. 1.

### ***S. suis* infection in humans: clinical and epidemiological features**

In humans, *S. suis* usually produces a purulent or non-purulent meningitis [12]. In addition, endocarditis, cellulitis, peritonitis, rhabdomyolysis, arthritis, spondylodiscitis, pneumonia, uveitis and endophthalmitis have been reported [88-91]. In most cases, arthritis reflects generalized septicemia caused by *S. suis*. An association between *S. suis* infection and colon carcinoma, as reported for *Streptococcus bovis* infection, has also been suggested [92]. Finally, cases of peracute infections with shock and a high rate of mortality have been described (see below). In general, most patients with systemic *S. suis* infections exhibit leukocytosis and neutrophilia [93], and patients with meningitis have subarachnoid cerebrospinal fluid with high numbers of leukocytes, a high percentage of neutrophils, low sugar and high protein levels [93]. Complete descriptions of the most important clinical features of the infection have recently described [90, 91]. The incubation period ranges from a few hours to two days [94]. *S. suis* infection in humans generally occurs sporadically without obvious seasonal change. However, serious cases in Asia (either human or swine) occur mainly during the summer [89]. Mortality rates vary from less than 3% to 26 % [90, 91].



One of the most striking features of the infection is the consequence of deafness and/or vestibular dysfunction following *S. suis* meningitis [89, 95, 96]. Indeed, the recorded incidence of deafness following infection caused by this pathogen is consistently higher than that reported for other meningitis-causing bacteria, such as *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*, and can reach 50% and 73% in Europe and Asia, respectively [88, 96]. The reason for these observations is unknown. The deafness (unilateral or bilateral) has been mainly high tone, and is frequently associated with vertigo. Studies have shown that the accumulation of inflammatory cells observed around the vestibular-cochlear (eighth cranial) nerve in *S. suis* meningitis is insufficient to impede normal neural conduction. Alternatively, cochlear sepsis, resulting from passage of the organism from the sub-arachnoid space to the perilymph via the cochlear aqueduct, might be primarily responsible for the hearing loss complicating bacterial meningitis [88, 89]. In one case, labyrinthitis ossificans was diagnosed [96]. The progression for hearing varies: some patients improve overtime, and others do not [90]. No cases of deafness have been reported in non-meningitis cases of *S. suis* infection in humans.

Although few facets of the epidemiology of *S. suis* infections in humans have been elucidated, it is apparent that a high number of cases of human infection can be ascribed to a high degree of exposure to unprocessed pork meat or to close contact with pigs. Many cases of infected people are pig farmers, abattoir workers, persons transporting pork, meat inspectors, butchers and veterinarian practitioners [88, 89, 97]. In United Kingdom and France, this infection was listed as an Industrial Disease in 1983 and 1995, respectively [88]. In 2005, the Center for Health Protection in Hong Kong classified *S. suis* as a statutorily notifiable disease [301]. Handling diseased pigs (with high rate of bacterial shedding) certainly increase the risk of human infection [1, 8]. However, it has been suggested that manifestation of disease in pigs is not a prerequisite for infection in people in contact with pigs. As mentioned above, pigs can be healthy carriers, and thus might be also a source of infection. Since many patients acquire the disease following occupational exposure to pigs or pork products, the preponderance of affected adult males is readily explained [90]. In the Netherlands, the Western country with the highest number of published reports on *S. suis* infection in humans, the annual risk of *S. suis* infection among abattoir workers and pig breeders was estimated at approximately 3.0/100 000, a rate that is 1500 times higher than that among persons not working in the pork industry. Butchers had an annual rate of

1.2/100 000; this rate is even higher in the United Kingdom [88]. Interestingly, these figures are very different in Asia, where the annual incidence in Hong Kong for the “occupational” group was 32/100 000, 350 times higher than that of general population (0.09/100 000), and 30 times higher than the homologous group in the Netherlands [98]. The higher rate in the occupational group in Hong Kong compared to that of Netherlands may be explained by the fact of a higher prevalence of *S. suis* infections in Asiatic pigs, although this must be confirmed. On the other hand, the less dramatic difference between the occupational group and the general population (350 times in Hong Kong vs 1500 times in the Netherlands) may be due to the fact that the general population in Asiatic countries has a much higher level of contact with raw pork meals, and thus higher risk of infection, than the same group in Western countries (see below). In Germany, the nasopharyngeal carriage rate of *S. suis* serotype 2 in the high-risk group (butchers, abattoir workers and meat processing employees) was 5.3%, while those without contact with pigs or pork consistently tested negative [99]. Interestingly, some positive individuals were sampled again 3 weeks after the first study, and the presence of *S. suis* serotype 2 could still be confirmed, indicating that the bacteria probably remained in the tonsils of healthy people for a relatively long period of time, as already shown in pigs [1]. Other reports confirmed *S. suis* isolation from tonsils in healthy abattoir workers [100, 101]. A recent serological survey in mainland United States (where only two human cases of disease have been reported so far [102, 103], indicated that swine-exposed persons had higher titers of antibodies to *S. suis* than non-swine-exposed persons [104]. Similar results had been previously been reported in New Zealand [105]. These data indicate the human infections are more common than currently thought and high exposure to *S. suis* may lead to a colonization of the upper respiratory tract without producing any health consequences. Only in some cases, clinical disease may follow. In this regard, splenectomy and alcoholism have been suggested as important predisposing factors for the development of serious *S. suis* disease [19, 106-111]. Indeed, the fatality rate of *S. suis* infection after splenectomy is nearly 80%. It has been suggested that individuals who have had a splenectomy should be excluded from the meat trade or pig farms [112]. A study in Thailand reported that 75% of affected patients had a history of significant alcohol consumption [93]. Patients with rheumatic heart disease, valvular heart disease or ventricular septal defect were more likely to have infective endocarditis [89]. Predisposing factors may play a certain role but they not seem to be essential conditions to develop *S. suis* disease. Many reports indicate that a majority of affected patients did not have previous medical illnesses which might predispose to immunosuppression [21, 98, 113-116]. Finally, in addition to pigs, wild boars are a

possible reservoir for *S. suis* and a major source of *S. suis* infection for hunters and poachers [117-119]. Indeed, the prevalence of *S. suis* serotype 2 among wild boars (11%) is similar to that among domestic pigs (14%) in Germany [120].

Many reports indicate a relatively high percentage of patients not recalling any contact with pigs or pork products [121-126]. However, since these cases were identified in a retrospective study, data could easily have been missed. Only one report claims to confirm a patient with a complete lack of contact with risk animals or their products. In fact, the affected patient worked in close contact with chickens [125]. The route of entry of the organism in humans might be a small cut in the skin, although in some cases no wound was detected. In addition, bacteria may colonize the gastrointestinal tract, as suggested by diarrhea as a prodromal symptom [94]. In fact, it is believed that the oral route is probably the main route of infection for people not having contact with the swine industry in Asian countries, such as Hong Kong, Vietnam and Thailand, where consumption of fresh and/or raw pork, is common [90, 127]. In fact, cases from these countries included not only a significant number of housewives (probably contaminated by raw pork products) but also persons who were unaware of any exposure to pork [90, 121]. In addition, open markets where people can buy raw pork or porcine products are widely available in Asian countries, thus it is not possible to exclude indirect exposure [121]. It has been shown, by direct culture, that more than 6% of pork samples were positive for *S. suis* carriage in six wet markets in Hong Kong [128]. The presence of the organism would be confined not only to the tonsillar region, but also to other sites such as the head/neck, tonsils, tongue, intestines, bone, and tail that are all readily available in the wet markets as ingredients for Asiatic cuisine. Although it was suggested that the bulk of meat/muscle in healthy pigs may be relatively free of this pathogen [128], *S. suis* was isolated from the bulk of meat in a cold storage house in Jiangxi Province during the 2005 outbreak in China [129]. Using a more sensitive technique (Most Probable Number-PCR method), it has been recently shown that the prevalence of contaminated pork products (including meat) is probably much higher [130]. It is important to mention that people who ate well-cooked pork from sick pigs do not develop clinical signs [91]. Only one infant infection [131] and one fatal infection in a pregnant woman [127] were described.

## **S. suis infection in humans: microbiological diagnosis and strain characterization**

In cases of meningitis, the cerebrospinal fluid (CSF) cultures are the most important sample to be studied. In fact, many patients present positive CSF cultures, but *S. suis* could not be isolated from blood. Patients with septicemia usually have positive blood cultures, but many of them do not present signs of meningitis and CSF cultures are negative [98]. Although *S. suis* field isolates readily grow on media used for culturing meningitis-causing bacteria, and veterinary diagnostic laboratories easily identify this pathogen, many diagnostic laboratories working in human diseases are not aware of this infection and usually misidentified it as enterococci, *S. pneumoniae*, *S. bovis*, “Group D streptococci”, viridans group streptococci (*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus vestibularis* and others) or even *Listeria* [12, 89, 95, 132-134]. In many cases, the initial Gram stain diagnosis of the CSF specimen is pneumococcal meningitis. This confusion may have led to miss diagnosis of *S. suis* meningitis in the past. Many cases were diagnosed retrospectively after the isolates were initially identified as *Streptococcus viridans* [94, 135, 136]. It has been suggested that when optochin-resistant streptococci are cultured from CSF samples of patients with meningitis, *S. suis* diagnosis should be taken into consideration [90]. However, this is probably not an absolute rule, since sporadic cases caused by *S. pneumoniae* strains resistant to optochin and *S. suis* strains susceptible to optochin have been described [137, 138]. Many (if not most) laboratories propose the use of multi-tests, such as the API Strep System test (BioMérieux, France), the BBL Crystal gram-positive ID kit (Becton-Dickinson), the Vitek GPI Card (BioMérieux), and the Phoenix System PID (Becton-Dickinson); however, some strains of *S. suis* can be misidentified using these commercial kits [1, 89, 98, 128, 132, 133, 139, 140]. More recently, PCR tests have been used to directly detect *S. suis* DNA from CSF samples with a sensitivity considerably higher than direct culture, especially if antibiotics have been used [122, 123]. However, most PCR tests used in humans would only detect serotype 2 strains [122, 123] and they will not detect infections caused by other *S. suis* serotypes (see below). It would be advisable to use validated PCR tests that detect all serotypes of *S. suis* [42], as used in veterinary medicine.

One important feature of the diagnosis of *S. suis* is the serotyping. It has been claimed everywhere that serotype 2 is the most common serotype affecting humans. This is probably true. However, it should be noticed that most reported cases of *S. suis*

infection in humans have been attributed to this serotype generally on the basis of biochemical analysis obtained using commercial kits above mentioned. While many of these kits claim to differentiate “type” 2 from “type” 1 strains based on sugar fermentation, there is no evidence of a correlation between a specific serotype and its biochemical properties [132, 138, 141]. Although it has been suggested that fermentation of raffinose can be used to differentiate serotypes [98], it is usually not the case [141]. The information is sometimes confusing, since it has also been suggested that the API test differentiate “biotypes I and II” rather than “serotypes 1 and 2” [90, 142]. However, biotypes have never been seriously described for *S. suis*. As a consequence, a high percentage of the reports where serotype 2 strains are described have not been confirmed by serotyping [102, 106, 125, 134, 143-153]. In addition to serotype 2 strains, serotype 14 has been isolated from human cases many times [16, 22, 108, 154]. Recently, Kerdsin *et al.* [126] reported twelve strains of serotype 14 isolated from human cases in Thailand, indicating that this serotype is a major zoonotic agent in that country. Finally, sporadic cases due to other serotypes, such as serotype 4 [12], serotype 1 [131] and serotype 16 [155] have been reported. Two human cases associated with *S. suis* serotype 1 could not be confirmed because the serotype of these strains was established using biochemical criteria only as mentioned above [106]. Unfortunately, these isolates are not longer viable to allow confirmation of the serotype (J. Kopic, personal communication, 2004). In one study, serotype 2 strains were identified by PCR for capsular genes (*cps2J* as a gene target) [123]; however, this PCR would detect both, serotype 2 and serotype 1/2 strains [156]. In many studies, neither serotyping nor “biotyping” (using the commercial biochemical tests) have been performed, and no indication of the serotype is presented [21, 92, 96, 113, 114, 121, 127, 157-159].

Although there are some phenotypic differences between human and swine strains of *S. suis* serotype type 2, most studies show that strains isolated from humans are phenotypically and genotypically similar to those recovered from swine within the same geographical region [24, 160-164]. Very recently, two human and one swine strains have been completely sequenced and compared [25]. Virtually, all of the genome is common to the three *S. suis* strains. The only exceptions are three ~90 kb regions, present in the two isolates from humans, composed of integrative conjugative elements and transposons. Carried in these regions are coding sequences associated with drug resistance [25]. While a high molecular weight variant of the protein EF (identified as “EF\*”) has been associated with strains that are pathogenic to humans,

other studies showed that the MRP/EF profiles from human isolates were generally identical to those of the corresponding pig strains found in the same country. Interestingly, similar to most swine strains in North America, all serotype 2 strains isolated from humans in Canada are negative for MRP, EF and sullysin production [24]. In 2001, Tarradas *et al.* reported two cases of meningitis in a butcher and an abattoir worker who had handled pork originating from the same three closed farms [20]. Analysis of *S. suis* serotype 2 strains recovered from tonsils of healthy pigs from these farms showed that they were genotypically similar but not identical to the human strains. The slight differences between isolates might reflect an adaptation to the new host or, more likely, a lack of reproducibility of the technique used. Virulence properties of strains isolated either from pigs or humans appear to be similar [64, 65, 117, 165, 166].

### **Therapy and prevention of the infection in humans**

*S. suis* strains are usually sensitive to penicillin, with a few exceptions [95, 167, 168]. Therefore, intravenous penicillin G has been used to successfully treat most cases. However, it should be noted that at least one penicillin-resistant strain has been reported in humans [169] and many resistant strains have been isolated in piglets [1, 89, 170]. Since at least two cases of relapse have occurred after two and four weeks of treatment respectively, antibiotics should be administered for a relatively long period of time (at least 6 weeks) [171, 172]. Clinical experience with drugs other than penicillin is limited [90]. Ampicillin and chloramphenicol, sometimes combined with an aminoglycoside, can also be used. Resistance to norfloxacin has been reported in *S. suis* strains recovered from humans [173]. Early administration of antibiotics does not appear to have any influence on the development of post-meningitis hearing loss [95]. Based on individual cases, dexamethasone therapy was [122, 174] or was not [96] associated with protection against severe hearing loss. However, in a recent controlled trial (with treated and placebo groups), it was clearly shown that a high dose dexamethasone significantly reduced the rate of post treatment hearing loss due to *S. suis* [90].

*S. suis* vaccines for humans do not exist so far. Interestingly, there is a report of a patient with recurrent septic shock, 15 years after the first episode, due to *S. suis* serotype 2 [175]. The second and fatal episode was considered as a re-infection rather than a recurrence of the previous infection. The authors suggested an absence of immunity after the first infection and highlighted the importance of constant prevention

in exposed workers. Nevertheless, more data would be required to determine the magnitude and the extent of the adaptive immune responses generated in patients affected by *S. suis*.

Some preventive measures for humans may be justified due to the high rate of contamination of pigs with this microorganism. Individuals in close occupational contact with pigs or pork products should pay special attention. Consumption of raw pork products should also be avoided. Most infected persons are probably healthy carriers [99, 176]; however, under special but still not well defined, *S. suis* may become an opportunistic pathogen. *S. suis* can also survive in the environment. The organism has been shown to survive in faeces for 104 days at 0 °C, up to 10 days at 9 °C, and up to 8 days at 22 to 25 °C. It also survives in dust up to 54 days at 0 °C and up to 25 days at 9 °C, but could not be isolated from dust stored at room temperature for 24 hours [177]. Moreover, *S. suis* can survive in water for 10 minutes at 60°C, making the scalding process in abattoirs a possible source of contamination. On the other hand, the organism is rapidly inactivated by disinfectants and cleansers, commonly used in farms and laboratories at concentrations lower than those recommended for use by the manufacturers [177].

### **A serious outbreak of *S. suis* disease in humans: the Chinese experience**

In 2005, an important outbreak of acute disease in humans caused by *S. suis* serotype 2 was reported in Sichuan, China [178]. Although several reports are available concerning this outbreak, the official report of the Control and National Institute for Communicable Disease Control and Prevention in China indicated a total of 215 cases, 66 of which were laboratory confirmed, with a total of 39 deaths [162]. The most important feature of this outbreak was the high incidence of systemic disease and proportionally low number of cases of meningitis. Although the total fatality rate was 18%, it reached 63% among patients with septicemia and septic shock [90]. Three clinical presentations were observed: sepsis, meningitis, and “streptococcal toxic shock syndrome” (STSS) [97, 162]. The original “toxic shock syndrome” (TSS) is clearly defined in clinical and laboratory data [302]. STSS is also a well-defined syndrome, usually associated with Group A streptococci [303]. Less frequently, it has been associated with streptococci other than Group A streptococci [179]. TSS and STSS are usually toxin-mediated and mainly associated with superantigens [180]. In some STSS cases, M protein-fibrinogen interactions with activation of the coagulation

system have also been suspected [181, 182]. However, the term “toxic shock-like syndrome” is a more generic term referring to a clinical situation that shares many characteristics of TSS. In addition, “septic shock”, which is a highly lethal syndrome of cardiovascular shock with progressive organ damage of the liver, kidneys and lung that kills within 24-48 hours after onset, may also present some features clinically similar to TSS [183].

What happened in the Chinese outbreak? Cases in China were suggested as STSS based on the presence of the following criteria: sudden onset of high fever, diarrhea, hypotension, blood spots and petechia, clear erythematous blanching rash and dysfunction of multiple organs, such as acute respiratory distress syndrome, liver and heart failure, disseminated intravascular coagulation, and acute renal failure [97, 162]. More data on the pathological features observed in diseased patients have recently been described [184]. Since no superantigens are produced by the strain responsible for the outbreak (see below), it would be more appropriate to classify the Chinese episode as a “streptococcal toxic shock-like syndrome”. However, most publications from Chinese researchers wrongly described the outbreak as a STSS [185]. Although the Sichuan outbreak is the largest recorded outbreak of *S. suis* infection in humans, another smaller Chinese human outbreak took place in Jiangsu Province in 1998 that affected 25 people with 14 reported deaths [162, 186, 187]. In the Sichuan outbreak, cases occurred in association with backyard production systems where people were directly exposed to infection during the slaughtering process of pigs that had presented clinical signs of illness or had died of unknown causes [162]. It is also possible that infection resulted from consumption of affected pigs as food. There was no evidence of human to human infection and none of the 417 healthcare workers who had cared for case patients were clinically infected [162]. Notably, the human outbreak followed a local swine outbreak that killed an undefined high number of backyard pigs [162]. Most patients were farmers, although five butchers and one veterinarian were also affected [97].

In fact, it is difficult to explain what happened in China in 2005. A first hypothesis may be the life style and the backyard system of production in the South of China. Farmers in Sichuan Province have close contact with pigs. In addition, animals are illegally slaughtered at home and it is not uncommon that diseased animals are slaughtered for family consumption, and sometimes commercialized. Although these facts may explain a higher degree of animal to human transmission during the



outbreak, these practices have existed for hundred of years and are similar to other countries in Asia [121]. The presence of predisposal factors have not been described in most Sichuan patients. It has been suggested that the increased mortality might also be attributed to delayed access to treatment [91, 188]. Nevertheless, the latter hypothetical cause can not explain the high number of reported infected patients. We may raise another theory: other low to medium-scale human outbreaks happened in the past in China but they did not attract the public attention. During the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) that initially affected China between 2002 and 2004 [189] a certain delay reporting the disease to the scientific community and to the World Health Organization (WHO) was suggested [190]. After the SARS experience, however, the Chinese authorities were markedly more prepared in 2005 to deal with an “unknown” outbreak. Indeed, many laboratories from the State Key Laboratories for Infectious Disease Prevention and Control and National Institute for Communicable Disease Control and Prevention put all the efforts to identify and characterize the etiological agent of the outbreak and the information was immediately available to the world. In addition, they were highly cooperative with the WHO (M. Gottschalk, personal communication). In addition, control measures strictly applied during the outbreak, such as strict prohibition of illegal slaughtering, eating, selling and transporting diseased pigs, greatly contributed to ending the outbreak [162]. The lessons learned from the SARS epidemics probably improved the medical performance for management of new epidemics, such as *S. suis* and human avian influenza [185, 189]. As a consequence, there was a huge amount of information about the *S. suis* outbreak that was immediately available to the scientific community and the press.

### **Is the Chinese strain responsible for the 2005 outbreak a new and highly virulent strain for humans?**

Even though the facts mentioned above probably contributed, at least in part, to the impact of the *S. suis* Chinese outbreak on the scientific community, there is still another highly exciting hypothesis for the scientists: the one which suggest a newly virulent strain for humans with high infectivity. The first question to resolve was whether the presence of one or more strains was at the origin of this outbreak. Independent researchers clearly confirmed the identity of *S. suis* strains recovered from ill patients, and also showed that the strains belong to serotype 2 [97, 129, 162]. Using restriction fragment length polymorphisms, ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis, most strains involved in both the human and swine outbreaks were shown to be clonal and identical to the strain responsible for the 1998 outbreak in Jiangsu Province [97, 129,

162]. Multilocus sequence typing (MLST) is a technique that defines strains by using sequences of different housekeeping loci and has become the method of choice to compare different microbial populations. Using MLST, all but two strains from the 2005 outbreak were classified into a single sequence type (ST), called ST-7, which derives from the ST-1 complex [129]. The latter has been strongly associated with cases of septicemia and meningitis in swine and humans, mainly in Europe [191]. Although an early complete sequencing study of two strains of *S. suis* involved in the outbreak seemed to indicate that the sequence at MLST loci of some Chinese strains did not match the expected alleles for those of ST-7 [26], a more recent study of a complete sequencing of three *S. suis* strains (including a strain from the Chinese outbreak) indicates that this is unlikely and differences observed by Cheng *et al.* [26] can be attributed to inaccurate sequence data [25].

Since almost all cases in humans and pigs in 2005 in Sichuan were produced by a single clone, the next step was to study whether this new clone possesses highly virulent and toxic properties. The emerging clone produces MRP, EF and suilysin proteins, a feature that is typical of most Euroasian strains [129, 162]. In the last three years, many studies have been performed with the “epidemic” ST-7 Chinese strain and, as mentioned, two independent groups have sequenced the pathogen [25, 26]. The Chinese ST-7 strain has been reported to be more toxic for human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) than a well-characterized European virulent strain ST-1 [129]. In fact, this higher toxicity would simply be due to a higher capacity to release suilysin (our unpublished data). Recent reports indicated that the ST-7 strain also possesses a stronger capacity to stimulate T cells, naïve T cells and PBMC proliferation and induces a higher level of pro-inflammatory cytokines in experimentally infected mice than does a ST-1 well characterized European strain [192, 193]. As mentioned above, inflammation seems to be a hallmark of *S. suis* pathogenesis [55, 56] and higher levels of pro-inflammatory cytokines have been described during the 2005 outbreak in patients with streptococcal toxic shock-like syndrome than in those with meningitis only [192]. The ST-7 strain was also shown to be pathogenic in experimentally infected mini-pigs [26, 97]; however, a reduced number of animals have been used and no virulent reference European ST-1 *S. suis* strains were included for comparative analysis [194]. It has been proposed that the epidemic ST-7 strain evolved recently from a highly pathogenic ST1 type, which in turn, evolved from the intermediately virulent ST-25 type, usually found in North America [192]. In fact, Chinese researchers have sequenced two isolates (one from the early 1998 outbreak and another one from the last 2005 outbreak) [26]. At that moment, they showed that

the European reference strain P1/7 (which belongs to the ST-1) predicted protein coding sequences (CDSs) had only 83.6% and 83.3% of orthologous matches in these Chinese strains, respectively. It was also reported that 4.9% of the P1/7 genome was “unique” [26]. However, according to a recent and complete analysis, all of the CDSs in the strain P1/7 genome have equivalent coding regions in both Chinese *S. suis* strain sequences [25]. The difference in the number of orthologues identified can be accounted by differences in gene prediction. Inaccurate sequencing data reported by Chen *et al.* [26] at that moment may be explained by the fact that the comparison of the Chinese strains was done with (at that moment) unfinished, unannotated genome sequence of strain P1/7 from the Sanger Institute. The only accurate large scale region of difference that could be confirmed with the recent Chinese strain sequence was associated with a 89 kb putative “pathogenicity island” (PI) that is present in the Chinese strains but absent in the P1/7 European strain [25]. This PI might be involved in the particular clinical manifestation of *S. suis* infection, although this remains speculative at this stage [25]. Previous results indicated that no superantigens could be identified in the Chinese strain [56] (Dr T. Proft, University of Auckland, unpublished data). Results from complete genome sequencing confirmed such observations [25, 26]. So, generally speaking, the ST-7 strain seems to be a highly virulent strain. However, there is so far no clear prove that the strain responsible for the outbreak in China in 2005 is, in fact, a newly highly virulent strain for humans. Future studies intending to increase the depth of knowledge on virulence factors of the ST-7 Chinese strain along with the analysis of the pathogenic significance of sequence variations observed (including the 89 kb putative PI) [25], will be needed to define it as a real emerging new pathogen.

### **Is the *S. suis* outbreak in China is the starting point for an emerging disease in humans?**

*S. suis* is not a “new” zoonotic agent. The first description of human disease was reported more than 40 years ago in Denmark [195]. In addition to this country, cases have been reported in The Netherlands, Italy, Spain, United Kingdom, Belgium, Croatia, Austria, New Zealand, Sweden, Singapore, Taiwan, Japan, China (mainland and Hong Kong), Thailand, Germany, Ireland, Hungary, France, Greece, Australia, Serbia, Ireland, Northern and Southern Vietnam, Portugal and Argentina [12, 20, 89, 92, 94, 102, 103, 106-108, 113, 116, 119, 122, 123, 134, 146, 149, 152, 153, 196-202]. Mysteriously, only three cases have been reported in Canada [132, 136, 154] and two

in mainland United States. However, one of the “USA” cases was not a « real » North American case, since the patient was infected while travelling in the Philippines, and he developed clinical signs once he was back in United States. A recent case in Hawaii has also been reported [174].

*S. suis* disease has been considered in the past as a rare event in humans. However, it has recently been reported as the third most common culture-confirmed cause of community-acquired bacterial meningitis in Hong Kong, following *S. pneumoniae* and *Mycobacterium* [203]. In Vietnam, it is now considered as the most frequent cause of bacterial meningitis in adults [122]. So, this infection is not really new and it is difficult to demonstrate whether or not human cases have really significantly increased since the 2005 Chinese event. One hypothesis is that the 2005 outbreak significantly increased not only the interest of the scientific world on this poorly known pathogen but also the awareness of this infection. As a consequence, the number of publications on *S. suis* human infection significantly increased after the Chinese outbreak (Fig. 2B), as well as the total number of human cases reported per year (Fig. 2C). The latter fact probably reflects improved *S. suis* diagnosis. However, the impact of the Chinese outbreak on total *S. suis* publications is only observed after 2008 (Fig. 2A). A significant number of articles mentions *S. suis* either as an emerging or a new disease in their title or abstract, but all of them have been published after 2005 [21, 25, 90, 91, 98, 185, 188, 194, 204, 205]. A good example is Thailand. Since 2006, the Miscellaneous Bacteriology Laboratory, National Institute of Health initiated a microbiological service for the identification of *S. suis* in clinical isolates from laboratories of local hospitals [126]. In fact, it was believed that many infections had been misidentified in the past in that country. Coincidentally, an outbreak of *S. suis* was detected in Phayao Province during 2007, with 29 laboratory confirmed cases transmitted through consumption of raw blood from infected pigs [126]. This outbreak would probably not have been detected without the surveillance program. Before 2005, very sporadic cases were reported in Thailand, whereas after 2006, more than 300 cases are mentioned in the web site of the Bureau of Epidemiology, Ministry of Public Health [126].

One can argue that perhaps the number of *S. suis* cases did not really increase in the last years, but the expression of the disease did. As mentioned above, the outbreak in China indicated many “STSS” cases. Although this was the first reported

very large human outbreak with many patients presenting these acute symptom, there is one previous report of a “STSS” caused by *S. suis* [93] and there are many other reports in the literature indicating severe cases of *S. suis* sepsis with shock (very difficult to differentiate from “STSS” cases), multiple organ failure, disseminated intravascular coagulation and associated purpura fulminans, which lead to death within hours [12, 74, 94, 99, 106, 127, 153, 160, 175, 206, 207]. Interestingly, 10 of 41 cases described in Thailand had sepsis syndrome in the absence of primary organ infection with a clinical presentation similar to that described in the Chinese outbreak [121]. A serious case of septic shock caused by a non-serotype 2 strain (serotype 14) has also been described [108]. The association of any *S. suis* septic shock case with the Chinese outbreak may lead to serious misinterpretations in the literature. For example, a very recent case of “SSTS” caused by *S. suis* in Australia [153] lead to Ma *et al.* [185] to describe it as the prove of “spread of the severe form of *S. suis* serotype 2 across Southeast Asia and the Pacific area”. They even indicated that the “ST-7 strain can be found in other countries”, referring to the Australian case. In fact, the strain recovered in the latter case was neither serotyped nor MLST classified [153].

## Conclusion

*S. suis* is the cause of a potentially serious disease in humans. It is plausible that in many countries the human infection caused by *S. suis* was already there, at a similar rate, but misidentified. Cases of sepsis with shock and high mortality had already been described in the literature. After the SARS experience, a rapid intervention from the Chinese authorities and high publicity of the 2005 outbreak trapped the attention of the scientific community and increased the interest of diagnostic laboratories on this pathogen. Although we have some data indicating differences between the ST-7 strain responsible for the outbreak and “normal” Western strains, we are still looking for more scientific facts that may incriminate this strain as responsible of a higher mortality rate in affected patients. So far, we should probably not be talking about an “emerging” disease, but rather as an old neglected zoonosis. Given that many people worldwide are in contact with pigs daily and that *S. suis* is a common cause of disease in swine populations, it is reasonable to propose that many persons already harbor this pathogen without presenting any clinical signs. Under unusual circumstances, disease may develop. Due to close contact with pigs in certain Asian countries, it is expected that such countries report a higher number of human cases. Physicians and microbiologists, especially in North America (where very few cases are identified), should be aware of this infection, and more attention should be

given to streptococcal meningitis or septic shock cases in people working with pigs or pork products. Veterinarians should also be aware that there is a low but real risk during handling of *S. suis*-diseased animals that are probably shedding high numbers of this zoonotic agent.

There is some dispute regarding the preventive measures that might be justified due to the high rate of contamination of pigs with this microorganism. Some authors advise that prompt first-aid care of injuries in meat handlers might reduce the risk of *S. suis* infections, although others consider this recommendation questionable because it is evident that skin lesions have only been reported in some cases and the route of entry of the infection remains unclear [95]. Although it is difficult to recommend effective prevention measures for employees of the food industry, people coming into close occupational contact with pigs or pork products should pay special attention. People in Asian countries may have interest in changing habits of eating raw pork products from non controlled sources. Increased collaboration between laboratories with diverse but complementary expertise in different parts of the world is necessary to significantly increase our understanding of this intriguing pathogen [188].

### **Future Perspective**

The important 2005 outbreak in China had as a consequence an increased awareness of this infection by many scientists. In addition, interest on the research on virulence attributes of *S. suis* dramatically increased. In fact, knowledge on virulence factors on this pathogen has advanced more in the last three years than in the previous decade. In our opinion, future research should continue in this direction, since most virulence factors described so far are hypothetical and most of them, present in both virulent and non-virulent strains. Deeper studies with the ST-7 strain responsible for the human outbreak are warranted and they will reveal whether or not we are dealing with a really new highly virulent strain for humans. Many of these studies are presently underway in our laboratory in close collaboration with Chinese researchers.

In addition, the pathogenesis of the infection caused by this pathogen is very complex and far from being completely elucidated. As mentioned, excessive inflammation seems to be crucial for *S. suis* to cause disease. Indeed, *S. suis* is an unique and terrific

model to study the role of inflammation at the CNS level during bacterial infections. In fact, *S. suis* is the only bacterial pathogen to be able to accurately reproduce clinical signs of cerebral inflammation in mice after being infected by a parenteral route [51]. The use of this model will lead to new and useful knowledge on the role of inflammation in meningitis and encephalitis.

Finally, there is a relatively neglected area that will have to be addressed in the future: the immune response against this pathogen. In fact, there are no effective available vaccines for swine, and no vaccine has ever been developed for humans. Indeed, the adaptive (humoral) immune response against *S. suis* is usually low (in mice and pigs). The reasons for this are still unknown and will require intensive research in the years to come.

## **Executive summary**

### **Diagnosis of *S. suis* infections in humans**

- Diagnostic laboratories working in human diseases must be aware of this infection. Anamnesis including contact with swine or pork-derived products (including consumption of raw meals, especially in Asia) should be taken into consideration for cases of meningitis and septic shock.
- The use of rapid biochemical commercial kits for the identification of *S. suis* correctly identify the pathogen in most cases. However, exceptions may exist and a genetic identification (such as sequencing of 16S) should be done when previous contact of the patient with swine/pork products has been identified.
- PCR-based techniques may be used to increase the sensitivity of the diagnosis, especially with CSF samples. However, a PCR based on primers that detect all *S. suis* serotypes (and not only serotype 2 strains) should be used.
- Serotyping is an important tool to be used once the diagnosis of *S. suis* has been performed. This information is extremely useful for epidemiological analysis. The rapid biochemicals commercial kits above mentioned should not be used to differentiate serotype 1 from serotype 2 *S. suis* isolates.

### **Hypothetical explanations for the deadly *S. suis* human outbreak of 2005 in China**

- There is no clear explanation why a high number of *S. suis* deadly infections in humans suddenly appeared in a large region.
- Farmers in Sichuan Province have close contact with pigs (this is also true in other parts of Asia).
- Animals are sometimes illegally slaughtered at home and it is not uncommon that diseased animals are slaughtered for family consumption, and sometimes commercialized (this is also true in other parts of Asia).
- Some delay for having access to health care facilities.
- The strain responsible for the Chinese outbreak is different from other strains described so far. However, clear and definitive indication that it is a “highly virulent strain for humans” is still lacking.

### **Why this time the information was rapidly available to Western countries?**

- A better system of surveillance of the Chinese official laboratories that could rapidly identify the presence of an abnormal number of affected patients. This is probably a positive results of the experience suffered during the SARS episode some years earlier.
- Good knowledge on *S. suis* infections of Chinese diagnostic laboratories that allowed to accurate reach a definitive diagnosis.
- A high level of collaboration of Chinese researchers with the WHO.

### **Is *S. suis* an emerging or an old neglected zoonotic pathogen?**

- Cases of septic shock, with clinical presentations similar to those described in the 2005 Chinese outbreak had been previously reported in many countries.
- Although the possibility that the new strain isolated in China is more virulent for humans than normal virulent strains can still not be ruled out, it is also plausible that *S. suis* has always been present as a main cause of adult meningitis and septic shock, mainly in Asian countries. However, and after the 2005 outbreak, more and more scientists discover the existence of this important pathogen.

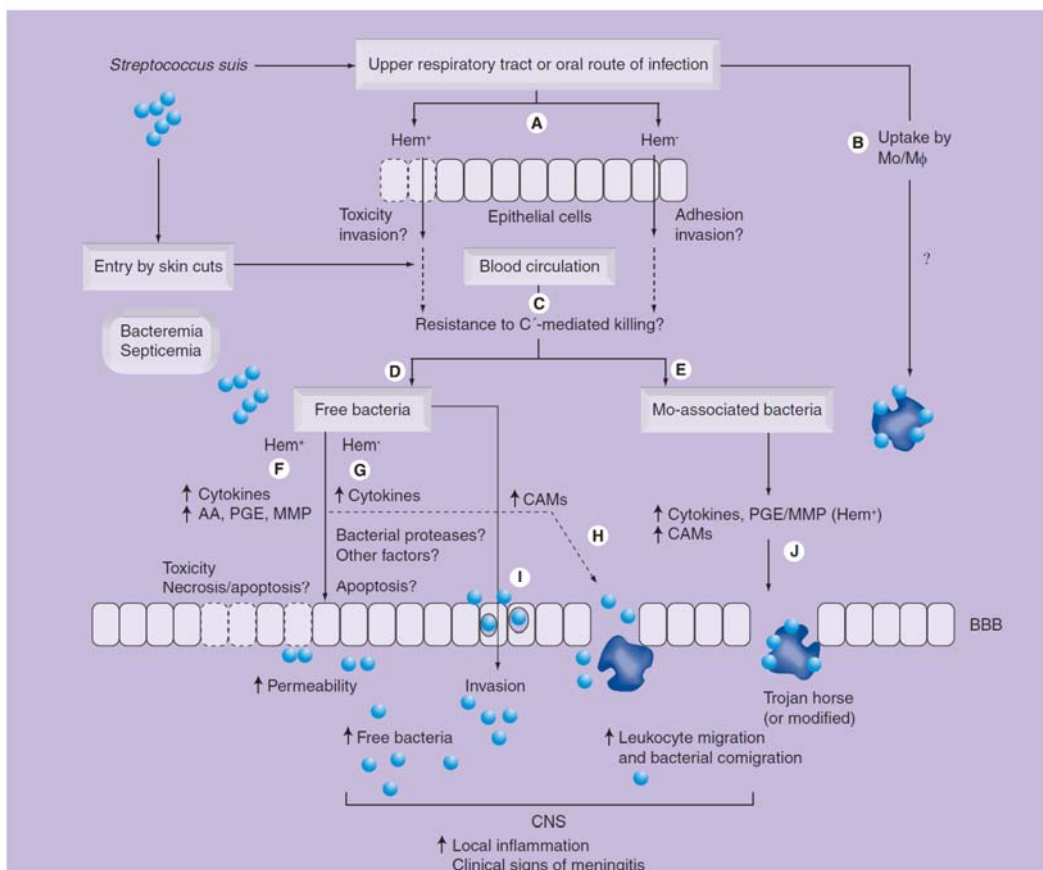


**Acknowledgments**

The authors would like to recognize the scientific contribution for the past 20 years of *S. suis* research of their collaborators, the graduate students and post-doctoral fellows who worked on projects involving characterization of virulence factors and studies on the pathogenesis of *S. suis* infections, as well as the invaluable help of members of the China CDC research team working on the isolation and characterization of the strains involved in the 2005 Chinese outbreak.

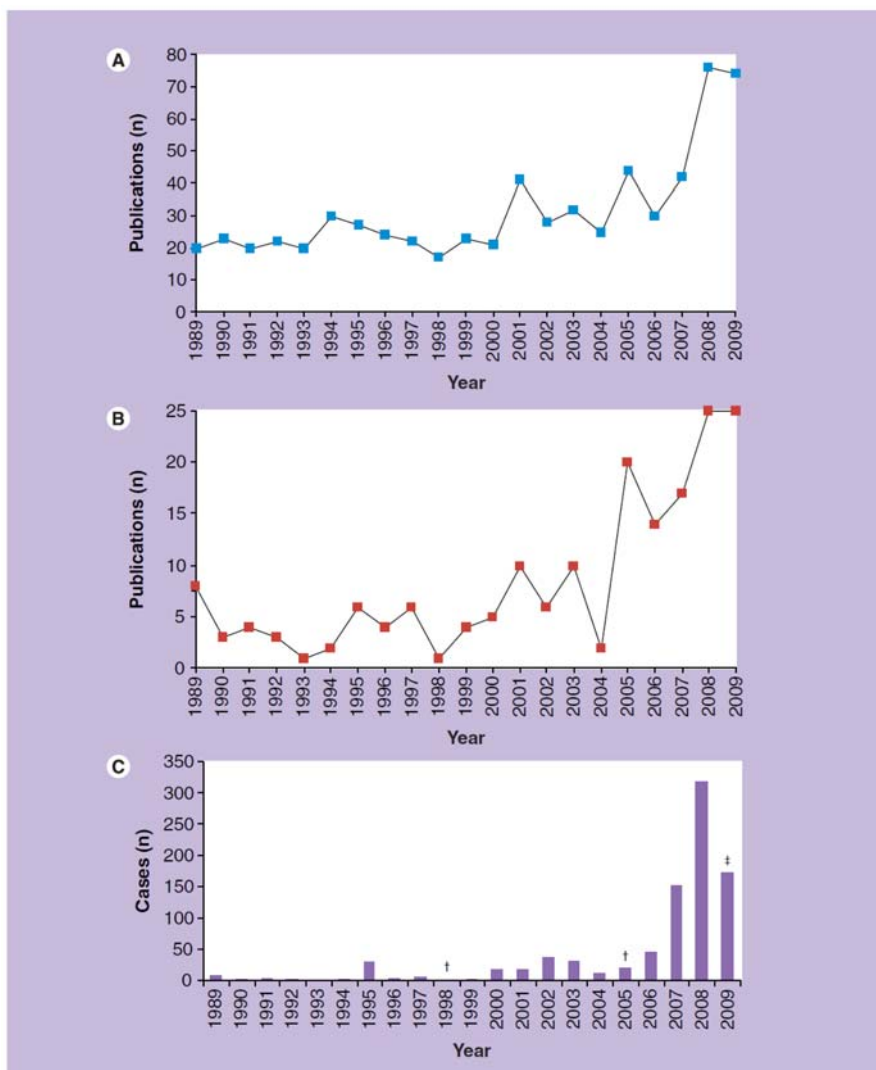
**Financial and competing interest disclosure**

Funding for *S. suis* research was provided by the National Science and Engineering Research Council of Canada (CRSNG) to MG (grant 154280 and Discovery Accelerator Supplement) and to MS (grant 342150-07), collaborating project Quebec-Chine PSR-SIIRI-102 from the Ministère de Développement économique, innovation et exportation du Québec to MG and MS, and 973 Program (2005CB522904) from the Ministry of Science and Technology, China to JX. The authors have no financial interest or financial conflict with the subject matter or material discussed in this manuscript.



**Figure 1. Proposed hypotheses for the different steps involved in the pathogenesis of meningitis due to *Streptococcus suis* serotype 2.** (A & C) show *S. suis* interactions with epithelial cells from the upper respiratory tract (colonization) and access to blood. Hem<sup>+</sup> strains may use cell disruption (toxicity) and invasion to reach the bloodstream, while mechanisms used by adhered Hem<sup>-</sup> strains are still uncertain (A). A hypothesis suggested that *S. suis* could also be directly uptaken by Mo/Mφ and enter to the bloodstream within circulating cells (B). However, this step remains unlikely as *S. suis* is highly resistant to phagocytosis. Other routes of entry might include skin abrasions and oral contamination followed by intestinal tract translocation. (C) Once in the bloodstream, well-encapsulated *S. suis* strains are able to resist complement-mediated phagocytosis and killing. Indeed, encapsulated *S. suis* was shown to be largely attached to, but not ingested by, Mo/Mφs. As such, bacterial traveling in blood would proceed mainly as free bacteria (D), and also as Mo-associated, extracellular bound bacteria (E). Bacteria travelling in blood will result in bacteremia or septicemia, which may lead to septic shock. (F–J) describe the possible mechanisms used by *S. suis* to cross the BBB. (F) Free Hem<sup>+</sup> strains would enter the CNS after increasing BBB permeability, via direct cell toxicity, due to suilysin production. While apoptosis might also be involved, necrosis of BBB-forming cells is suggested as the main mechanism used by these strains. In addition, Hem<sup>+</sup> bacteria have been reported to induce cytokine production, AA, PGE and MMP by BBB-forming cells. This inflammatory response would also contribute to increased BBB permeability, allowing free bacteria access to the CNS. (G) Free Hem<sup>-</sup> bacteria have been suggested to induce mainly apoptosis, possibly by the release of bacterial proteases or other unknown factors. Cytokine

production induced by Hem- bacteria would also contribute to increased BBB permeability. AA, PGE and MMP production induced by Hem-bacteria have not been reported/evaluated so far and, thus, the role of different bacterial components in the induction of these mediators remains to be evaluated. Nevertheless, the inflammatory response induced by both Hem+ and Hem-free bacteria could also increase CAM expression and leukocyte migration, which in turn 'open the door' to free bacterial trafficking (H). (I) Recently, direct invasion and translocation of free bacteria, either Hem+ or Hem-, across BBB cells has been reported as another way used by *S. suis* to cross the BBB. Finally, Mo-associated bacteria would enter the CNS via the 'Trojan horse' (bacteria inside cells, less probable) or 'modified Trojan horse' (bacteria adhered to cells, most probably) mechanism favored by activated phagocyte cytokine, PGE and MMP release (J). AA: Arachidonic acid; BBB: Blood-brain barrier; C': Complement; CAM: Cell adhesion molecule; Hem-: Hemolysin-negative strains; Hem+: Hemolysin-positive strains; Mo: Monocyte; Mf: Macrophage; MMP: Matrix metalloproteinase; PGE: Prostaglandin E.



**Figure 2. Number of publications on *Streptococcus suis* and of *S. suis*-related human cases per year from January 1989 to November 2009 as cited by PubMed and ScienceDirect databases. (A) Total number of publications about *S. suis* (swine, humans and/or other species). (B) Number of publications on *S. suis* infection in humans only. This includes review articles about zoonotic aspects of *S. suis* infections, case reports and epidemiological studies in humans. (C) Number of confirmed, reported individual human cases of *S. suis* infection per year. †The 215 cases officially reported during the 2005 outbreak in Sichuan Province and the 25 cases of 1998 outbreak in Jiangsu Province, both in China, were excluded from the analysis to accurately follow the evolution of *S. suis* human disease. ‡Only 11 months of 2009 were included.**

## References

1. Higgins R, Gottschalk M: Streptococcal Diseases. In: *Diseases of swine*. Straw B E, D'allaire S, Mengeling W L, Taylor D J (Eds), Iowa State University, Ames, 769-783 (2005).
2. Clifton-Hadley F A, Alexander T J, Enright M R: Monitoring herds for *Streptococcus suis* type 2: chance contamination of slaughter pigs. *Vet. Rec.* 118(10), 274 (1986).
3. Cloutier G, D'allaire S, Martinez G, Surprenant C, Lacouture S, Gottschalk M: Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. *Vet. Microbiol.* 97(1-2), 135-151 (2003).
4. Sanford S E, Tilker M E: *Streptococcus suis* type II-associated diseases in swine: observations of a one-year study. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181(7), 673-676 (1982).
5. Sihvonen L, Kurl D N, Henrichsen J: *Streptococcus suis* isolated from pigs in Finland. *Acta Vet. Scand.* 29(1), 9-13 (1988).
6. Keymer I F, Heath S E, Wood J G: *Streptococcus suis* type II infection in a raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) family Canidae. *Vet. Rec.* 113(26-27), 624 (1983).
7. Roels S, Devroye O, Buys H, Smith H, Butaye P: Isolation of *Streptococcus suis* from a cat with meningoencephalitis. *Vet. Microbiol.* 136(1-2), 206-207 (2009).
8. Staats J J, Feder I, Okwumabua O, Chengappa M M: *Streptococcus suis*: past and present. *Vet. Res. Commun.* 21(6), 381-407 (1997).
9. Devriese L A, Haesebrouck F: *Streptococcus suis* infections in horses and cats. *Vet. Rec.* 130(17), 380 (1992).
10. Devriese L A, Hommez J, Pot B, Haesebrouck F: Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. *J. Appl. Bacteriol.* 77(1), 31-36 (1994).
11. Devriese L A, Sustronck B, Maenhout T, Haesebrouck F: *Streptococcus suis* meningitis in a horse. *Vet. Rec.* 127(3), 68 (1990).
12. Arends J P, Zanen H C: Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev. Infect. Dis.* 10(1), 131-137 (1988).
13. De Moor C E: Septicaemic infections in pigs, caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designated R, S, and T. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 29(4), 272-280 (1963).
14. Elliott S D, Mccarty M, Lancefield R C: Teichoic acids of group D streptococci with special reference to strains from pig meningitis (*Streptococcus suis*). *J. Exp. Med.* 145(3), 490-499 (1977).
15. Elliott S D, Tai J Y: The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. *J. Exp. Med.* 148(6), 1699-1704 (1978).
16. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal K R, Henrichsen J: Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 27(12), 2633-2636 (1989).
17. Perch B, Pedersen K B, Henrichsen J: Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 17(6), 993-996 (1983).
18. Facklam R: What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(4), 613-630 (2002).
19. De La Hoz Adame M E, De La Rubia Martin F, Dominguez Fuentes B, Garcia Gil D: Acute meningitis caused by *Streptococcus suis*: review of a case in a splenectomized patient. *An. Med. Interna* 22(10), 507 (2005).
20. Tarradas C, Luque I, De Andres D *et al.*: Epidemiological relationship of human and swine *Streptococcus suis* isolates. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 48(5), 347-355 (2001).
21. Rasmeechan S, Sribusara P: *Streptococcus suis* meningitis: the newest serious infectious disease. *J. Med. Assoc. Thai.* 91(5), 654-658 (2008).
22. Poggenborg R, Gaini S, Kjaeldgaard P, Christensen J J: *Streptococcus suis*: meningitis, spondylodiscitis and bacteraemia with a serotype 14 strain. *Scand. J. Infect. Dis.* 40(4), 346-349 (2008).
23. Kilpper-Bälz R, Schleifer K H: *Streptococcus suis* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37 (12), 160-162 (1987).

24. Chatellier S, Gottschalk M, Higgins R, Brousseau R, Harel J: Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. *J. Clin. Microbiol.* 37(2), 362-366 (1999).
25. Holden M T, Hauser H, Sanders M *et al.*: Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *PLoS One* 4(7), 6072 (2009).
26. Chen C, Tang J, Dong W *et al.*: A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *Streptococcus suis* serotype 2 Chinese isolates. *PLoS ONE* 2(3), 315 (2007).
27. Brousseau R, Hill J E, Prefontaine G, Goh S H, Harel J, Hemmingsen S M: *Streptococcus suis* serotypes characterized by analysis of chaperonin 60 gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(10), 4828-4833 (2001).
28. Hill J E, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen S M, Goh S H: Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet. Microbiol.* 107(1-2), 63-69 (2005).
29. Galina L, Collins J E, Pijoan C: Porcine *Streptococcus suis* in Minnesota. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4(2), 195-196 (1992).
30. Higgins R, Gottschalk M: Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 2000. *Can. Vet. J.* 42(3), 223 (2001).
31. Kataoka Y, Sugimoto C, Nakazawa M, Morozumi T, Kashiwazaki M: The epidemiological studies of *Streptococcus suis* infections in Japan from 1987 to 1991. *J. Vet. Med. Sci.* 55(4), 623-626 (1993).
32. Reams R Y, Harrington D D, Glickman L T, Thacker H L, Bowersock T L: Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8(1), 119-121 (1996).
33. Messier S, Lacouture S, Gottschalk M: Distribution of *Streptococcus suis* capsular types from 2001 to 2007. *Can. Vet. J.* 49(5), 461-462 (2008).
34. Fittipaldi N, Fuller T E, Teel J F *et al.*: 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.* (2009).
35. Wisselink H J, Smith H E, Stockhofe-Zurwieden N, Peperkamp K, Vecht U: 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(3), 237-248 (2000).
36. Wei Z, Li R, Zhang A *et al.*: Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. *Vet. Microbiol.* 137(1-2), 196-201 (2009).
37. Heath P J, Hunt B W, Duff J P, Wilkinson J D: *Streptococcus suis* serotype 14 as a cause of pig disease in the UK. *Vet. Rec.* 139(18), 450-451 (1996).
38. Tian Y, Aarestrup F M, Lu C P: Characterization of *Streptococcus suis* serotype 7 isolates from diseased pigs in Denmark. *Vet. Microbiol.* 103(1-2), 55-62 (2004).
39. Devriese L A, Ceysens K, Hommez J, Kilpper-Balz R, Schleifer K H: Characteristics of different *Streptococcus suis* ecovars and description of a simplified identification method. *Vet. Microbiol.* 26(1-2), 141-150 (1991).
40. Marois C, Le Devendec L, Gottschalk M, Kobisch M: Detection and molecular typing of *Streptococcus suis* in tonsils from live pigs in France. *Can. J. Vet. Res.* 71(1), 14-22 (2007).
41. Martinez G, Harel J, Lacouture S, Gottschalk M: Genetic diversity of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 1/2 isolates recovered from carrier pigs in closed herds. *Can. J. Vet. Res.* 66(4), 240-248 (2002).
42. Okwumabua O, O'connor M, Shull E: A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* 218(1), 79-84 (2003).
43. Del Campo Sepulveda E M, Altman E, Kobisch M, D'allaire S, Gottschalk M: Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. *Vet. Microbiol.* 52(1-2), 113-125 (1996).
44. Allen a G, Bolitho S, Lindsay H *et al.*: Generation and characterization of a defined mutant of *Streptococcus suis* lacking suilysin. *Infect. Immun.* 69(4), 2732-2735 (2001).

45. Vecht U, Stockhofe-Zurwieden N, Tetenburg B J, Wisselink H J, Smith H E: Virulence of *Streptococcus suis* type 2 for mice and pigs appeared host-specific. *Vet. Microbiol.* 58(1), 53-60 (1997).
46. Charland N, Jacques M, Lacouture S, Gottschalk M: Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 1/2. *Microbiology* 143 (11), 3607-3614 (1997).
47. Busque P, Higgins R, Caya F, Quessy S: Immunization of pigs against *Streptococcus suis* serotype 2 infection using a live avirulent strain. *Can. J. Vet. Res.* 61(4), 275-279 (1997).
48. Quessy S, Dubreuil J D, Higgins R: Immunization of mice against *Streptococcus suis* serotype 2 infections using a live avirulent strain. *Can. J. Vet. Res.* 58(4), 299-301 (1994).
49. Kataoka Y, Haritani M, Mori M *et al.*: Experimental infections of mice and pigs with *Streptococcus suis* type 2. *J. Vet. Med. Sci.* 53(6), 1043-1049 (1991).
50. Beaudoin M, Higgins R, Harel J, Gottschalk M: Studies on a murine model for evaluation of virulence of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 78, 111-116 (1992).
51. Domínguez-Punaro M C, Segura M, Plante M 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.* 179 (121), 1842-1854 (2007).
52. Gottschalk M, Higgins R, Quessy S: Dilemma of the virulence of *Streptococcus suis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 37(12), 4202-4203 (1999).
53. Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S, Gottschalk M: *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* 144 (2), 325-332 (1998).
54. Smith H E, Damman M, Van Der Velde J *et al.*: 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(4), 1750-1756 (1999).
55. Gottschalk M, Segura M: The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet. Microbiol.* 76(3), 259-272 (2000).
56. Gottschalk M, Segura M, Xu J: *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim. Health Res. Rev.* 8(4), 29-45 (2007).
57. Baums C G, Valentin-Weigand P: Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Anim. Health Res. Rev.* 10(1), 65-83 (2009).
58. Vecht U, Wisselink H J, Jellema M L, Smith H E: Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect. Immun.* 59(9), 3156-3162 (1991).
59. Silva L M, Baums C G, Rehm T, Wisselink H J, Goethe R, Valentin-Weigand P: Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Vet. Microbiol.* 115(1-3), 117-127 (2006).
60. Gottschalk M G, Lacouture S, Dubreuil J D: Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology* 141 (1), 189-195 (1995).
61. Jacobs A, Loeffen P L, Van Den Berg a J, Storm P K: Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* 62(5), 1742-1748 (1994).
62. Benga L, Fulde M, Neis C, Goethe R, Valentin-Weigand P: Polysaccharide capsule and suilysin contribute to extracellular survival of *Streptococcus suis* co-cultivated with primary porcine phagocytes. *Vet. Microbiol.* 132(1-2), 211-219 (2008).
63. Chabot-Roy G, Willson P, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M: Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microb. Pathog.* 41(1), 21-32 (2006).
64. Charland N, Nizet V, Rubens C E, Kim K S, Lacouture S, Gottschalk M: *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* 68(2), 637-643 (2000).
65. Lalonde M, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M: Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology* 146 (8), 1913-1921 (2000).

66. Segura M, Gottschalk M: *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity. *Infect. Immun.* 70(8), 4312-4322 (2002).
67. 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.* 47(1), 92-106 (2006).
68. Smith H E, Vecht U, Wisselink H J, Stockhofe-Zurwieden N, Biermann Y, Smits M A: Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs. *Infect. Immun.* 64(10), 4409-4412 (1996).
69. Lun S, Perez-Casal J, Connor W, Willson P J: Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microb. Pathog.* 34(1), 27-37 (2003).
70. Galina L, Vecht U, Wisselink H J, Pijoan C: 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(1), 72-74 (1996).
71. Gottschalk M, Lebrun A, Wisselink H, Dubreuil J D, Smith H, Vecht U: Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can. J. Vet. Res.* 62(1), 75-79 (1998).
72. Berthelot-Herault F, Morvan H, Keribin a M, Gottschalk M, Kobisch M: 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(5), 473-479 (2000).
73. Segers R P, Kenter T, De Haan L A, Jacobs a A: Characterisation of the gene encoding suilysin from *Streptococcus suis* and expression in field strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 167(2), 255-261 (1998).
74. Takamatsu D, Wongsawan K, Osaki M *et al.*: *Streptococcus suis* in humans, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 14(1), 181-183 (2008).
75. Madsen L W, Svensmark B, Elvestad K, Aalbaek B, Jensen H E: *Streptococcus suis* serotype 2 infection in pigs: new diagnostic and pathogenetic aspects. *J. Comp. Pathol.* 126(1), 57-65 (2002).
76. Norton P M, Rolph C, Ward P N, Bentley R W, Leigh J A: Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 26(1), 25-35 (1999).
77. Valentin-Weigand P: Intracellular invasion and persistence: survival strategies of *Streptococcus suis* and *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 117(11-12), 459-463 (2004).
78. Benga L, Goethe R, Beilage E G, Valentin-Weigand P: Immunogenicity of murein-associated proteins from temperature-stressed *Streptococcus suis* cultures. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 51(6), 272-277 (2004).
79. Van Calsteren M-R, Gagnon F, Guertin N *et al.*: Structural characterization of *Streptococcus suis* type 2 capsular polysaccharide. Presented at: XXIV International Carbohydrate Symposium. Oslo, Norway, 27 July-1 August 2008.
80. Williams a E: Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 isolates. *Microb. Pathog.* 8(3), 189-196 (1990).
81. Williams a E, Blakemore W F: Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J. Infect. Dis.* 162(2), 474-481 (1990).
82. Benga L, Friedl P, Valentin-Weigand P: Adherence of *Streptococcus suis* to porcine endothelial cells. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52(9), 392-395 (2005).
83. Vanier G, Segura M, Friedl P, Lacouture S, Gottschalk M: Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect. Immun.* 72(3), 1441-1449 (2004).
84. Tenenbaum T, Adam R, Eggelnpohler I *et al.*: Strain-dependent disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier by *Streptococcus suis* in vitro. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 44(1), 25-34 (2005).
85. Tenenbaum T, Essmann F, Adam R *et al.*: Cell death, caspase activation, and HMGB1 release of porcine choroid plexus epithelial cells during *Streptococcus suis* infection in vitro. *Brain Res.* 1100(1), 1-12 (2006).



86. Tenenbaum T, Papandreou T, Gellrich D *et al.*: Polar bacterial invasion and translocation of *Streptococcus suis* across the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro. *Cell Microbiol.* 11(2), 323-336 (2009).
87. Tenenbaum T, Matalon D, Adam R *et al.*: Dexamethasone prevents alteration of tight junction-associated proteins and barrier function in porcine choroid plexus epithelial cells after infection with *Streptococcus suis* in vitro. *Brain Res.* 1229 (1), 1-17 (2008).
88. Walsh B, Williams a E, Satsangi J: *Streptococcus suis* type 2: pathogenesis and clinical disease. *Rev. Med. Microbiol.* 3 (1) 65-71 (1992).
89. Huang Y T, Teng L J, Ho S W, Hsueh P R: *Streptococcus suis* infection. *J Microbiol Immunol. Infect.* 38(5), 306-313 (2005).
90. Wertheim H F, Nghia H D, Taylor W, Schultsz C: *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clin. Infect. Dis.* 48(5), 617-625 (2009).
91. Lun Z R, Wang Q P, Chen X G, Li a X, Zhu X Q: *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect. Dis.* 7(3), 201-209 (2007).
92. Voutsadakis I A: *Streptococcus suis* endocarditis and colon carcinoma: a case report. *Clin. Colorectal. Cancer* 6(3), 226-228 (2006).
93. Suankratay C, Intalaporn P, Nunthapisud P, Arunyingmongkol K, Wilde H: *Streptococcus suis* meningitis in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 35(4), 868-876 (2004).
94. Fongcom A, Pruksakorn S, Mongkol R, Tharavichitkul P, Yoonim N: *Streptococcus suis* infection in northern Thailand. *J. Med. Assoc. Thai* 84(10), 1502-1508 (2001).
95. Lutticken R, Temme N, Hahn G, Bartelheimer E W: Meningitis caused by *Streptococcus suis*: case report and review of the literature. *Infection* 14(4), 181-185 (1986).
96. Navacharoen N, Chantharochavong V, Hanprasertpong C, Kangsanarak J, Lekagul S: Hearing and vestibular loss in *Streptococcus suis* infection from swine and traditional raw pork exposure in northern Thailand. *J. Laryngol. Otol.* 123(8), 857-862 (2009).
97. Tang J, Wang C, Feng Y *et al.*: Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Med.* 3(5), 151 (2006).
98. Ma E, Chung P H, So T *et al.*: *Streptococcus suis* infection in Hong Kong: an emerging infectious disease? *Epidemiol. Infect.* 136(12), 1691-1697 (2008).
99. Strangmann E, Froleke H, Kohse K P: Septic shock caused by *Streptococcus suis*: case report and investigation of a risk group. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 205(5), 385-392 (2002).
100. Rojas M T, Gottschalk M, Velázquez-Ordóñez V: Evaluación de la virulencia y serotipos de *Streptococcus suis* asilados de trabajadores de rastros en el valle de Toluca, Estado de México, México. *Vet. Méx.* 32 (3), 201-205 (2001).
101. Sala V, Colombo A, Gerola L: Infection risks of *Streptococcus suis* type 2 localizations in slaughtered swines. *Arch. vet. ital.* 40 (3), 180-184 (1989).
102. Lee G T, Chiu C Y, Haller B L, Denn P M, Hall C S, Gerberding J L: *Streptococcus suis* meningitis, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 14(1), 183-185 (2008).
103. Willenburg K S, Sentochnik D E, Zadoks R N: Human *Streptococcus suis* meningitis in the United States. *N. Engl. J. Med.* 354(12), 1325 (2006).
104. Smith T C, Capuano a W, Boese B, Myers K P, Gray G C: Exposure to *Streptococcus suis* among US swine workers. *Emerg. Infect. Dis.* 14(12), 1925-1927 (2008).
105. Robertson I D, Blackmore D K: Occupational exposure to *Streptococcus suis* type 2. *Epidemiol. Infect.* 103(1), 157-164 (1989).
106. Kopic J, Paradzik M T, Pandak N: *Streptococcus suis* infection as a cause of severe illness: 2 cases from Croatia. *Scand. J. Infect. Dis.* 34(9), 683-684 (2002).
107. Lopreto C, Lopardo H A, Bardi M C, Gottschalk M: Primary *Streptococcus suis* meningitis: first case in humans described in Latin America.. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 23(2), 110 (2005).
108. Watkins E J, Brooksby P, Schweiger M S, Enright S M: Septicaemia in a pig-farm worker. *Lancet* 357(9249), 38 (2001).
109. Baddeley P G: *Streptococcus suis* infection. *Occup. Med.* 45(4), 222 (1995).
110. Auer J, Berent R, Porodko M, Eber B: *Streptococcus* infection and splenectomy. *Lancet* 357(9262), 1130 (2001).
111. Tambyah P A, Lee K O: *Streptococcus* infection and splenectomy. *Lancet* 357(9262), 1130-1131 (2001).
112. Gallagher F: *Streptococcus* infection and splenectomy. *Lancet* 357(9262), 1129-1130 (2001).

113. Nagel A, Manias V, Busquets N, Sniadowsky S, Anzardi J, Mendez Ede L: *Streptococcus suis* meningitis in an immunocompetent patient. *Rev. Argent. Microbiol.* 40(3), 158-160 (2008).
114. Bahloul H, Mofredj A, Mrabet A, Gineyt G, Rousselier P: *Streptococcus suis* meningitis after oral contamination?. *Med. Mal. Infect.* 38(5), 281-282 (2008).
115. Van De Beek D, Spanjaard L, De Gans J: *Streptococcus suis* meningitis in the Netherlands. *J. Infect.* 57(2), 158-161 (2008).
116. Chang B, Wada A, Ikebe T *et al.*: Characteristics of *Streptococcus suis* Isolated from Patients in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59(6), 397-399 (2006).
117. Halaby T, Hoitsma E, Hupperts R, Spanjaard L, Luirink M, Jacobs J: *Streptococcus suis* meningitis, a poacher's risk. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19(12), 943-945 (2000).
118. Grebe T, Bergenthal D, Fahr a M, Scheja H W: Meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2 in an adult. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 122(41), 1244-1247 (1997).
119. Rosenkranz M, Elsner H A, Sturenburg H J, Weiller C, Rother J, Sobottka I: *Streptococcus suis* meningitis and septicemia contracted from a wild boar in Germany. *J. Neurol.* 250(7), 869-870 (2003).
120. Baums C G, Verkuhlen G J, Rehm T *et al.*: Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in wild boars of Northwestern Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(3), 711-717 (2006).
121. Wangkaew S, Chaiwarith R, Tharavichitkul P, Supparatpinyo K: *Streptococcus suis* infection: a series of 41 cases from Chiang Mai University Hospital. *J. Infect.* 52(6), 455-460 (2006).
122. Mai N T, Hoa N T, Nga T V *et al.*: *Streptococcus suis* meningitis in adults in Vietnam. *Clin. Infect. Dis.* 46, 659-667 (2008).
123. Wertheim H F, Nguyen H N, Taylor W *et al.*: *Streptococcus suis*, an important cause of adult bacterial meningitis in northern Vietnam. *PLoS One* 4(6), e5973 (2009).
124. Manzin A, Palmieri C, Serra C *et al.*: *Streptococcus suis* meningitis without history of animal contact, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 14(12), 1946-1948 (2008).
125. Hidalgo A, Ropero F, Palacios R, Garcia V, Santos J: Meningitis due to *Streptococcus suis* with no contact with pigs or porcine products. *J. Infect.* 55(5), 478 (2007).
126. Kerdsin A, Oishi K, Sripakdee S *et al.*: Clonal Dissemination of *Streptococcus suis* serotype 14 in humans living in Thailand. *J. Med. Microbiol.* [Epub ahead of print] (2009).
127. Wangsomboonsiri W, Luksananun T, Saksornchai S, Ketwong K, Sungkanuparph S: *Streptococcus suis* infection and risk factors for mortality. *J. Infect.* 57(5), 392-396 (2008).
128. Ip M, Fung K S, Chi F *et al.*: *Streptococcus suis* in Hong Kong. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 57(1), 15-20 (2007).
129. Ye C, Zhu X, Jing H *et al.*: *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerg. Infect. Dis.* 12(8), 1203-1208 (2006).
130. Cheung P Y, Lo K L, Cheung T T, Yeung W H, Leung P H, Kam K M: *Streptococcus suis* in retail markets: how prevalent is it in raw pork? *Int. J. Food Microbiol.* 127(3), 316-320 (2008).
131. Vilaichone R K, Vilaichone W, Nunthapisud P, Wilde H: *Streptococcus suis* infection in Thailand. *J. Med. Assoc. Thai.* 85 Suppl 1, S109-117 (2002).
132. Michaud S, Duperval R, Higgins R: *Streptococcus suis* meningitis: First case reported in Quebec. *Can. J. Infect. Dis.* 7, 329-331 (1996).
133. Tsai H C, Lee S S, Wann S R, Huang T S, Chen Y S, Liu Y C: *Streptococcus suis* meningitis with ventriculoperitoneal shunt infection and spondylodiscitis. *J. Formos. Med. Assoc.* 104(12), 948-950 (2005).
134. Yen M Y, Liu Y C, Wang J H, Chen Y S, Wang Y H, Cheng D L: *Streptococcus suis* meningitis complicated with permanent perceptive deafness: report of a case. *J. Formos. Med. Assoc.* 93(4), 349-351 (1994).
135. Donsakul K, Dejthevaporn C, Witoonpanich R: *Streptococcus suis* infection: clinical features and diagnostic pitfalls. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 34(1), 154-158 (2003).
136. Trottier S, Higgins R, Brochu G, Gottschalk M: A case of human endocarditis due to *Streptococcus suis* in North America. *Rev. Infect. Dis.* 13(6), 1251-1252 (1991).

137. Cortes P R, Orio a G, Regueira M, Pinas G E, Echenique J: Characterization of in vitro-generated and clinical optochin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Argentina. *J. Clin. Microbiol.* 46(6), 1930-1934 (2008).
138. Prieto C, Garcia F J, Suarez P, Imaz M, Castro J M: Biochemical traits and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughtered pigs. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 41(9), 608-617 (1994).
139. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Beaudoin M, Henrichsen J: Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9-22. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3(1), 60-65 (1991).
140. Heidt M C, Mohamed W, Hain T, Vogt P R, Chakraborty T, Domann E: Human infective endocarditis caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *J. Clin. Microbiol.* 43(9), 4898-4901 (2005).
141. Higgins R, Gottschalk M: An update on *Streptococcus suis* identification. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2(3), 249-252 (1990).
142. Maclennan M, Foster G, Dick K, Smith W J, Nielsen B: *Streptococcus suis* serotypes 7, 8 and 14 from diseased pigs in Scotland. *Vet. Rec.* 139(17), 423-424 (1996).
143. Alonso-Socas Mdel M, Aleman-Valls R, Roldan-Delgado H, Gomez-Sirvent J L: Endocarditis and spondylodiscitis caused by *Streptococcus suis*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24(5), 354-355 (2006).
144. Asensi J M, Asensi V, Arias M, Moreno A, Perez F, Navarro R: *Streptococcus suis* meningitis. Report of two cases and literature review. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 19(4), 186-188 (2001).
145. Caumont H, Gerard N, Depernet B, Brasme L, Eschard J P, Etienne J C: *Streptococcus suis* L3-L4 spondylodiscitis in a butcher. *Presse Med.* 25(29), 1348 (1996).
146. Perseghin P, Bezzi G, Troupioti P, Gallina M: *Streptococcus suis* meningitis in an Italian blood donor. *Lancet* 346(8985), 1305-1306 (1995).
147. Meecham J S, Worth R C: Persistent diplopia following *Streptococcus suis* type 2 meningitis. *J. R. Soc. Med.* 85(9), 579-580 (1992).
148. Peetermans W E, Moffie B G, Thompson J: Bacterial endocarditis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J. Infect. Dis.* 159(3), 595-596 (1989).
149. Colaert J, Allewaert M, Magerman H, Vandeven J, Vandepitte J: *Streptococcus suis* meningitis in man. First reported observation in Belgium. *Acta Clin. Belg.* 40(5), 314-317 (1985).
150. Camporese A, Tizianel G, Bruschetta G, Cruciatti B, Pomes A: Human meningitis caused by *Streptococcus suis*: the first case report from north-eastern Italy. *Infez. Med.* 15(2), 111-114 (2007).
151. Fauveau L, Mourtada Y, Hazouard E: Meningoencephalitis related-to *Streptococcus suis* in a butcher: relevance of occupational questionnaire at emergency room. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 26(9), 814-815 (2007).
152. Taipa R, Lopes V, Magalhaes M: *Streptococcus suis* meningitis: first case report from Portugal. *J. Infect.* 56(6), 482-483 (2008).
153. Tramontana a R, Graham M, Sinickas V, Bak N: An Australian case of *Streptococcus suis* toxic shock syndrome associated with occupational exposure to animal carcasses. *Med. J. Aust.* 188(9), 538-539 (2008).
154. Haleis A, Alfa M, Gottschalk M, Bernard K, Ronald A, Manickam K: Meningitis caused by *Streptococcus suis* serotype 14, North America. *Emerg. Infect. Dis.* 15(2), 350-352 (2009).
155. Nghia H D, Hoa N T, Linh Le D *et al.*: Human case of *Streptococcus suis* serotype 16 infection. *Emerg. Infect. Dis.* 14(1), 155-157 (2008).
156. Smith H E, Veenbergen V, Van Der Velde J, Damman M, Wisselink H J, Smits M A: The cps genes of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2, and 9: development of rapid serotype-specific PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 37(10), 3146-3152 (1999).
157. Rao S S, Mariathas A, Teare L: Meningitis in a butcher. *Emerg. Med. J.* 25(9), 607-608 (2008).
158. Riquelme E, Escribano E, Blanch J J, Crespo M D: Acute *Streptococcus suis* meningitis in a woman working in a meat market. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 26(4), 256-257 (2008).
159. Kennedy K J, Jadeer a A, Ong C W, Senanayake S N, Collignon P J: Two cases of *Streptococcus suis* endocarditis in Australian piggery workers. *Med. J. Aust.* 189(7), 413 (2008).

160. Pedroli S, Kobisch M, Beauchet O, Chaussinand J P, Lucht F: *Streptococcus suis* bacteremia. *Presse Med.* 32(13), 599-601 (2003).
161. Berthelot-Herault F, Marois C, Gottschalk M, Kobisch M: Genetic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and humans as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 40(2), 615-619 (2002).
162. Yu H, Jing H, Chen Z *et al.*: Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerg. Infect. Dis.* 12(6), 914-920 (2006).
163. Marois C, Le Devendec L, Gottschalk M, Kobisch M: 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(2), 94-104 (2006).
164. Rehm T, Baums C G, Strommenger B, Beyerbach M, Valentin-Weigand P, Goethe R: Amplified fragment length polymorphism of *Streptococcus suis* strains correlates with their profile of virulence-associated genes and clinical background. *J. Med. Microbiol.* 56(1), 102-109 (2007).
165. 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.* 127(2), 243-254 (2002).
166. Princivalli M S, Palmieri C, Magi G *et al.*: Genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs and humans in Italy (2003-2007). *Euro. Surveill.* 14(33), (2009).
167. Vilaichone R K, Mahachai V, Nunthapisud P: *Streptococcus suis* peritonitis: case report. *J. Med. Assoc. Thai.* 83(10), 1274-1277 (2000).
168. Twort C H: Group R streptococcal meningitis (*Streptococcus suis* type II): a new industrial disease? *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 282(6263), 523-524 (1981).
169. Shneerson J M, Chattopadhyay B, Murphy M F, Fawcett I W: Permanent perceptive deafness due to *Streptococcus suis* type II infection. *J. Laryngol. Otol.* 94(4), 425-427 (1980).
170. Marie J, Morvan H, Berthelot-Herault F *et al.*: Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from swine in France and from humans in different countries between 1996 and 2000. *J. Antimicrob. Chemother.* 50(2), 201-209 (2002).
171. Woo J, Li E K: *Streptococcus suis* meningitis requires prolonged treatment with penicillin. *Infection* 15(2), 129-130 (1987).
172. Kay R, Cheng a F, Tse C Y: *Streptococcus suis* infection in Hong Kong. *Qjm.* 88(1), 39-47 (1995).
173. Tayoro J, Besnier J M, Laudat P, Cattier B, Choutet P: Infective endocarditis due to *Streptococcus suis* serotype 2. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15(9), 765-766 (1996).
174. Fittipaldi N, Collins T, Prothero B, Gottschalk M: *Streptococcus suis* meningitis, Hawaii. *Emerg. Infect. Dis.*, In press (2009).
175. Francois B, Gissot V, Ploy M C, Vignon P: Recurrent septic shock due to *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 36(8), 2395 (1998).
176. Breton J, Mitchell W R, Rosendal S: *Streptococcus suis* in slaughter pigs and abattoir workers. *Can. J. Vet. Res.* 50(3), 338-341 (1986).
177. Clifton-Hadley F A, Enright M R: Factors affecting the survival of *Streptococcus suis* type 2. *Vet. Rec.* 114(24), 584-586 (1984).
178. Normile D: Infectious diseases. WHO probes deadliness of China's pig-borne disease. *Science* 309(5739), 1308-1309 (2005).
179. Hashikawa S, Inuma Y, Furushita M *et al.*: Characterization of group C and G streptococcal strains that cause streptococcal toxic shock syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 42(1), 186-192 (2004).
180. Alouf J E, Muller-Alouf H: Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int. J. Med. Microbiol.* 292(7-8), 429-440 (2003).
181. Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420(6917), 885-891 (2002).
182. Herwald H, Cramer H, Morgelin M *et al.*: M protein, a classical bacterial virulence determinant, forms complexes with fibrinogen that induce vascular leakage. *Cell* 116(3), 367-379 (2004).
183. Ulloa L, Tracey K J: The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends Mol. Med.* 11(2), 56-63 (2005).

184. Yang Q P, Liu W P, Guo L X *et al.*: Autopsy report of four cases who died from *Streptococcus suis* infection, with a review of the literature. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28(5), 447-453 (2009).
185. Ma Y, Feng Y, Liu D, Gao G F: Avian influenza virus, *Streptococcus suis* serotype 2, severe acute respiratory syndrome-coronavirus and beyond: molecular epidemiology, ecology and the situation in China. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 364(1530), 2725-2737 (2009).
186. Zhu F, Yang H, Hu X *et al.*: Homogeneity study on the *Streptococcus suis* isolated from human and swine. *Zhonghua. Liu. Xing. Bing. Xue. Za. Zhi.* 21(6), 427-429 (2000).
187. Yao H C, Chen G Q, Lu C P: Identification of isolates of *Streptococcus suis* in Jiangsu province during 1998. *J. Nanjing. Agri. Univ.* 22 (2), 67-70 (1999).
188. Sriskandan S, Slater J D: Invasive disease and toxic shock due to zoonotic *Streptococcus suis*: an emerging infection in the East? *PLoS Med.* 3(5),187 (2006).
189. Zhong N, Zeng G: What we have learnt from SARS epidemics in China. *BMJ* 333(7564), 389-391 (2006).
190. Wenzel R P, Bearman G, Edmond M B: Lessons from severe acute respiratory syndrome (SARS): implications for infection control. *Arch. Med. Res.* 36(6), 610-616 (2005).
191. King S J, Leigh J A, Heath P J *et al.*: Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *J. Clin. Microbiol.* 40(10), 3671-3680 (2002).
192. Ye C, Zheng H, Zhang J *et al.*: Clinical, Experimental, and Genomic Differences between Intermediately Pathogenic, Highly Pathogenic, and Epidemic *Streptococcus suis*. *J. Infect. Dis.* 199, 97-107 (2009).
193. Zheng H, Ye C, Segura M, Gottschalk M, Xu J: Mitogenic effect contributes to increased virulence of *Streptococcus suis* sequence type 7 to cause streptococcal toxic shock-like syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 153(3), 385-391 (2008).
194. Segura M: *Streptococcus suis*: An Emerging Human Threat. *J. Infect. Dis.* 199, 4-6 (2009).
195. Perch B, Kristjansen P, Skadhauge K: Group R streptococci pathogenic for man: two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 74, 69-76 (1968).
196. Hampson D J, Trott D J, Clarke I L, Mwaniki C G, Robertson I D: Population structure of Australian isolates of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 31(11), 2895-2900 (1993).
197. Dupas D, Vignon M, Geraut C: *Streptococcus suis* meningitis. A severe noncompensated occupational disease. *J. Occup. Med.* 34(11), 1102-1105 (1992).
198. Christensen P, Kronvall G: A case of *Streptococcus suis* meningitis--a new occupational disease in Sweden?. *Lakartidningen* 82(3), 119 (1985).
199. Spiss H K, Kofler M, Hausdorfer H, Pfausler B, Schmutzhard E: *Streptococcus suis* meningitis and neurophysiology of the acoustic system. First case report from Austria] *Nervenarzt.* 70(8), 738-741 (1999).
200. Chan Y C, Wilder-Smith A, Ong B K, Kumarasinghe G, Wilder-Smith E: Adult community acquired bacterial meningitis in a Singaporean teaching hospital. A seven-year overview (1993-2000). *Singapore Med. J.* 43(12), 632-636 (2002).
201. Dickie a S, Bremner D A, Wong P Y, North J D, Robertson I D: *Streptococcus suis* bacteraemia. *N. Z. Med. J.* 100(835), 677-678 (1987).
202. Dragojlovic J, Milosevic B, Sasic N, Pelemis M, Sasic M: *Streptococcus suis* infection--clinical manifestations. *Med. Pregl.* 58(5-6), 236-239 (2005).
203. Hui a C, Ng K C, Tong P Y *et al.*: Bacterial meningitis in Hong Kong: 10-years' experience. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 107(5), 366-370 (2005).
204. Lavine G: Researchers scan horizon for emerging infectious disease threats. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 65(23), 2190, 2192 (2008).
205. Torok M: Neurological infections: clinical advances and emerging threats. *Lancet Neurol.* 6(1), 16-18 (2007).
206. Van Jaarsveld B C, Van Kregten E, Van Kesteren R G, Rozenberg-Arska M, Bartelink a K: Fulminant sepsis caused by *Streptococcus suis*. *Ned. Tijdschr. Geneeskd.* 134(30), 1462-1464 (1990).
207. Bungener W, Bialek R: Fatal *Streptococcus suis* septicemia in an abattoir worker. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8(4), 306-308 (1989).

**Websites**

301. [Amendment to Quarantine and Prevention of Disease Ordinance Cap 141, 2005  
www.chp.gov.hk/letters.asp?lang=en&id=31&pid=13.](http://www.chp.gov.hk/letters.asp?lang=en&id=31&pid=13)
302. Toxic-Shock Syndrome (TSS) definition as per the Center for Disease Control.  
<http://www.cdc.gov/epo/dphsi/casedef/toxicsscurrent.htm>
303. Streptococcal Toxic-Shock Syndrome (STSS) definition as per the Center for Disease Control.  
<http://www.cdc.gov/epo/dphsi/casedef/streptococcalcurrent.htm>

## ANNEXE, ARTICLE VI

### Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 14 capsular polysaccharide

Marie-Rose Van Calsteren<sup>a</sup>, Fleur Gagnon<sup>a</sup>, Cynthia Calzas<sup>b</sup>, Guillaume Goyette-Desjardins<sup>b</sup>, Masatoshi Okura<sup>c</sup>, Daisuke Takamatsu<sup>c</sup>, Marcelo Gottschalk<sup>b</sup>, Mariela Segura<sup>b</sup>

Food Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada<sup>a</sup>; Laboratory of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada<sup>b</sup>; National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Ibaraki, Japan<sup>c</sup>

Publié dans: *Biochem Cell Biol.* **2013.** 91(2):49-58.

doi: 10.1139/bcb-2012-0036.

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

J'ai participé partiellement aux expériences de purification et de tests de contrôle qualité de la CPS.

## Abstract

The capsular polysaccharide (CPS) of *Streptococcus suis* serotype 14 was purified, chemically modified, and characterized. Sugar and absolute configuration analyses gave the following CPS composition: D-Gal, 3; D-Glc, 1; D-GlcNAc, 1; D-Neu5Ac, 1. The *Sambucus nigra* lectin, which recognizes the Neu5Ac( $\alpha$ 2–6)Gal/GalNAc sequence, showed binding to the native CPS. Sialic acid was found to be terminal, and the CPS was quantitatively desialylated by mild acid hydrolysis. It was also submitted to periodate oxidation followed by borohydride reduction and Smith degradation. Sugar and methylation analyses,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance, and mass spectrometry of the native CPS or of its specifically modified products allowed to determine the repeating unit sequence:  $[\text{6}][\text{Neu5Ac}(\alpha\text{2-6})\text{Gal}(\beta\text{1-4})\text{GlcNAc}(\beta\text{1-3})]\text{Gal}(\beta\text{1-3})\text{Gal}(\beta\text{1-4})\text{Glc}(\beta\text{1-})_n$ . *S. suis* serotype 14 CPS has an identical sialic acid-containing side chain as serotype 2 CPS, but differs by the absence of rhamnose in its composition. The same side chain is also present in group B *Streptococcus* type Ia CPS, except that in the latter sialic acid is 2,3- rather than 2,6-linked to the following galactose. A correlation between the *S. suis* CPS sequence and genes of the serotype 14 *cps* locus encoding putative glycosyltransferases and polymerase responsible for the biosynthesis of the repeating unit is proposed.



## Introduction

*Streptococcus suis* is a major swine pathogen responsible for important economic losses to the swine industry worldwide and an emerging zoonotic agent of meningitis and streptococcal toxic shock-like syndrome (Gottschalk et al. 2010). Since the recent recognition of the high prevalence of *S. suis* human disease in Asia, the interest of the scientific community in this pathogen has significantly increased (Gottschalk et al. 2010). In western countries, *S. suis* infections in humans have been mainly restricted to workers in close contact with pigs or swine by-products (Gottschalk et al. 2007). However, in Southeast and East Asia, this bacterium affects not only that population at risk but also the general population, and it represents a significant public health concern (Gottschalk et al. 2010). In the very last years, as a direct consequence of these intensified research efforts, large amounts of data on putative virulence factors have appeared in the literature (Fittipaldi et al. 2012). Among them, the capsular polysaccharide (CPS) is considered to be the most critical for bacterial virulence (Baums and Valentin-Weigand 2009; Fittipaldi et al. 2012). Of the 35 serotypes described, most studies have been done on *S. suis* serotype 2, which is classically associated with swine and human disease (Gottschalk et al. 2010). Indeed, only serotype 2 CPS has been structurally characterized (Van Calsteren et al. 2010). In addition to serotype 2, *S. suis* serotype 14 has been described as being an important swine pathogen and an emerging zoonotic agent. Human cases of meningitis and severe sepsis with shock and multiple organ failure have been described in western countries, including Canada (Gottschalk et al. 1989; Haleis et al. 2009; Watkins et al. 2001), and many strains are isolated each year from diseased pigs (M. Gottschalk, unpublished observations). More recently, many human cases caused by a single serotype 14 clone have been described in Thailand (Kerdsin et al. 2009). Our knowledge on the pathogenesis of the disease induced by *S. suis* serotype 14 or on the virulence factors involved is scarce. The only information available is the presence of sialic acid in its CPS (Charland et al. 1995; Smith et al. 2000). Sialic acid has been shown to be an important virulence factor for other meningitis-causing bacteria (Severi et al. 2007). The complete genome sequence of this serotype has recently been published (Hu et al. 2011). We report here for the first time the structure determination of *S. suis* serotype 14 CPS using chemical, chromatographic, and spectroscopic methods. Lectin binding, physicochemical properties, and biosynthesis were also investigated. The CPS structure was compared with that of other streptococcal antigens.

## Materials and Methods

### *Capsule production and extraction, and capsular polysaccharide isolation and purification*

*S. suis* serotype 14 reference strain DAN 13730 was used in this study. Bacteria were grown in 5 ml of Todd-Hewitt broth (THB) (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada) during 16 h at 37 °C. After a dilution of 1/40, bacteria were grown in 150 ml of fresh THB for 16 h, then diluted to 6 L in fresh THB, and grown to an optical density (OD) at 540 nm of 0.8. The cells were pelleted by centrifugation at 10 000g for 40 min, suspended by repeated pipetting in a buffer containing 33 mmol/L phosphate and 145 mmol/L NaCl pH 8.0, and chilled. The purified CPS was obtained after extraction, precipitation, and gel filtration as described previously (Van Calsteren et al. 2010). Briefly, the cell suspension was autoclaved at 121 °C for 75 min. The supernatant containing the crude capsule was recovered by centrifugation at 9000g for 50 min. Extraction with an equal volume of chloroform eliminated lipids, whereas nucleic acids were removed by precipitation by adding CaCl<sub>2</sub> to 0.1 mol/L and ethanol to 25% v/v, and then centrifuged at 7200g for 30 min at room temperature. The concentration of ethanol in the supernatant was increased to 80% v/v to precipitate the CPS. The suspension was kept overnight at 4 °C and then centrifuged at 9100g for 30 min at 4 °C. Pellets were dissolved in 50 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (40 mL), dialyzed against the same solution for 48 h with a Spectra/Por 2 membrane (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, Calif., USA) MWCO 12–14 kDa, and freeze dried. The CPS was further purified by gel filtration chromatography on a XK26-100 column filled with Sephacryl S-400 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) eluted with 50 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> at a flow rate of 1.3 ml/min, using a Knauer Smartline system equipped with a differential refractometer model RI 2300 and an UV detector model 2600 (Knauer, Berlin, Germany). UV signals were recorded at 254 and 280 nm. Fractions were collected and assayed for CPS by dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) with an anti-*S. suis* serotype 14 rabbit polyclonal antibody (1/1000) as the primary antibody and horseradish peroxidase-conjugated (HRP-conjugated) goat anti-rabbit Fc secondary antibody (1/3000) (Higgins and Gottschalk 1990). Fractions giving a positive response with antibodies but no absorption at 280 and 254 nm were pooled and freeze dried. The purified residue was dissolved in water, dialyzed as above against deionized water for 48 h at 4 °C, and freeze dried.

### *Quality controls*

Nucleic acids were quantified using an ND-1000 spectrometer (Nanodrop, Wilmington, Del., USA). The absorbance was measured at 230 and 260 nm. Calculations were done with the Nanodrop software. According to the manufacturer, results are reproducible between 2 and 100 ng/ $\mu$ L.

Protein was quantified by the modified Lowry protein assay kit from Pierce (Rockford, Ill., USA) on 1 mg/mL CPS samples using a standard curve prepared with diluted albumin standards from 1 to 500 or 1000  $\mu$ g/mL. The calculated limit of detection ( $P \leq 0.05$ ) was 2–5  $\mu$ g/mL.

C, H, N, and S elemental analysis was performed on a Fisons Instruments SPA, model EA1108, by the Laboratoire d'analyse élémentaire of the Département de chimie of Université de Montréal.

### *Mild acid hydrolysis*

The CPS (12 mg) was heated in 70 mmol/L HCl (1.2 mL) at 60 °C for 250 min, neutralized with 2 mol/L  $\text{NH}_4\text{OH}$ , dialyzed against deionized water for 48 h at 4 °C with a Spectra/Por membrane MWCO 3500 Da (Spectrum Laboratories), and freeze dried.

### *Physicochemical characterization*

Polysaccharides were characterized by size-exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering (SEC–MALS). The chromatographic separation was performed with two 8 mm  $\times$  300 mm Shodex OHpak gel filtration columns connected in series (SB-806 and SB-805), preceded by an SB-807G guard column (Showa Denko, Tokyo, Japan). Elution was done with a Waters 510 pump (Waters, Milford, Mass., USA) using a 0.1 mol/L  $\text{NaNO}_3$  mobile phase filtered through a 0.02  $\mu$ m membrane (Whatman, Maidstone, UK), at a flow rate of 0.4 mL/min. Polysaccharide samples were dissolved in the SEC eluent at a concentration of 0.7 mg/mL for the native CPS and 3 mg/mL for the mild acid-hydrolyzed polysaccharide, kept at 4 °C for a maximum of 3 h to minimize the formation of aggregates, and injected with a 100  $\mu$ L sample loop. Molar masses and radii of gyration were determined with a Dawn EOS MALS detector (Wyatt, Santa Barbara, Calif., USA). A differential refractometer model RI 410 (Waters) was used as a concentration detector. A refractive index (RI) increment ( $dn/dc$ ) of 0.137 mL/g was calculated for 690 nm using data for xanthan at 436 and 546 nm (Brandrup et al. 2005), and the

second virial coefficient ( $A_2$ ) was taken as zero. Calculations were performed with the ASTRA software version 6.0.0.108 (Wyatt) using 14 detectors from angles 34.8° to 163.3° (detectors 5–18) for the native CPS and 13 detectors from angles 34.8° to 152.5° (detectors 5–17) for the mild acid-hydrolyzed polysaccharide.

#### *Sugar analysis by methanolysis*

The monosaccharide composition of polysaccharides was determined by methanolysis (York et al. 1986). To 1 mg of sample, 500  $\mu$ L of 1 mol/L methanolic HCl (prepared using 465  $\mu$ L of methanol and 35  $\mu$ L of acetyl chloride) was added, and the solution was heated at 75 °C for 16 h. The cooled solution was evaporated to dryness with a stream of N<sub>2</sub> at 40 °C, and 500  $\mu$ L of *tert*-butanol was added and evaporated to dryness. The methyl glycosides were acetylated with 200  $\mu$ L of pyridine and 200  $\mu$ L of acetic anhydride at 100 °C for 20 min. The cooled solution was partitioned between deionized water and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer containing the peracetylated methyl glycosides was analyzed by gas chromatography (GC) either with flame ionization detection (FID) or coupled to mass spectrometry (MS) as described below.

#### *Sugar analysis by hydrolysis*

Alternatively, the monosaccharide composition was determined by hydrolysis of 1 mg of sample with 2 mol/L trifluoroacetic acid (TFA) (0.6 mL) at 120 °C for 100 min. After evaporation of the solution with N<sub>2</sub> at 40 °C, the residue was reduced and acetylated by a modification of the method of York et al. (1986): Briefly, 20 mg of NaBH<sub>4</sub> in 1 mL of NH<sub>4</sub>OH (2 mol/L) was added to the residue, the solution was heated for 60 min at 60 °C, then neutralized with acetic acid, evaporated to dryness with a stream of N<sub>2</sub> at 40 °C, and evaporated 4 times by adding 500  $\mu$ L portions of methanol. The residue was acetylated with 200  $\mu$ L of pyridine and 200  $\mu$ L of acetic anhydride at 100 °C for 20 min, partitioned with water (5 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL), and the organic layer containing the alditol acetates was analyzed by GC–FID and GC–MS.

#### *Determination of absolute configuration*

The absolute configuration was determined according to Leontein et al. (1978). The CPS sample (1 mg) was hydrolyzed with 2 mol/L TFA (0.6 mL) at 120 °C for 100 min. The cooled solution was evaporated to dryness with N<sub>2</sub> at 40 °C and

*N*-acetylated by adding pyridine (100  $\mu$ L) and acetic anhydride (100  $\mu$ L) to the residue. The solution was stirred for 20 min at room temperature and evaporated to dryness with a stream of N<sub>2</sub> at room temperature. (+)-2-Octanol (100  $\mu$ L) and TFA (45  $\mu$ L) were added to the residue. The solution was heated for 17 h at 120 °C, cooled, and evaporated to dryness with a stream of N<sub>2</sub> at 50 °C. Octyl glycosides were acetylated and partitioned as described above. The organic layer was analyzed by GC–MS.

#### *Sugar linkage analysis*

Sugar linkage positions were determined on the mild acid-hydrolyzed polysaccharide by analysis of the partially methylated alditol acetates (PMAAs). The methylation procedure was performed by a modified method of Cuicanu and Costello (2003) with NaOH and CH<sub>3</sub>I in dimethylsulfoxide (DMSO). The sample (1 mg) was dissolved in 0.7 mL of DMSO. Powdered NaOH (60 mg) was added, and the solution was stirred for 10 min. CH<sub>3</sub>I (60  $\mu$ L) was added, and the solution was stirred for 10 min. Deionized water (5 mL) was added, and the solution was extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL). The combined organic phases were washed 4 times with water (5 mL). The organic phase was evaporated to dryness with a stream of N<sub>2</sub> at 40 °C. The permethylated saccharides were subjected to sugar analysis by hydrolysis as described above.

#### *Gas chromatography analysis*

Organic phases obtained after sugar and linkage analyses were analyzed by GC on an Agilent model 7890 gas chromatograph equipped with a 30 m  $\times$  0.32 mm, 0.25  $\mu$ m HP-5 capillary column (Agilent Technologies, Santa Clara, Calif., USA). For sugar analysis by methanolysis, the temperature program was as follows: initial oven temperature of 50 °C, maintained for 2 min, ramped at 30 °C/min to 150 °C, ramped at 3 °C/min to 230 °C, maintained for 5 min. The temperatures of the injector and the flame ionization detector were 225 and 250 °C, respectively. For sugar analysis by hydrolysis and sugar linkage analyses, the temperature program was: initial oven temperature of 140 °C, maintained for 2.5 min, ramped at 5 °C/min to 210 °C, maintained for 28 min. The temperatures of the injector and the flame ionization detector were 250 and 275 °C, respectively. Effective carbon responses were used for quantification (Sweet et al. 1975). For absolute configuration determination, the temperature was 140 °C for 2.5 min, ramped at 10 °C/min to 230 °C, which was kept constant for 40 min. The temperatures of the injector and the flame ionization detector

were 225 and 250 °C, respectively. GC–MS analyses were done with a Varian CP3800 gas chromatograph and a Saturn 2000 mass spectrometer equipped with a 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm VF-5MS capillary column (Varian, Palo Alto, Calif., USA). The temperature was set for the inlet at 250 °C, for the transfer line at 170 °C, and for the trap at 150 °C. For sugar analysis and sugar linkage analysis, the temperature program was as follows: initial oven temperature of 120 °C, maintained for 1.5 min, ramped at 4 °C/min to 200 °C, maintained for 8 min, then ramped at 10 °C/min to 230 °C. For absolute configuration analysis, the temperature program was as follows: initial oven temperature of 150 °C, maintained for 5 min, ramped at 15 °C/min to 190 °C, maintained for 75 min. MS acquisition was in the electron impact mode at 70 eV.

#### *Enzyme-linked lectin assay to detect the presence of sialic acid*

In order to verify the presence or absence of sialic acid in the purified native CPS and the mild acid-hydrolyzed polysaccharide, an enzyme-linked lectin assay (ELLA) test was carried out with the *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) lectin (Vector Labs, Burlington, Ontario, Canada), which specifically recognizes sialic acid as  $\alpha$ -Neu5Ac-2,6-d-Galp/GalpNAc (Shibuya et al. 1987), and with *Limax flavus* agglutinin (LFA) (EY Laboratories, San Mateo, Calif.), which recognizes  $\alpha$ -Neu5Ac (Miller et al. 1982). The test was based on a previously described technique (Gornik and Lauc 2007), adapted to the CPS. Skimmed milk was used as positive control. Bovine serum albumin (Hyclone, Thermo Fisher Scientific) was used as negative control for LFA. Group B *Streptococcus* (GBS) type V CPS, which possesses an  $\alpha$ -Neu5Ac-2,3-D-Galp sequence, was purified as described (F. Michon and C. Uitz, Baxter International, United States; patent No. US 2007/0154492 A1) and used as negative control for SNA. Briefly, 200 ng of samples (native CPS, mild acid-hydrolyzed polysaccharide, or controls) were added to wells of an ELISA plate (Nunc-Immuno Polysorp, Canadawide Scientific, Toronto, Ontario, Canada). After overnight coating at 4 °C, wells were washed and blocked (to avoid nonspecific binding) by the addition of Carbo-Free solution 1x (Vector Labs). After washings, biotin-conjugated SNA or HRP-conjugated LFA lectins (10 µg/mL) was added for 1 h at room temperature (Vector Labs). For SNA only, 0.5 µg/mL HRP-labeled avidin D was added to the wells for 1 h at room temperature (Vector Labs). The enzyme reactions were developed by addition of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, stopped by addition of 0.5 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the absorbance was read at 450 nm with an ELISA plate reader.

### *Nuclear magnetic resonance*

Methyl glycoside standards were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo., USA). The native CPS and 2-O-methyl- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid were exchanged in phosphate buffer (p<sup>2</sup>H 8.0) in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99.9 atom% <sup>2</sup>H), freeze dried, and dissolved in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99.96 atom% <sup>2</sup>H) to a final phosphate concentration of 34–80 mmol/L. The mild acid-hydrolyzed polysaccharide and the neutral methyl glycosides were exchanged in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99.9 atom% <sup>2</sup>H), freeze dried, and dissolved in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99.96 atom% <sup>2</sup>H). In all cases, the exchange was repeated if necessary. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were acquired on polysaccharide samples at concentrations of circa 1%–2%. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts  $\delta$  in ppm were both referenced with internal deuterated 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate (DSS-*d*<sub>6</sub>), at  $\delta$  0 as recommended by Wishart et al. (1995).

A Chemagnetics (Fort Collins, Colo., USA) CMX Infinity 300 spectrometer was used for 7.05 T experiments with 5 mm Nalorac (Martinez, Calif.) probes: inverse z-gradient <sup>1</sup>H{<sup>15</sup>N–<sup>31</sup>P} or dual <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H. For polysaccharide samples, the temperature was controlled at 50 or 60 °C. Experiments were performed with original pulse programs of the Spinsight software.

NMR spectra were also acquired at 11.75 T on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a 5 mm triple-resonance TBI probe with <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>109</sup>Ag–<sup>31</sup>P channels at 60 °C and a 16.45 T Bruker Avance 700 spectrometer with a 5 mm Cryoprobe with <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C channels at 74 or 77 °C in 3 mm tubes using standard Bruker pulse sequences at the Centre régional de résonance magnétique nucléaire of the Département de chimie of Université de Montréal. Conventional <sup>1</sup>H spectra were acquired with a 30° pulse. <sup>1</sup>H-decoupled <sup>13</sup>C experiments were performed using a 30° pulse or with composite-pulse decoupling using a spin-echo with a carbon 180° adiabatic pulse. One-dimensional (1D) distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) spectra were recorded with adiabatic pulses with a reading pulse of 135° and the free-precession period optimized for 160 or 165 Hz one-bond coupling constant. The gradient-enhanced two-dimensional (ge-2D) correlation spectroscopy (COSY) experiment was performed in magnitude mode. The phase-sensitive ge-2D total correlation spectroscopy (TOCSY) with Malcom Levitt's sequence (MLEV) using echo–antiecho or the phase-sensitive 2D TOCSY using MLEV were acquired with an effective spin lock time of 100 or 80 ms, respectively. The phase-sensitive ge-2D rotating-frame nuclear Overhauser effect spectroscopy (ROESY) without TOCSY (T-ROESY) using echo–antiecho was acquired with a mixing time of 150 ms. The

magnitude-mode ge-2D heteronuclear multiple-quantum coherence (HMQC) experiment was recorded with a delay optimized for 145 Hz one-bond  $^{13}\text{C}$ – $^1\text{H}$  coupling constant. The phase-sensitive ge-2D heteronuclear single-quantum coherence (HSQC) using z-filter and selection before  $t_1$  was optimized for 160 or 165 Hz. The phase-sensitive ge-2D HSQC–TOCSY with MLEV using echo–antiecho was performed with a delay optimized for a 160 Hz coupling constant and a mixing time of 35 or 60 ms. Magnitude-mode ge-2D heteronuclear multiple-bond coherence (HMBC) with or without low-pass  $J$ -filter was run without carbon decoupling with one-bond and long-range delays optimized for 160 and 8 Hz, respectively. Spectra were processed off-line with SpinWorks 3.1 (Copyright 2009, Kirk Marat, University of Manitoba). Zhu-Bax forward–backward linear prediction (Zhu and Bax 1992) was systematically applied to 2D processing in the  $f_1$  dimension.

*Periodate oxidation, Smith degradation, and electrospray ionization mass spectrometry*

To a solution of 11 mg of polysaccharide dissolved in 6.5 mL of 0.2 mol/L acetate buffer pH 3.7 at 4 °C was added 68 mg of sodium periodate (0.05 mol/L). The solution was allowed to react in the dark at 4 °C for 7 d. Ethylene glycol (1.3 mL) was added, and the solution was kept for 3 h at room temperature. The solution was dialyzed with a Spectra/Por 1 MWCO 6–8 kDa (Spectrum Laboratories) against deionized water for 48 h and freeze dried. The residue was reduced with 0.5 mol/L  $\text{NaBH}_4$  in 2 mol/L  $\text{NH}_4\text{OH}$  (1.5 mL) at 60 °C for 4 h. The solution was treated with IRA-120H ion-exchange resin (Sigma-Aldrich), filtered, and freeze dried. The residue was desalted using an Econo-Pac 10-DG desalting column (Bio-Rad, Hercules, Calif., USA) and freeze dried. A portion of the residue (1 mg) was kept to perform sugar analysis by hydrolysis.

The rest of the material was submitted to Smith degradation as follows. The oxidized–reduced residue was subjected to mild acid hydrolysis in 0.5 mol/L TFA (2 mL) at 80 °C for 1 h. The solution was cooled and freeze dried. The residue was reduced for 60 min with 0.5 mol/L  $\text{NaBH}_4$  in 2 mol/L  $\text{NH}_4\text{OH}$  (1 mL) as after the oxidation. The residue was dialyzed against deionized water for 24 h at room temperature using a Spectra/Por Biotech cellulose ester membrane MWCO 100 Da (Spectrum Laboratories) and freeze dried. The resulting oligosaccharide was analyzed with nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry (nano-ESI–MS/MS) carried out in negative- and positive-ion modes on a tandem mass spectrometer (LC-Q-TOF–MS/MS system–Waters Q-ToF SYNAPT MS) equipped with a nanoACUITY UPLC system (Waters). Masslynx software version 4.1 (Waters) was used for analysis. Nano-ESI voltages were 3.0 and



2.8 kV in positive and negative modes, respectively. Trap collision energies were 6 and 40 V for full-scan MS and MS/MS, respectively. Samples were prepared as in Dell et al. (1992). They were dissolved in 5% acetic acid in deionized water for the positive mode and in 5% ethylenediamine in deionized water for the negative mode. Samples were then diluted with 50:50 deionized water–acetonitrile containing 0.1% formic acid and infused at 0.4  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Single scans were acquired by scanning between  $m/z$  50 or 100 and 1000.

## Results

### *Capsule production and extraction, and capsular polysaccharide isolation and purification*

From 6 L of fermentation broth in different experiments, 17–32 mg of CPS was obtained after purification by gel filtration.

### *Quality controls*

Nucleic acid analysis confirmed the absence of significant contamination giving a range of 0.4%–0.8% DNA/RNA.

Similarly, protein levels were low (0.5%–1.8% by weight) in the purified CPS.

Elemental analysis of the CPS revealed the presence of carbon, hydrogen, and nitrogen.

### *Mild acid hydrolysis and physicochemical characterization*

Chemical modification of the native CPS was performed by mild acid hydrolysis without complete depolymerization of the polysaccharide. This was demonstrated by physicochemical characterization by SEC–MALS. The native CPS scattered light more intensely than the mild acid-hydrolyzed polysaccharide (see Supplementary data Fig. S1A and B),<sup>1</sup> as the mass and the size of the polysaccharide were slightly reduced by mild acid hydrolysis (Table 1).

### *Chemical analyses*

Sugar composition of the CPS, determined after methanolysis and acetylation, gave the ratio 2.3:1:0.9:1.0 for galactose–glucose–glucosamine–neuraminic acid, whereas the ratio was 1:2.9:1.1 for glucose–galactose–glucosamine, as determined by hydrolysis followed by reduction and acetylation.

The absolute configurations were D for galactose, glucose, and glucosamine. The possibility of enzymatic hydrolysis with a specific sialidase (Charland et al. 1995) has already confirmed the D configuration for sialic acid.

Linkage positions were confirmed from GC retention times and MS fragmentation patterns of PMAAs (Carpita and Shea 1989). For the mild acid-hydrolyzed polysaccharide, methylation analysis gave the ratio 1.1:1:0.5:0.6:1.0 for the derivatives

1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methylgalactitol, 1,4,5-tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methylglucitol, 1,3,5-tri-*O*-acetyl-2,4,6-tri-*O*-methylgalactitol, 1,3,5,6-tetra-*O*-acetyl-2,4-di-*O*-methylgalactitol, and 2-acetamido-1,4,5-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-3,6-di-*O*-methylglucitol, indicative of the linkage types terminal Gal, 4-linked Glc, 3-linked Gal, 3,6-linked Gal, and 4-linked GlcN, respectively.

### *Lectin binding*

The SNA lectin, which recognizes the  $\alpha$ -Neu5Ac-2,6-D-Galp/GalpNAc sequence (Shibuya et al. 1987), showed strong binding to the native *S. suis* serotype 14 CPS (Fig. 1), indicating that the sialic acid residue is linked at position 6 of galactose. No significant SNA binding to GBS type V CPS was observed (Fig. 1), confirming the specificity of the lectin with the  $\alpha$ -Neu5Ac-2,6-D-Galp sequence. The mild acid-hydrolyzed polysaccharide showed a significant, albeit not complete, reduction in SNA binding (Fig. 1). This residual binding might indicate incomplete hydrolysis of sialic acid, but could also be due to SNA interactions with exposed galactose residues in the mild acid-hydrolyzed polysaccharide preparation (Shibuya et al. 1987). To confirm this hypothesis, we performed an ELLA test with the LFA lectin, which recognizes  $\alpha$ -Neu5Ac independently of the linkage sequence and which has no binding affinities for galactose (Miller et al. 1982). The LFA lectin showed strong binding to the native CPS but nonsignificant binding to the mild acid-hydrolyzed polysaccharide (Fig. 1), confirming the absence of sialic acid in the latter preparation.

### *Nuclear magnetic resonance*

The  $^1\text{H}$  NMR spectra of the CPS before and after mild acid hydrolysis are shown in Figure 2. Lines were slightly narrower for the mild acid-hydrolyzed polysaccharide (Fig. 2B), even at lower temperature, probably due to its lower molar mass. Reporter resonance signals were readily identified on both spectra: 5 anomeric protons in the range  $\delta$  4.8–4.4 and acetyl methyl protons of *N*-acetylglucosamine near  $\delta$  2.0. Residues were labelled A–E in order of increasing chemical shift of their anomeric protons. Signals characteristic of sialic acid, that is, acetyl methyl protons near  $\delta$  2.0 and methylene protons in position 3 at  $\delta$  2.68 and 1.68 (Fig. 2A), disappeared completely after hydrolysis (Fig. 2B), the chemical shift of the lower frequency signal H-3a being characteristic of  $\alpha$ -Neu5Ac-(2→6)- $\beta$ -Gal/ $\alpha$ -GalNAc subunits (Machytka et al. 1994). Apparently, signals for all other residues were still present after the acid treatment. The anomeric protons of residues A and E shifted the most towards lower

and higher frequencies, respectively; in addition, protons B1 and C1, which were in perfect superposition on the spectrum of the native CPS (Fig. 2A), became resolved after hydrolysis (Fig. 2B). Because hydrolysis led to spectral simplification with better discrimination of signals and slight decrease in line widths and since the only difference between the spectra of the two polysaccharides was the loss of the sialic acid signals, the structure was determined using the mild acid-hydrolyzed desialylated polysaccharide. From the coupling constants ( $J_{H-1-H-2} = 7.6\text{--}7.9$  Hz) displayed by the anomeric signals (Fig. 2B, Table 2), all 5 residues have the  $\beta$  anomeric configuration.

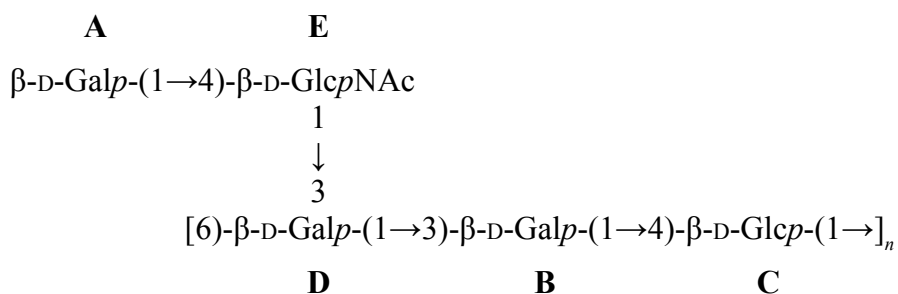
The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (see Supplementary data Fig. S2A)<sup>1</sup> of the desialylated polysaccharide displays reporter resonance peaks: acetyl carbonyl carbon of *N*-acetylglucosamine at circa  $\delta$  177.5, 4 signals integrating for 5 anomeric carbons between  $\delta$  107 and 105, amino carbon (C-2) of *N*-acetylglucosamine at circa  $\delta$  58.1, and acetyl methyl carbon of *N*-acetylglucosamine at circa  $\delta$  25.0. The DEPT-135 spectrum (see Supplementary data Fig. S2B)<sup>1</sup> shows that only 4 out of 5  $\text{CH}_2$  signals were in an unshifted position ( $\delta$  64–62) characteristic of hexoses in the pyranose ring form unsubstituted at position 6, whereas the fifth methylene signal was shifted to higher frequencies ( $\delta$  71.62), confirming a linkage at position 6 for one sugar residue. On the COSY spectrum (see Supplementary data Fig. S3),<sup>1</sup> starting from the anomeric protons, it was possible to initiate resonance assignments in each spin system in order to identify residues and determine their anomeric configuration. Spin systems could be followed up to H-2 for residues B and E, H-3 for residue C, and H-4 for residues A and D, the latter two being assigned to galactose based on the narrow width of their H-4. The width of the H-1–H-2 cross-peaks confirmed the  $\beta$  anomeric configuration for all residues. Additional cross-peaks can be observed on the COSY spectrum (see Supplementary data Fig. S3),<sup>1</sup> very likely correlations involving H-5 or H-6 for some of the residues, but it was not possible to specifically assign them to individual sugar residues at this stage. Spin systems were further extended with the TOCSY spectrum (Fig. 3). For certain residues, C and E for example, it was possible to follow the spin system from position 1 to position 5 because coupling constants were large and magnetization propagated easily, indicating a  $\beta$  *gluco* configuration. In other cases, as for residues A, B, and D, propagation from the anomeric protons stopped at position 4, which is typical for galactose. Some of the remaining protons could be assigned from the ROESY spectrum (see Supplementary data Fig. S4),<sup>1</sup> which clearly displays correlations between H-1 and H-5 for each residue, the two axial protons being in close proximity in sugars with the  $\beta$  anomeric configuration. In the end, a few ambiguities remained as to the assignment of protons in position 6 due to the exact superposition

of protons C5 and E5 and to insufficient information (superimposed or near-diagonal cross-peaks) on the COSY spectrum.

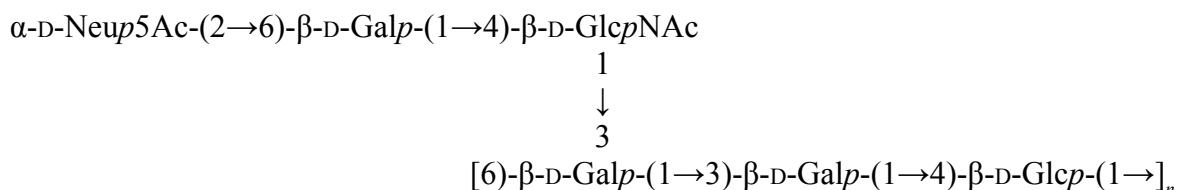
From known proton chemical shifts (Table 2), HMQC (not shown) and HSQC (Fig. 4) spectra were used to assign corresponding carbon chemical shifts. The  $^{13}\text{C}$  chemical shift of E2 at lower frequency ( $\delta$  58.08) indicates that residue E corresponds to *N*-acetylglucosamine, leaving residue C as glucose. At this point, except for a few superimposed signals, carbons 1–5 were assigned for all residues. The HSQC–TOCSY spectrum (see Supplementary data Fig. S5)<sup>1</sup> allowed the distinction between resonances at positions 5 and 6 of Glc and GlcNAc (residues C and E), based on correlations at their C-5 chemical shifts. For galactose residues, protons in position 5 previously found on the ROESY spectrum showed long-range correlations to carbons in position 6. However, the small difference in chemical shift for carbons A6 and B6 required another strategy for their differentiation. Interestingly, signals for A1–A4 on the  $^{13}\text{C}$  and DEPT spectra had higher intensity than corresponding signals for other residues, and consequently peaks at  $\delta$  78.02 and 63.65 could be assigned to A5 and A6, respectively, based on this similar characteristic (Fig. 4 trace). Higher signal intensities are observed for narrower lines, an indication of increased local mobility, which suggests that residue A is located in the side chain of the polysaccharide. On the opposite, resolved carbon signals for residue D had lower than average intensity, implying more restricted motion, suggesting that this residue is located at the branching point.

Careful examination of the carbon chemical shifts in Table 2 gave indication as to the glycosidation position of the sugar residues. When compared to corresponding methyl glycosides,  $\alpha$  glycosidation shifts of 7.9–9.1 ppm are observed for carbons B3, C4, D3, D6, and E4. These results confirm the linkage analysis data for all sugars: terminal Gal (A), 4-linked Glc (C), 3-linked Gal (B), 3,6-linked Gal (D), and 4-linked GlcNAc (E). On the ROESY spectrum (see Supplementary data Fig. S4),<sup>1</sup> a few inter-residue correlations could readily be identified: E4/A1, C3/B1 or C4/B1, B2/D1, B3/D1, and D3/E1. However, these through-space correlations do not necessarily correspond to linkage positions. In contrast, on the HMBC spectrum (see Supplementary data Fig. S6),<sup>1</sup> correlations to anomeric protons (E4/A1, C4/B1, D6/C1, B3/D1, and D3/E1) and, with more ambiguity due to superposition of signals, from anomeric carbons (A1/E4, B1/C4, C1/D6, D1/B3, and E1/D3) confirmed the true linkage positions for all residues. To ascertain the spectral assignment and the structure determination, methylation analysis data, homonuclear and heteronuclear coupling constant information, and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts were input into the program CASPER (Lundborg and Widmalm 2011), which outputs possible structures. The following structure had the second

lowest root mean square (RMS) deviation between experimental and calculated carbon chemical shifts and is consistent with the connectivity data obtained from the ROESY and HMBC spectra:



Considering that the anomeric proton signal of residues A and E were those that shifted the most upon desialylation, we postulated that sialic acid was linked to position 6 of the terminal galactose residue (A), giving the following as the structure of the native CPS:

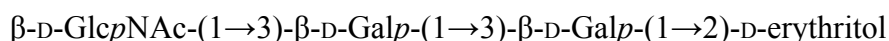


This hypothesis was confirmed by analyzing the differences in the NMR spectra of the two polysaccharides (Tables 2 and 3). On the  $^{13}\text{C}$  and DEPT spectrum of the native CPS, additional reporter resonance signals at circa  $\delta$  54.7, 42.8, and 24.8 corresponding, respectively, to C-5, C-3, and acetyl methyl of *N*-acetylneuraminic acid were present. In addition, methylene signals at circa 66.0 and 65.6 were attributed to C-6 of a substituted hexose residue and to C-9 of sialic acid, respectively. The following quaternary carbons were found on the  $^{13}\text{C}$  spectrum (not shown): three signals in the carbonyl region including two acetyl groups and one carboxylic acid at position 1 of sialic acid, as well as one signal in the anomeric region ( $\delta$  103.07) corresponding to C-2 of sialic acid. Starting from the protons in position 3 of sialic acid, the TOCSY spectrum (see Supplementary data Fig. S7)<sup>1</sup> displayed new correlations to protons at positions 4–6. The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of the native CPS was assigned from HSQC (see Supplementary data Fig. S8)<sup>1</sup> essentially by comparison with that of the desialylated polysaccharide for residues A–E, whereas carbons of the sialic acid residue F were assigned by comparison with the methyl glycoside of *N*-acetylneuraminic acid and with corresponding signals in the *S. suis* serotype 2 CPS. On the  $^{13}\text{C}$  spectrum, carbons of residues F and D have the highest and lowest intensity

(see Supplementary data Fig. S8 trace),<sup>1</sup> corresponding to the terminal and branching residues, respectively. Carbons A6, B3, C4, D3, D6, and E4 displayed  $\alpha$  glycosidation shifts of 2.3–10.1 ppm when compared with the corresponding methyl glycosides. The only <sup>13</sup>C chemical shifts to move appreciably (> 1 standard deviation in either direction) upon desialylation were those of carbons A5 (+1.60 ppm), A6 (–2.35 ppm), and E4 (–1.54 ppm), the former two indicating the glycosidation position of the sialic acid on galactose (A6) and the latter presumably being due to different conformations about the A–E glycosidic linkage in the side chain of the two polysaccharides.

*Periodate oxidation, Smith degradation, and electrospray ionization mass spectrometry*

To ascertain the structure, especially to confirm the sequence E-D-B-C, the CPS was submitted to periodate oxidation followed by borohydride reduction (see Supplementary data Scheme S1).<sup>1</sup> Sugar analysis as alditol acetates of the resulting modified polysaccharide gave as a composition glycerol, erythritol, glucose (trace only), galactose, and glucosamine, as expected (ethylene glycol not detected with the temperature program used). The following compound is expected after Smith degradation (mild acid hydrolysis and reduction) (see Supplementary data Scheme S1)<sup>1</sup> of the oxidized–reduced polysaccharide:



ESI–MS analysis of the reaction product gave molecular-ion peaks at  $m/z$  648.3 and 672.2 in negative- and positive-ion modes, corresponding to the hydrogen-abstracted and sodium-cationized oligosaccharide, respectively. MS/MS of the  $m/z$  648.3 ion (see Supplementary data Fig. S9A)<sup>1</sup> gave peaks at  $m/z$  445.2, 283.1, and 202.1, corresponding to  $Y_2$ ,  $Y_1$ , and  $B_1$  fragments, respectively, according to the nomenclature of Domon and Costello (1988). In addition, ions corresponding to two fragmentations are also observed:  $m/z$  179.1 and 161.1. Similarly, the  $m/z$  672.2 ion (see Supplementary data Fig. S9B)<sup>1</sup> fragmented to give peaks at  $m/z$  550.2, 469.2, 406.1, 388.1, 307.1, 244.1, and 226.1, corresponding to  $B_3$ ,  $Y_2$ ,  $C_2$ ,  $B_2$ ,  $Y_1$ ,  $C_1$ , and  $B_1$  fragments (see Supplementary data Fig. S9C),<sup>1</sup> respectively, and the following ions arose from double fragmentation:  $m/z$  347.1, 203.1, and 185.0.

## Discussion

This report is, to our knowledge, the first description of the sugar sequence of *S. suis* serotype 14 CPS.

The CPS extraction method used in this study derived from the work of Katsumi et al. (1996) who obtained *S. suis* serotype 2 CPS preparations having nearly identical NMR spectra, using both the lysozyme and autoclaving methods. In our laboratory, we observed partial sialic acid hydrolysis while heating in aqueous solution with no pH control. For this reason, the physiological saline solution used by Katsumi et al. (1996) during the autoclaving step was replaced by phosphate buffered saline.

The reduction in mass upon mild acid hydrolysis of serotype 14 CPS was not as drastic as with serotype 2 CPS (Van Calsteren et al. 2010), which suggests stronger linkages in the polysaccharide structure. This can be explained by the absence in the backbone of serotype 14 CPS of the sugar residue rhamnose, a monosaccharide that is more acid labile than the hexoses glucose and galactose (Hough et al. 1972).

### Comparison with other capsular polysaccharide structures

The CPS produced by *S. suis* serotype 14 is unique but shares some common structural elements with other pathogenic streptococcal antigens. *S. suis* serotype 14 CPS differs from that of serotype 2 by the absence of rhamnose in its composition. The sequence Neu5Ac-Gal-GlcNAc-Gal present in *S. suis* serotype 14 CPS is also found in *S. suis* serotype 2 (Van Calsteren et al. 2010) and GBS types Ia, Ib, II, III, and IV CPSs (Cieslewicz et al. 2005) (see Supplementary data Fig. S10).<sup>1</sup> Similar to *S. suis* serotype 2 CPS but contrary to CPSs from GBS types, sialic acid is 2,6- rather than 2,3-linked to the following galactose. The linkages connecting the next three sugars, namely Gal( $\beta$ 1–4)GlcNAc( $\beta$ 1–3)Gal( $\beta$ 1–4), are identical to those in GBS types Ia, II, and III, but one linkage differs in types Ib and IV (see Supplementary data Fig. S10).<sup>1</sup> In *S. suis* serotype 14, the side chain is constituted by the sequence Neu5Ac-Gal-GlcNAc, which also forms the side chain in *S. suis* serotype 2 and GBS types Ia, Ib, and IV. In GBS types II and III, however, the sugars in this same sequence are distributed differently between side chain and backbone (see Supplementary data Fig. S10).<sup>1</sup> No other pathogenic streptococcal antigen shares common features such as identical composition, backbone, or side chain.

In the CPS of *S. suis* serotype 14, similarly to serotype 2, but differently from GBS type III, sialic acid does not exert conformational control over the backbone residues. When comparing native CPS with their corresponding desialylated polysaccharide, the maximum <sup>1</sup>H chemical shift difference for backbone residues is –0.02 ppm for one of



the two protons in position 6 of residue D at the branching position, and maximum  $^{13}\text{C}$  chemical shift differences of  $-0.11$ ,  $+0.09$ ,  $-0.07$ , and  $-0.04$  ppm are observed for carbons D6, B3, D5, and D4, respectively. These values are small compared with those found for GBS type III CPS and its corresponding desialylated polysaccharide:  $+0.06$  ppm for Glc H-5;  $+0.81$ ,  $+0.26$ , and  $+0.21$  ppm for GlcNAc C-4, Gal C-3, and Gal C-1, respectively (Brisson et al. 1997). A major difference between the CPS structures of GBS type III and *S. suis* serotypes 2 and 14 is that sialic acid is one residue closer to the backbone in the CPS of GBS type III. Therefore, its influence on the *N*-acetylglucosamine residue is exerted on the backbone in GBS but remains in the side chain in *S. suis*.

### Biosynthesis of the capsular polysaccharide

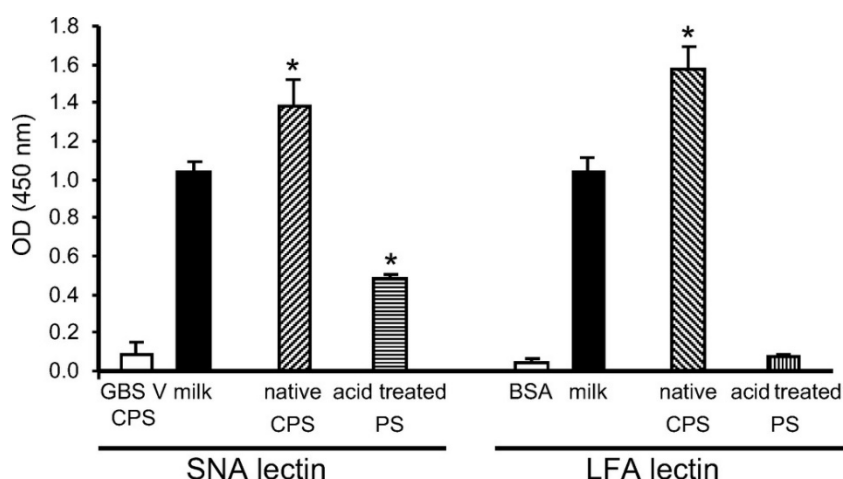
A correlation was tentatively established between the CPS structure determined in this study and 7 genes encoding putative glycosyltransferases and a polymerase, which are clustered in the *S. suis* serotype 14 *cps* locus (Hu et al. 2011; Wang et al. 2011) (see Supplementary data Table S1 and Fig. 5).<sup>1</sup> In this tentative model, the synthesis of the repeating unit starts with the transfer of the glucose residue to a lipid carrier by the action of the putative glycosyltransferase encoded by *cps14E*, homologous to *cps2E* of *S. suis* serotype 2. The next glycosyltransferase gene (*cps14G*) is homologous to *cpsG* of GBS (also known as *S. agalactiae*) type III, which encodes a  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase. From the homology to *cpsI* of GBS type III, which encodes an enzyme that catalyzes the formation of a  $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp linkage, we propose that the sugar transferred by the gene product of *cps14I* ( $\beta$ -D-Galp) is also  $\beta$ -1,3-linked to galactose. The next two glycosyltransferases, encoded by *cps14J* and *cps14K*, homologous to *cps2J* and *cps2K* of *S. suis* serotype 2, have putative *N*-acetylglucosaminyltransferase and  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase activities, respectively. Finally, the last glycosyltransferase gene, *cps14O*, encodes a protein with putative sialyltransferase activity. Remarkably, the order of the glycosyltransferase genes follows that of the sugar sequence (Fig. 5). Finally, the gene product of *cps14H* putatively acts as the CPS polymerase, by homology with the corresponding enzyme in *S. pneumoniae* serotype 14, which also catalyzes the formation of a  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6) linkage, but to  $\beta$ -D-GlcpNAc instead of  $\beta$ -D-Galp. It is interesting to note that the absence of rhamnose observed in this study correlates with the absence of a homolog of the *cps2F* gene, which codes for a rhamnosyltransferase, in the *S. suis* serotype 14 *cps* locus (accession number JF273653).

## Acknowledgments

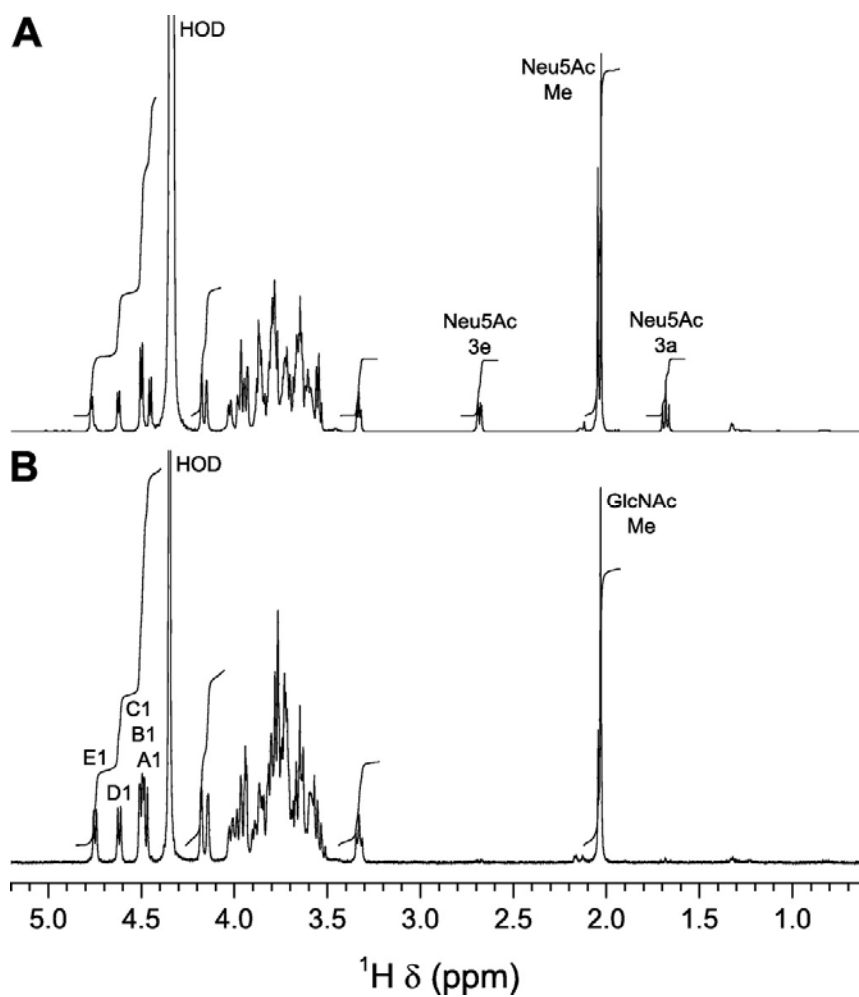
We thank Hassan Sabik for the ESI–MS spectra. The LC–MS/MS system was funded by the CRTI technical acquisition program in collaboration with CFIA, AAFC, and PHAC. This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through grant to MS (#342150-07), by the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) New Initiative program of the Swine Infectious Disease Research Centre (CRIP) to MS, MRVC, and MG, and by Grant-in-Aid for Young Scientists (B) from Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) to MO. GGD is a recipient of a scholarship from CRIP.

## Footnote

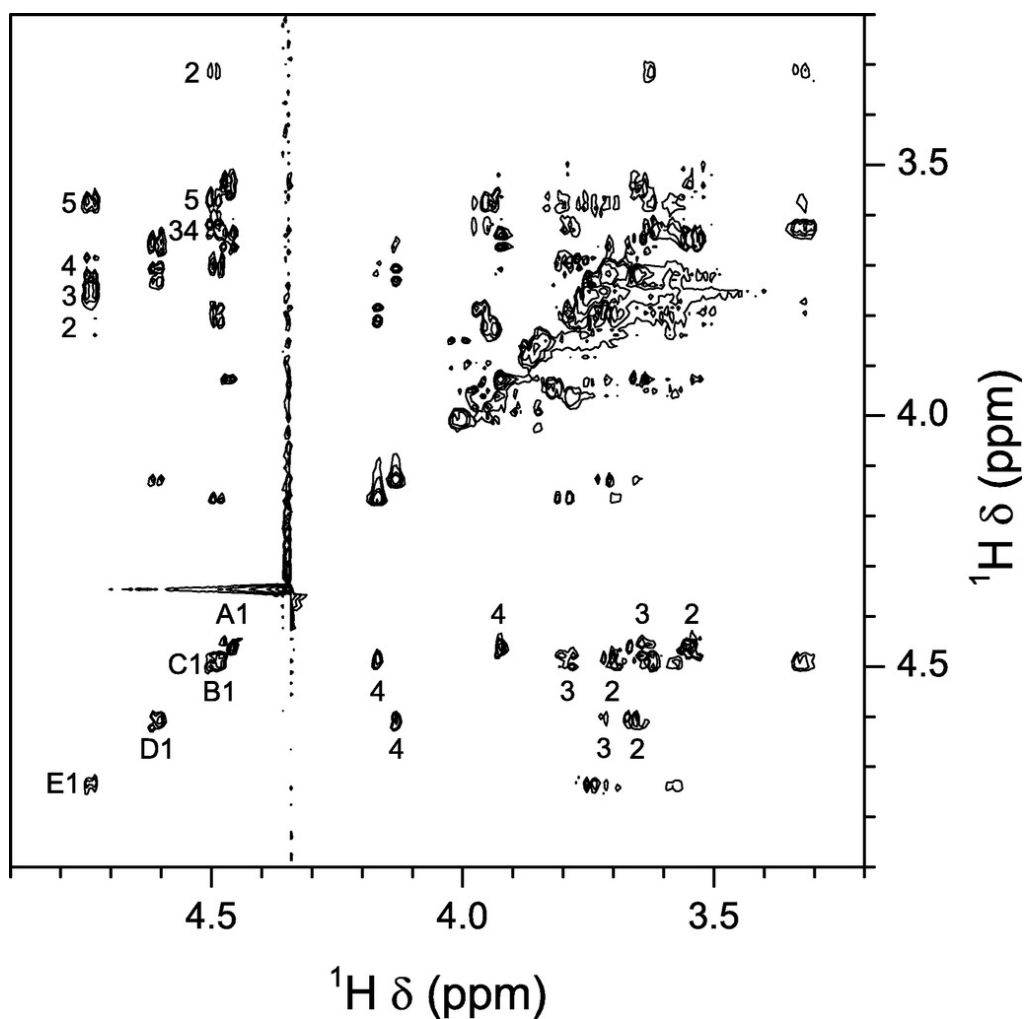
<sup>1</sup> Supplementary data are available with the article through the journal Web site at <http://nrcresearchpress.com/doi/suppl/10.1139/bcb-2012-0036>



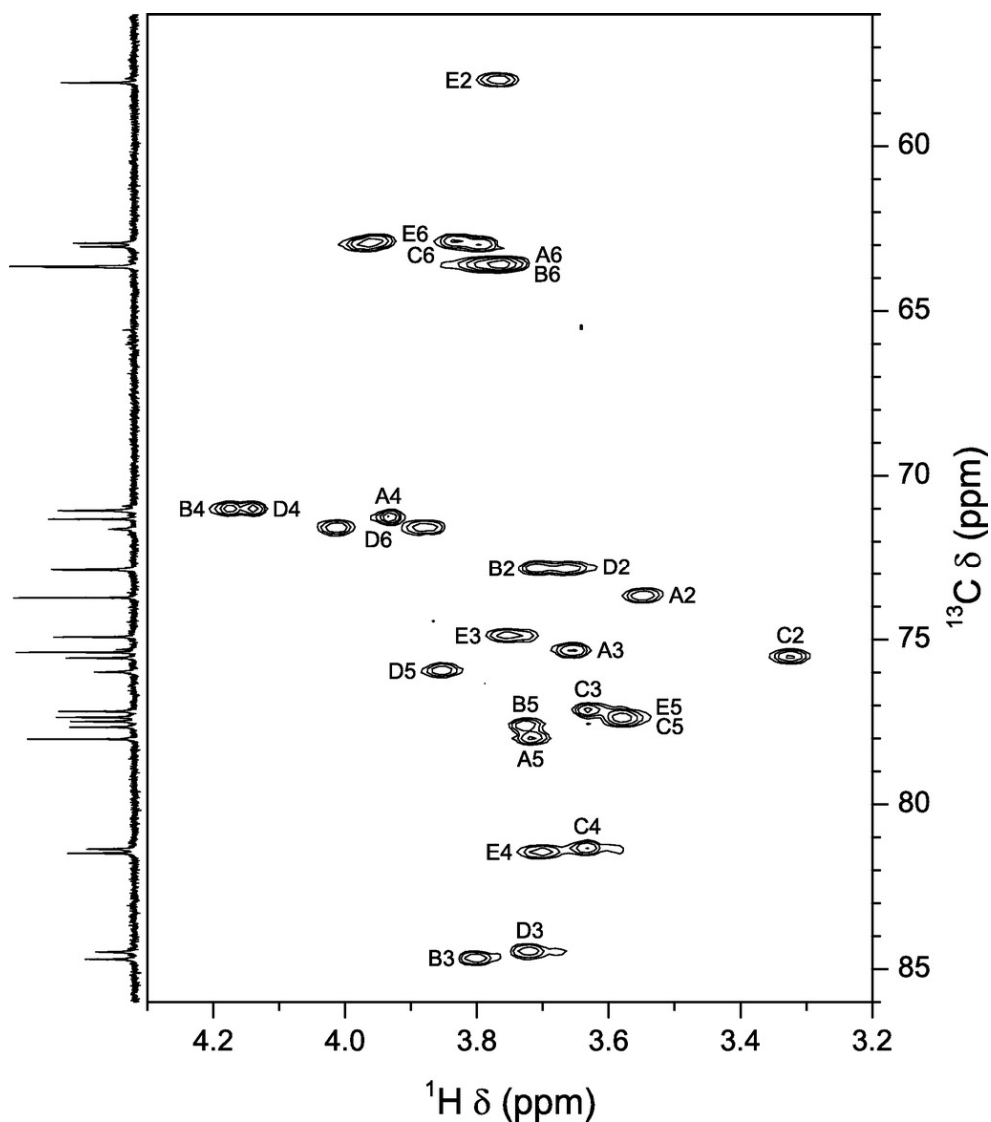
**Figure 1. Enzyme-linked lectin assay (ELLA) of *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) lectin or *Limax flavus* agglutinin (LFA) binding to purified native capsular polysaccharide (native CPS) and mild acid-hydrolyzed polysaccharide (acid treated PS).** Skimmed milk was used as positive control. Bovine serum albumin (BSA) was used as negative control for LFA. Group B *Streptococcus* type V purified CPS (GBS V CPS), which possesses an  $\alpha$ -Neu5Ac-2,3-D-Galp sequence, was used as negative control for SNA. Lectin binding was determined by optical density (OD) reading at 450 nm with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader. All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean ( $n = 3$ ). Data were analyzed for significance using Student unpaired  $t$ -test. A  $P$  value  $< 0.05$  was used as a threshold for significance. \*, indicates statistically significant differences compared with the negative control.



**Figure 2. One-dimensional  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance (NMR) spectra.** (A) 700.3 MHz spectrum of the native capsular polysaccharide (CPS) in 80 mmol/L phosphate buffer ( $\text{p}^2\text{H}$  8.0) in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at 77  $^\circ\text{C}$ ; 16 K complex data points were acquired with a digital resolution of 0.31 Hz/point and processed by exponential multiplication, zero filling, Fourier transform, phase correction, and third-order polynomial baseline correction. (B) 500.1 MHz spectrum of the mild acid-hydrolyzed polysaccharide in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at 60  $^\circ\text{C}$ ; 24 K complex data points were acquired with a digital resolution of 0.25 Hz/point and processed as above.

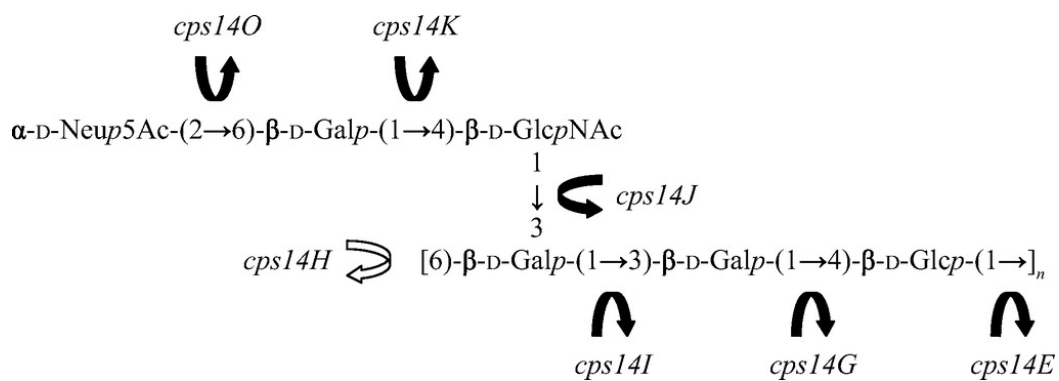


**Figure 3. Portion of the 500.1 MHz total correlation spectroscopy (TOCSY) spectrum.** The gradient-enhanced two-dimensional spectrum of the desialylated polysaccharide was obtained in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at 60 °C.  $2 \times 256$  increments of 1 K complex data points were acquired using echo-antiecho with a mixing time of 100 ms and a digital resolution of 2.7 Hz/point in the  $t_2$  dimension and 11.0 Hz/point in the  $t_1$  dimension. The  $t_2$  dimension was processed by multiplication with a  $\pi/2$  shifted sinebell window function, Fourier transform, and phase correction, and the  $t_1$  dimension by Zhu-Bax linear prediction to 512 points with 16 coefficients, multiplication with a  $\pi/2$  shifted sinebell window function, Fourier transform, and phase correction. Only positive contours are shown. Spin systems for residues with the *galacto* and *gluco* configurations are labelled horizontally and vertically, respectively.



**Figure 4. Portion of the 700.3 MHz heteronuclear single-quantum coherence spectrum.**

The gradient-enhanced two-dimensional spectrum of the desialylated polysaccharide was obtained in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at 74 °C.  $2 \times 180$  increments of 768 complex data points were acquired in the States with time-proportional phase incrementation (States-TPPI) mode with a digital resolution of 9.1 Hz/point in the  $t_2$  dimension and 55.6 Hz/point in the  $t_1$  dimension. The  $t_2$  dimension was processed by multiplication with a  $\pi/2$  shifted sinebell window function, zero filling, Fourier transform, and phase correction, and the  $t_1$  dimension by Zhu-Bax linear prediction to 512 points with 16 coefficients, multiplication with a  $\pi/2$  shifted sinebell window function, Fourier transform, and phase correction. Only positive contours are shown. The  $f_1$  trace corresponds to the one-dimensional spectrum (see Supplementary data Fig. S2A).<sup>1</sup>



**Figure 5.** Tentative correlation between structure and genes encoding glycosyltransferases (black arrows) and polymerase (white arrow) responsible for the biosynthesis of *Streptococcus suis* serotype 14 capsular polysaccharide (CPS).

**Table I. Size-exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering (SEC–MALS) data for the capsular polysaccharide (CPS) before and after mild acid hydrolysis.**

|                                     | $M_w/M_n$      | $M_w$ (g/mol)                | $R_z$ (nm)  |
|-------------------------------------|----------------|------------------------------|-------------|
| Native CPS                          | 1.025 (0.059%) | $2.866 \times 10^5$ (0.041%) | 18.2 (0.4%) |
| Mild acid-hydrolyzed polysaccharide | 1.022 (0.115%) | $1.176 \times 10^5$ (0.076%) | 11.3 (0.7%) |

**Note:**  $M_w/M_n$ , polydispersity;  $M_w$ , weight-average molar mass;  $R_z$ , z-average radius of gyration. Values in parentheses represent relative standard deviations.



**Table II. Nuclear magnetic resonance (NMR) chemical shifts of the desialylated polysaccharide.**

| Residue | 1 <sup>a</sup>             | 2             | 3     | 4     | 5     | 6     | Me    | CO    |        |
|---------|----------------------------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| A       | $\beta$ -D-Gal-(1→         | 4.48<br>(7.9) | 3.55  | 3.66  | 3.93  | 3.72  | 3.77  |       |        |
|         |                            | 105.63        | 73.73 | 75.39 | 71.32 | 78.02 | 63.65 |       |        |
| B       | →3)- $\beta$ -D-Gal-(1→    | 4.50<br>(7.9) | 3.71  | 3.81  | 4.18  | 3.73  | 3.79  | 3.77  |        |
|         |                            | 105.31        | 72.87 | 84.70 | 71.06 | 77.66 | 63.67 |       |        |
| C       | →4)- $\beta$ -D-Glc-(1→    | 4.50<br>(7.7) | 3.33  | 3.64  | 3.64  | 3.59  | 3.98  | 3.80  |        |
|         |                            | 105.31        | 75.56 | 77.18 | 81.36 | 77.49 | 63.06 |       |        |
| D       | →3,6)- $\beta$ -D-Gal-(1→  | 4.62<br>(7.7) | 3.67  | 3.73  | 4.14  | 3.86  | 4.02  | 3.89  |        |
|         |                            | 106.76        | 72.89 | 84.48 | 71.06 | 75.99 | 71.62 |       |        |
| E       | →4)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→ | 4.75<br>(7.6) | 3.77  | 3.76  | 3.71  | 3.59  | 3.96  | 3.83  | 2.03   |
|         |                            | 105.18        | 58.08 | 74.93 | 81.48 | 77.36 | 62.95 | 24.96 | 177.45 |

**Note:** Chemical shifts (<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C) in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O in ppm referenced to internal 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate (DSS). <sup>1</sup>H chemical shifts were obtained at 60 °C from the one-dimensional (1D), correlation spectroscopy (COSY), and total correlation spectroscopy (TOCSY) spectra or at 74 °C from the heteronuclear single-quantum coherence (HSQC) and HSQC–TOCSY spectra. <sup>13</sup>C chemical shifts were obtained at 74 °C from the 1D spectrum.

<sup>a</sup>Coupling constants ( $J_{H-1-H-2}$ ) in parentheses.

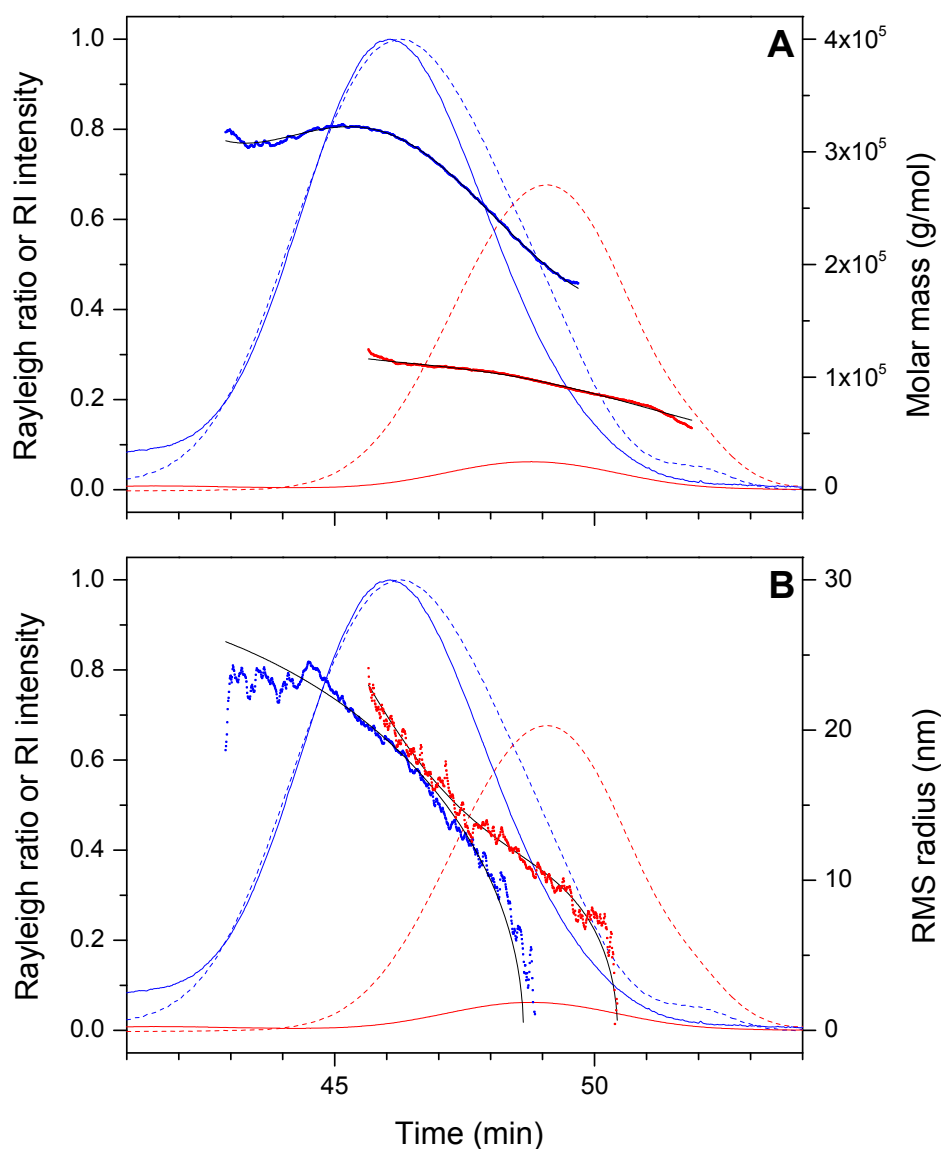
**Table III. Nuclear magnetic resonance (NMR) chemical shifts of the native capsular polysaccharide (CPS).**

| Residue | 1 <sup>a</sup>     | 2                   | 3      | 4     | 5     | 6     | 7     | 8    | 9    | Me   | CO     |
|---------|--------------------|---------------------|--------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|--------|
| A       | →6-β-D-Gal-(1→     | 4.45                |        |       |       |       |       |      |      |      |        |
|         |                    | (7.9)               | 3.54   | 3.66  | 3.93  | 3.80  | 3.96  | 3.61 |      |      |        |
| B       | →3)-β-D-Gal-(1→    | 105.96              |        |       |       |       |       |      |      |      |        |
|         |                    | 4.50                | 3.71   | 3.81  | 4.18  | 3.73  | 3.79  | 3.77 |      |      |        |
| C       | →4)-β-D-Glc-(1→    | (7.9)               | 3.71   | 3.81  | 4.18  | 3.73  | 3.79  | 3.77 |      |      |        |
|         |                    | 105.32 <sup>b</sup> | 72.87  | 84.78 | 71.06 | 77.64 | 63.68 |      |      |      |        |
| D       | →3,6)-β-D-Gal-(1→  | 4.50                |        |       |       |       |       |      |      |      |        |
|         |                    | (7.9)               | 3.33   | 3.64  | 3.64  | 3.58  | 3.98  | 3.81 |      |      |        |
| E       | →4)-β-D-GlcNAc-(1→ | 105.29 <sup>b</sup> | 75.56  | 77.19 | 81.36 | 77.51 | 63.05 |      |      |      |        |
|         |                    | 4.62                | 3.67   | 3.74  | 4.15  | 3.86  | 4.03  | 3.87 |      |      |        |
| F       | α-D-Neu5Ac-(2→     | (7.6)               | 3.67   | 3.74  | 4.15  | 3.86  | 4.03  | 3.87 |      |      |        |
|         |                    | 106.77              | 72.91  | 84.48 | 71.02 | 75.91 | 71.52 |      |      |      |        |
| F       | α-D-Neu5Ac-(2→     | 4.77                |        |       |       |       |       |      |      |      |        |
|         |                    | (7.2)               | 3.78   | 3.79  | 3.66  | 3.60  | 3.95  | 3.83 |      |      | 2.05   |
| F       | α-D-Neu5Ac-(2→     | 105.08              | 57.96  | 74.91 | 83.02 | 77.19 | 63.20 |      |      |      | 25.07  |
|         |                    | 175.93              | 103.07 | 42.83 | 70.92 | 54.74 | 75.30 | 3.55 | 3.87 | 3.86 | 3.65   |
|         |                    |                     |        | 2.68  | 1.68  | 3.68  | 3.78  | 3.71 |      |      | 2.03   |
|         |                    |                     |        |       |       |       |       |      |      |      | 24.78  |
|         |                    |                     |        |       |       |       |       |      |      |      | 177.64 |

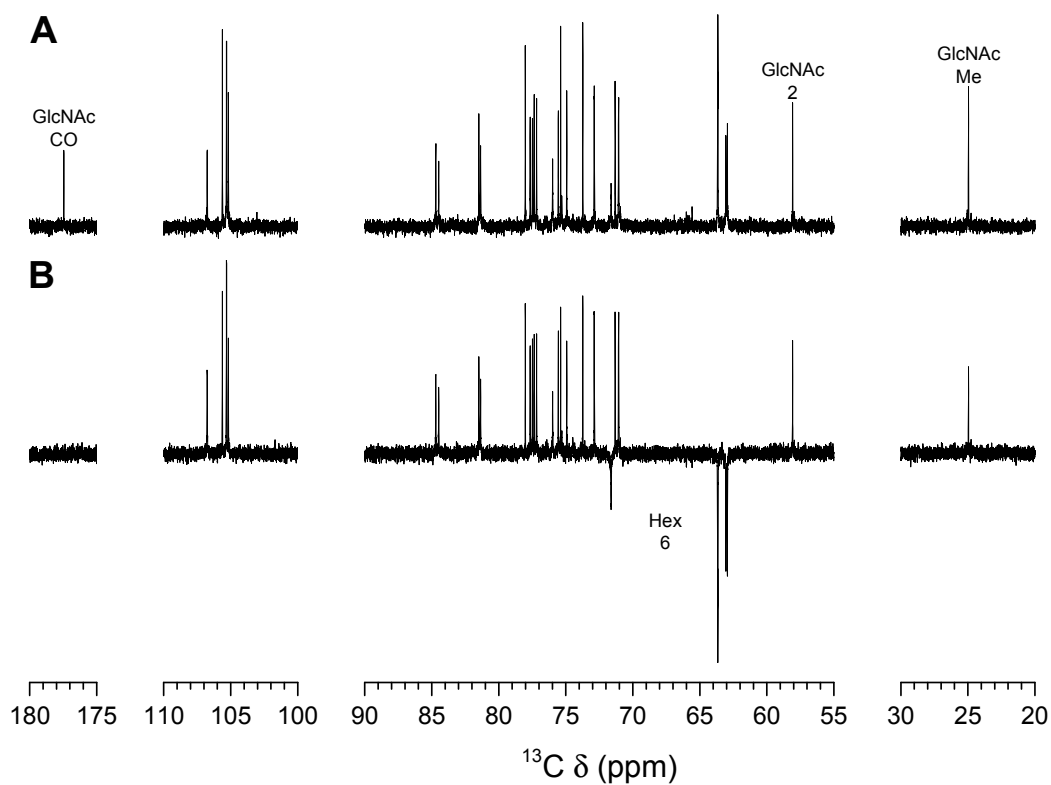
**Note:** Chemical shifts (<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C) in 80 mmol/L phosphate buffer p<sup>2</sup>H 8.0 in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O at 77 °C in ppm referenced to internal 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate (DSS). <sup>1</sup>H chemical shifts were obtained from the one-dimensional (1D), total correlation spectroscopy (TOCSY), and heteronuclear single-quantum coherence (HSQC) spectra. <sup>13</sup>C chemical shifts were obtained from the 1D spectrum.

<sup>a</sup>Coupling constants ( $J_{H-1-H-2}$ ) in parentheses.

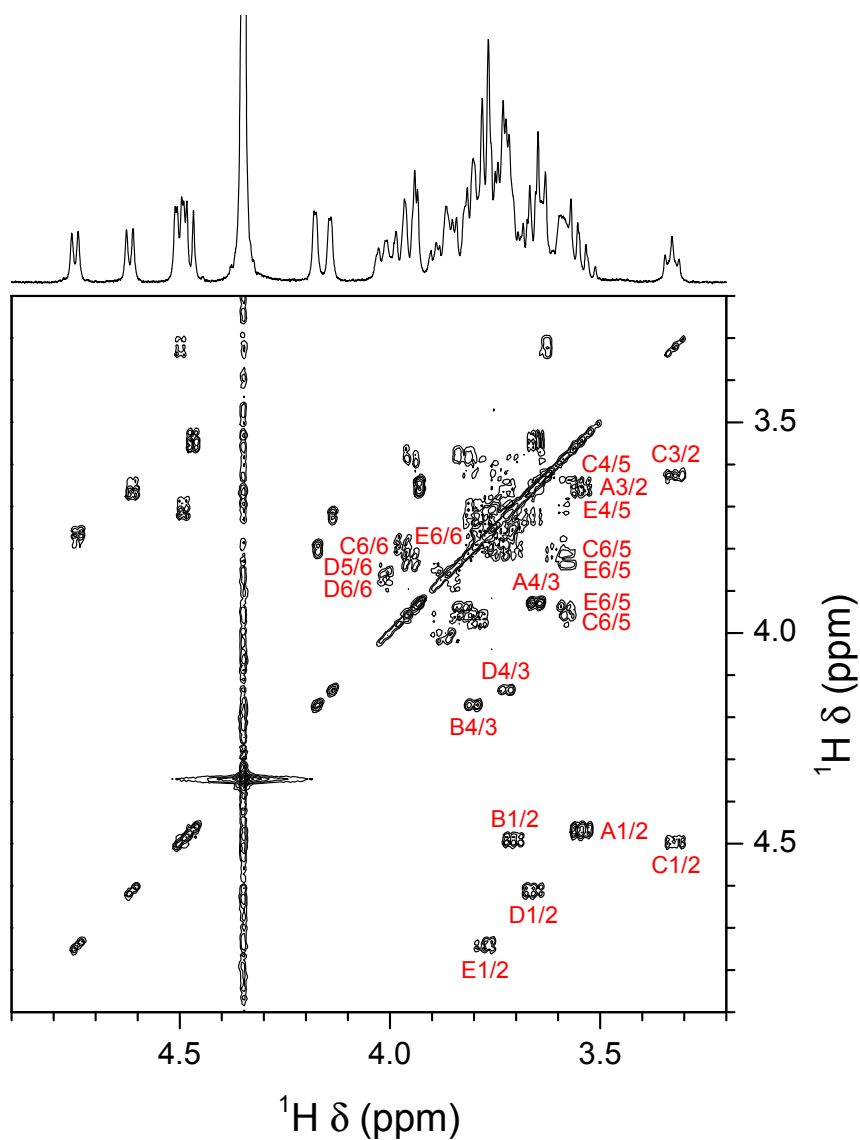
<sup>b</sup>Tentative assignments



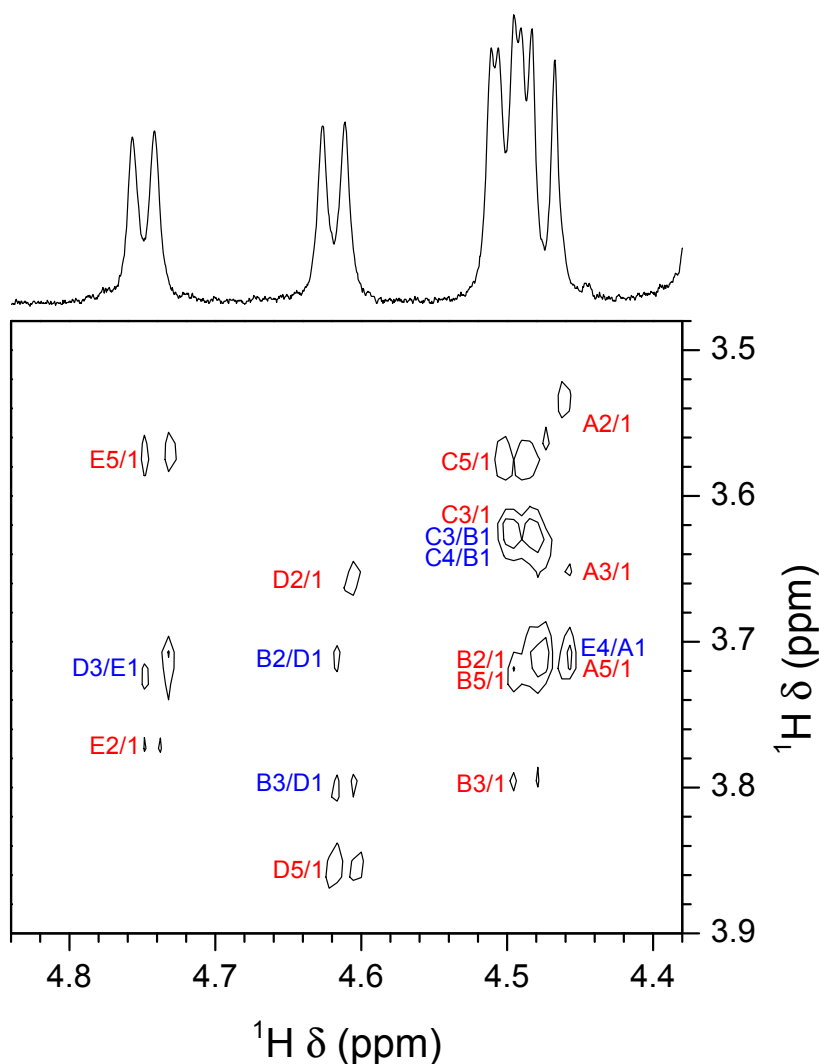
**Figure S1. Size-exclusion chromatograms with multi-angle light scattering (MALS) and refractive index (RI) detection.** The signal represents the Rayleigh ratio (solid lines) or the RI (dashed lines) as a function of time for the capsular polysaccharide (CPS) before (blue) and after (red) mild acid hydrolysis. (A) Molar mass through the chromatographic peaks. (B) Root mean square (RMS) radius through the chromatographic peaks. In all cases, black lines represent polynomial regression through calculated points.



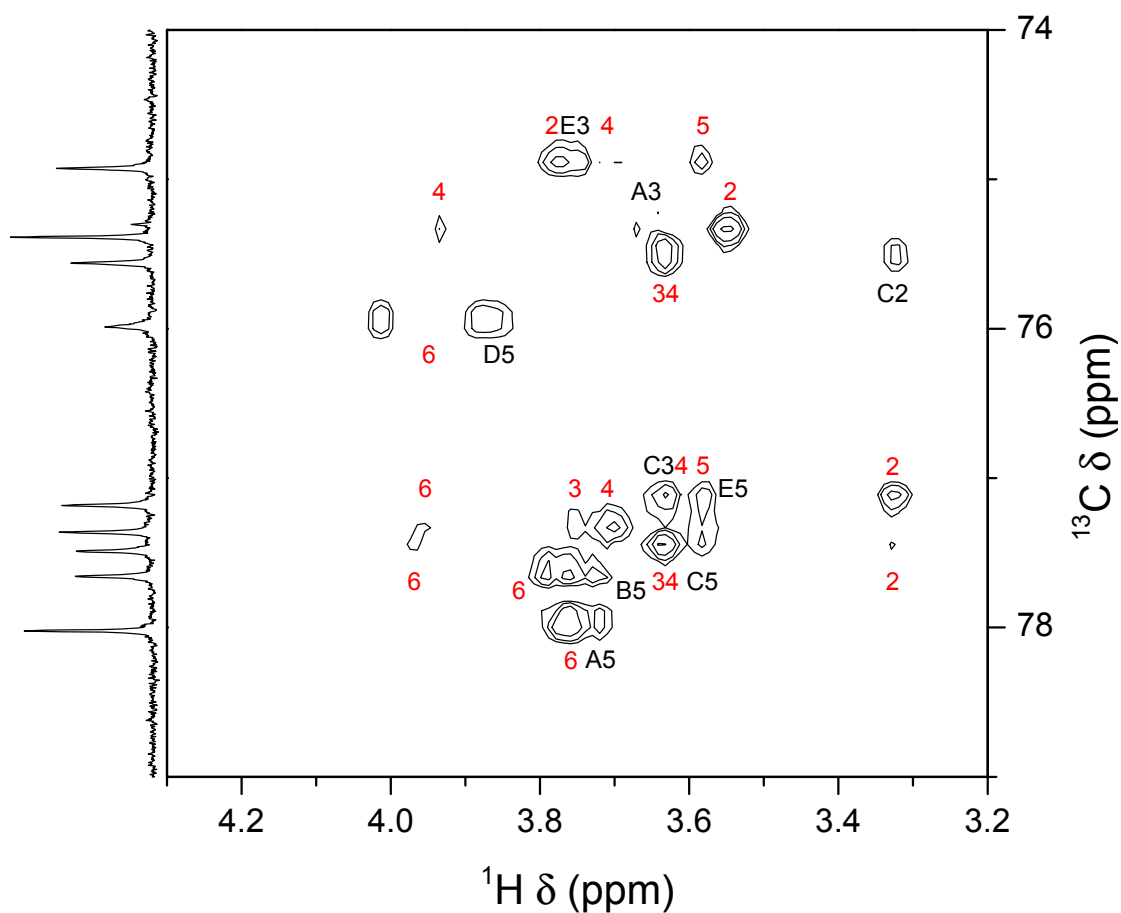
**Figure S2. Regions of the 176.1 MHz one-dimensional  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of the desialylated polysaccharide in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at  $74^\circ\text{C}$ .** (A) Conventional spectrum. (B) Distortionless enhancement by polarization transfer spectrum with a  $135^\circ$  reading pulse (DEPT-135). In both cases, 64 K complex data points were acquired with a digital resolution of 0.65 Hz/point and processed by exponential multiplication, zero filling, Fourier transform, phase correction, and third-order polynomial baseline correction



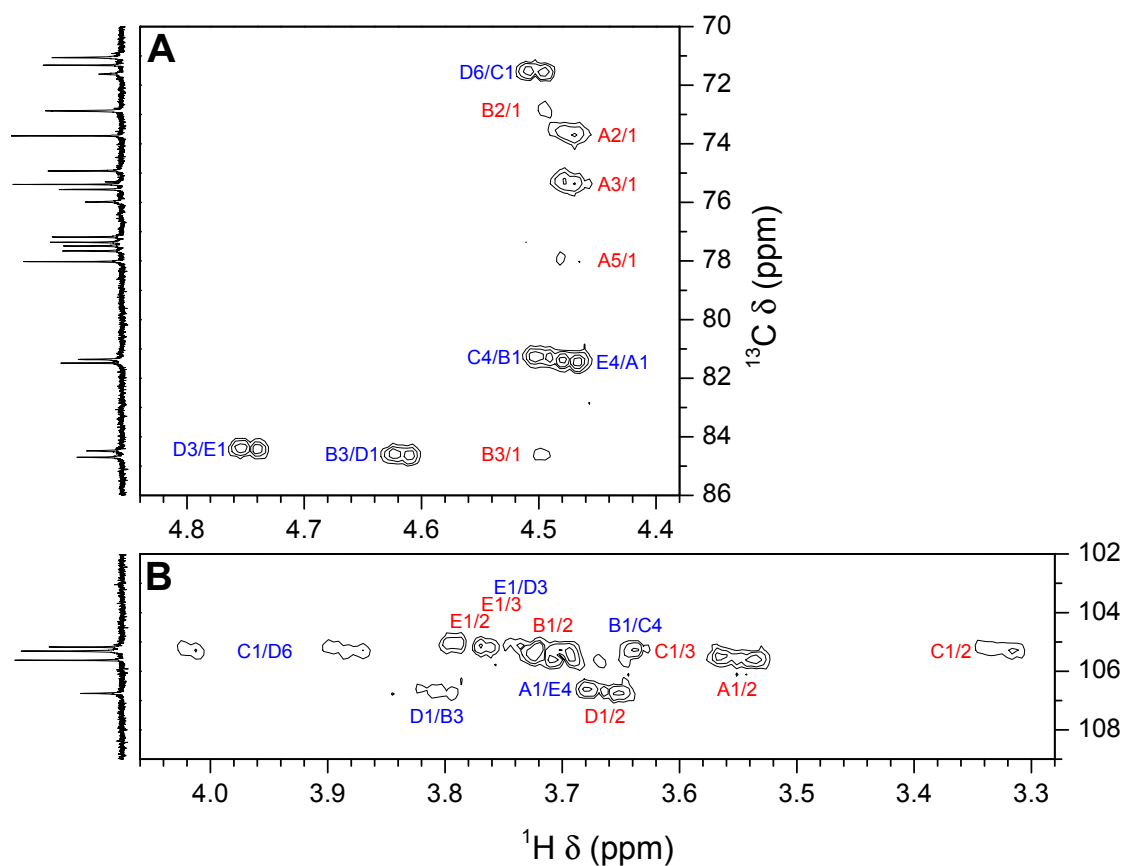
**Figure S3. Portion of the 500.1 MHz correlation spectroscopy (COSY) spectrum.** The gradient-enhanced two-dimensional spectrum of the desialylated polysaccharide was obtained in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at 60 °C. 512 increments of 1 K complex data points were acquired in magnitude mode with a digital resolution of 2.7 Hz/point in the  $t_2$  dimension and 5.5 Hz/point in the  $t_1$  dimension. The  $t_2$  dimension was processed by multiplication with an unshifted sinebell window function and Fourier transform, and the  $t_1$  dimension by Zhu-Bax linear prediction to 1024 points with 16 coefficients, multiplication with an unshifted sinebell window function, Fourier transform, and magnitude calculation. The  $f_2$  trace corresponds to the one-dimensional spectrum (see Fig. 2B).



**Figure S4. Portion of the 500.1 MHz rotating-frame nuclear Overhauser effect spectroscopy without total correlation spectroscopy (T-ROESY) spectrum.** The gradient-enhanced two-dimensional spectrum of the desialylated polysaccharide was obtained in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at 60 °C.  $2 \times 160$  increments of 1 K complex data points were acquired using echo-antiecho with a mixing time of 150 ms and a digital resolution of 2.7 Hz/point in the  $t_2$  dimension and 17.6 Hz/point in the  $t_1$  dimension. The  $t_2$  dimension was processed by multiplication with a  $\pi/2$  shifted sinebell window function, Fourier transform, and phase correction, and the  $t_1$  dimension by Zhu-Bax linear prediction to 512 points with 16 coefficients, multiplication with a  $\pi/2$  shifted sinebell window function, Fourier transform, and phase correction. Only negative contours are shown. Inter- and intra-residue correlations are labelled in blue and red, respectively. The  $f_2$  trace corresponds to the one-dimensional spectrum (see Fig. 2B).



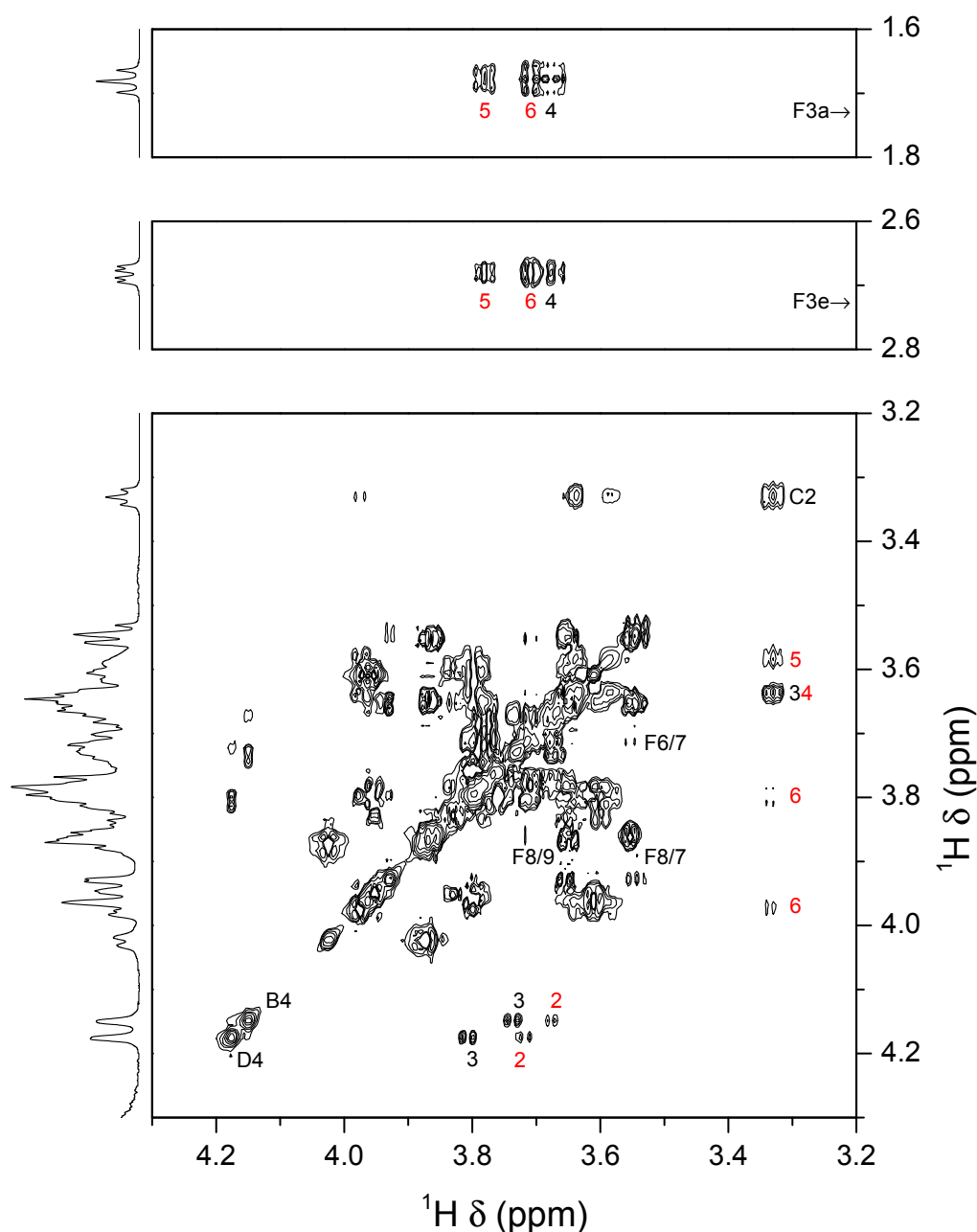
**Figure S5. Portion of the 700.3 MHz heteronuclear single-quantum coherence total correlation spectroscopy (HSQC–TOCSY) spectrum.** The gradient-enhanced two-dimensional spectrum of the desialylated polysaccharide was obtained in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at 74 °C.  $2 \times 180$  increments of 768 complex data points were acquired in the echo–antiecho mode with a mixing time of 35 ms and a digital resolution of 9.1 Hz/point in the  $t_2$  dimension and 55.6 Hz/point in the  $t_1$  dimension. The  $t_2$  dimension was processed by multiplication with a  $\pi/2$  shifted sinebell window function, zero filling, Fourier transform, and phase correction, and the  $t_1$  dimension by Zhu-Bax linear prediction to 512 points with 16 coefficients, multiplication with a  $\pi/2$  shifted sinebell window function, Fourier transform, and phase correction. Only positive contours are shown. The  $f_1$  trace corresponds to the one-dimensional spectrum (see Fig. S2A).



**Figure S6. Portions of the 700.3 MHz heteronuclear multiple-bond coherence (HMBC) spectrum showing correlations to anomeric protons (A) and from anomeric carbons (B).**

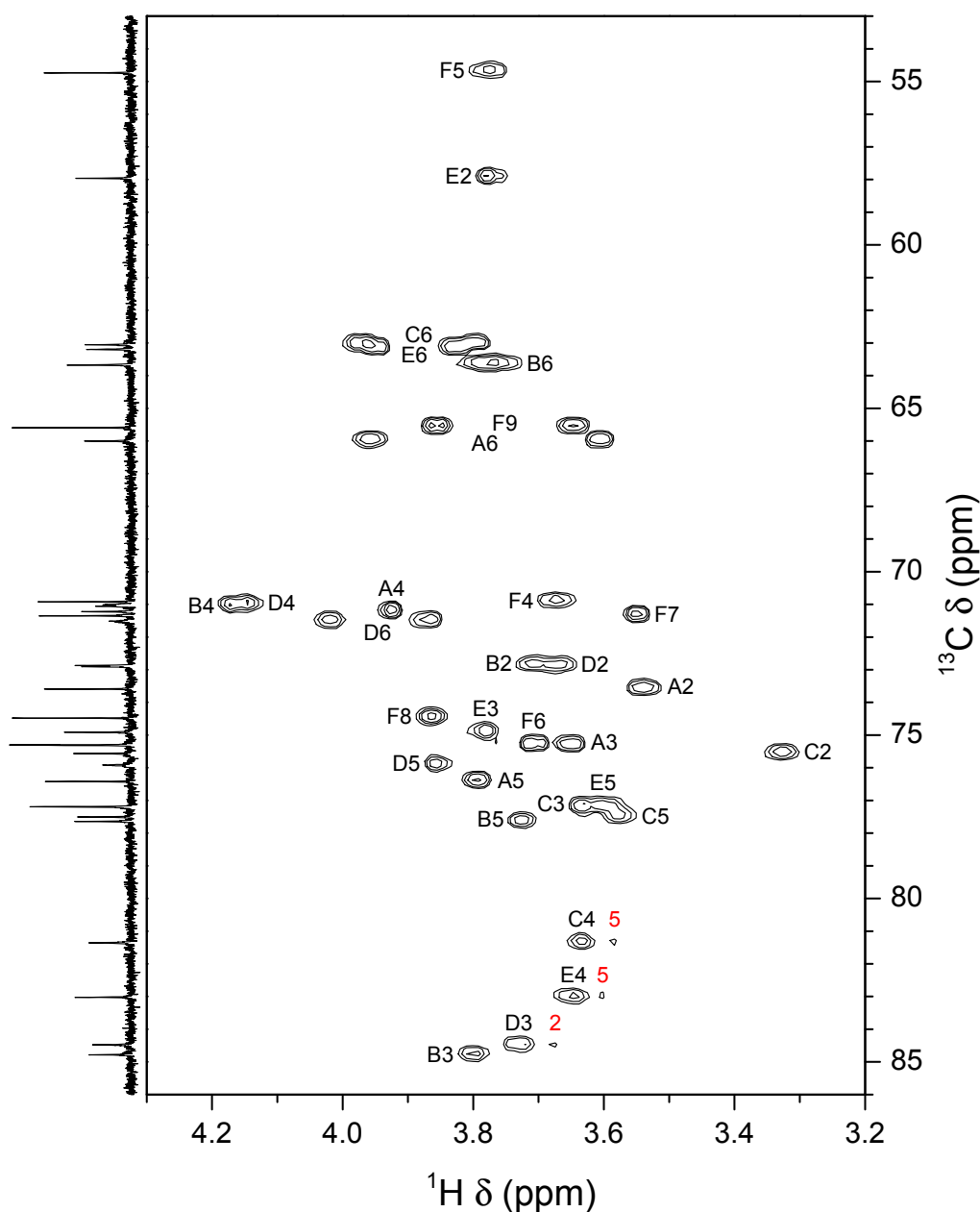
The gradient-enhanced two-dimensional spectrum of the desialylated polysaccharide was obtained in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at 74 °C. 512 increments of 2 K complex data points were acquired in magnitude mode with a digital resolution of 2.9 Hz/point in the  $t_2$  dimension and 58.5 Hz/point in the  $t_1$  dimension. The  $t_2$  dimension was processed by multiplication with an unshifted sinebell window function and Fourier transform, and the  $t_1$  dimension by Zhu-Bax linear prediction to 1024 points with 16 coefficients, multiplication with an unshifted sinebell window function, Fourier transform, and magnitude calculation. Inter- and intra-residue correlations are labelled in blue and red, respectively. The  $f_1$  trace corresponds to the one-dimensional spectrum (see Fig. S2A).



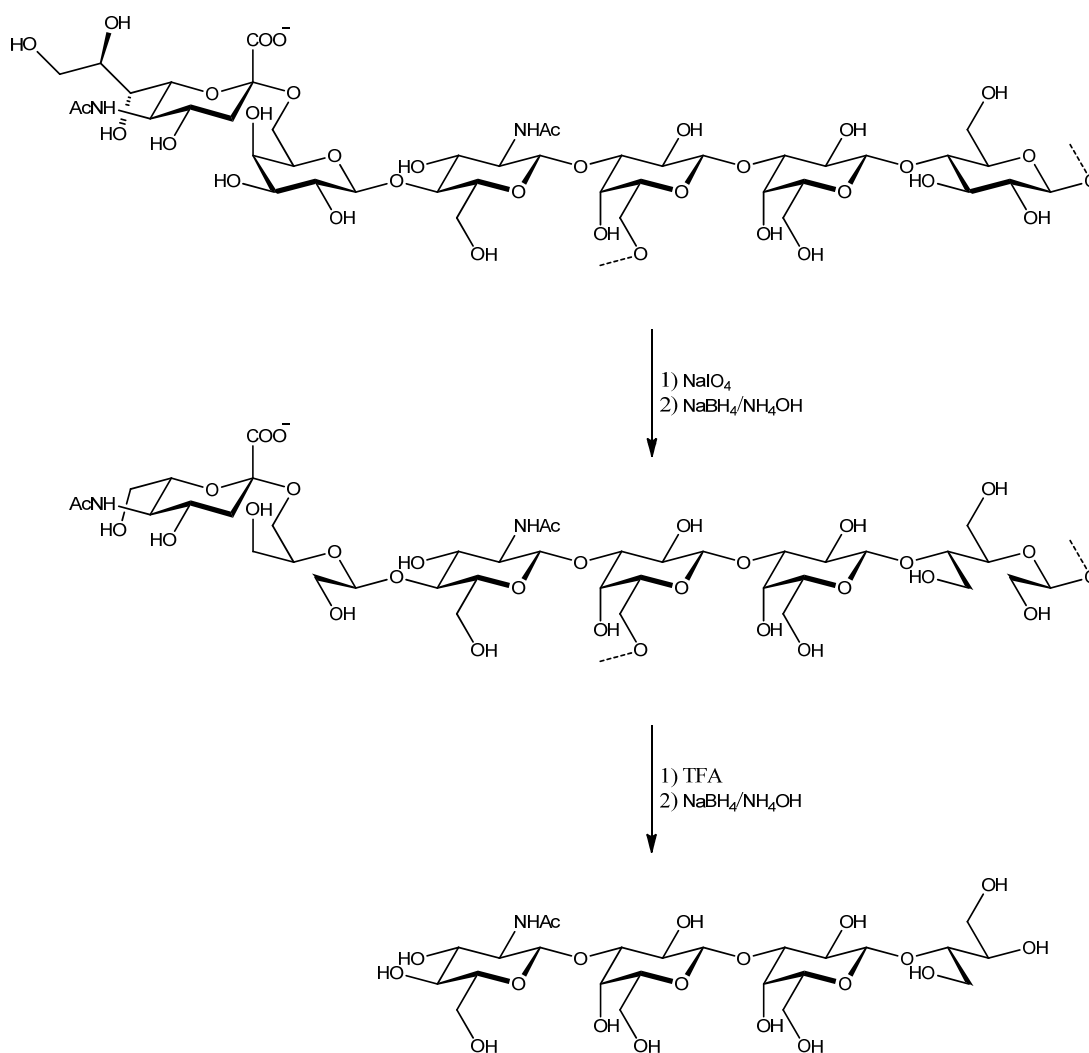


**Figure S7. Portions of the 700.3 MHz total correlation spectroscopy (TOCSY) spectrum.**

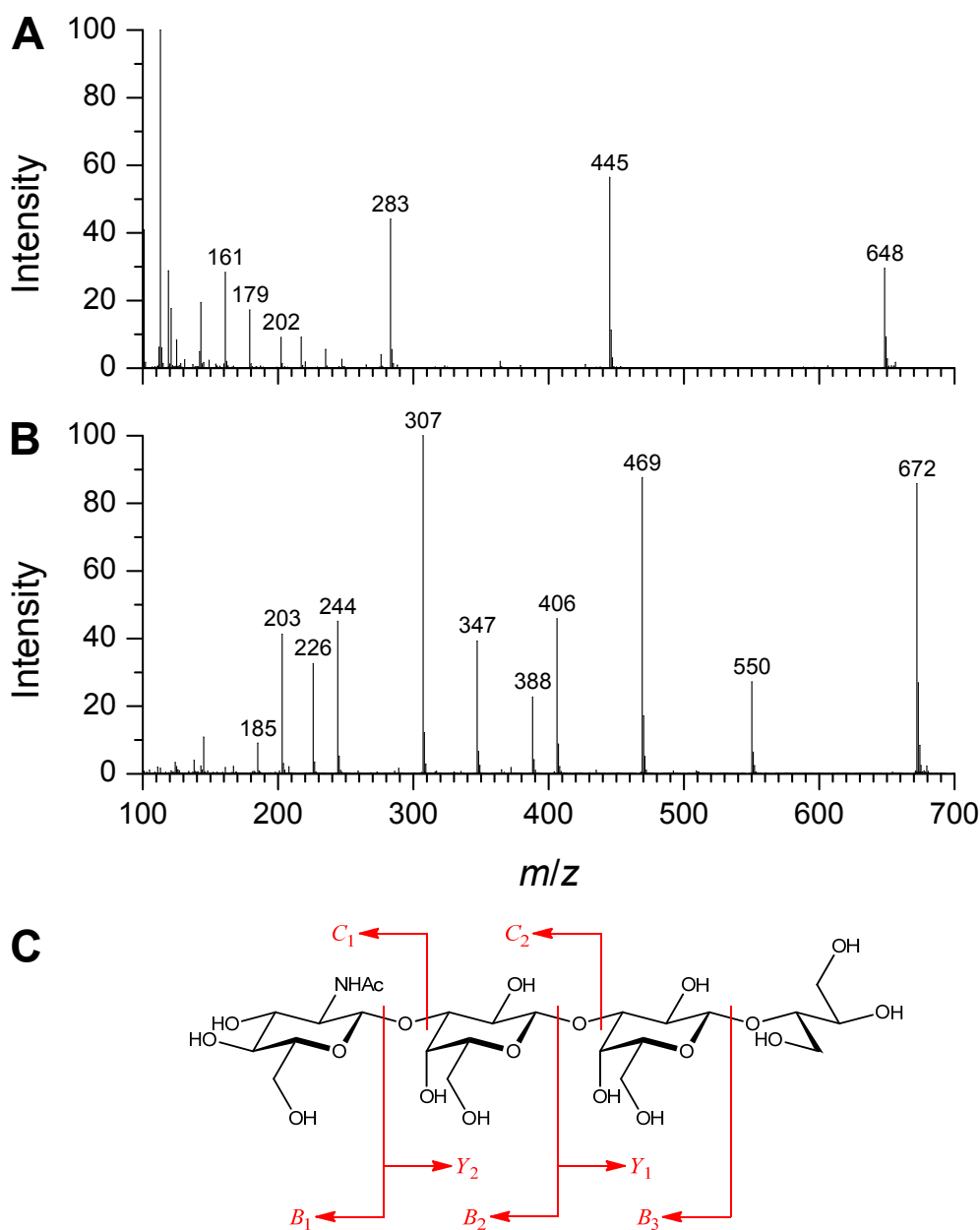
The two-dimensional spectrum of the native capsular polysaccharide (CPS) was obtained in 80 mM phosphate buffer (p<sup>2</sup>H 8.0) in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O at 77 °C. 2 × 320 increments of 2 K complex data points were acquired in the States with time-proportional phase incrementation (States-TPPI) mode with a mixing time of 80 ms and a digital resolution of 2.4 Hz/point in the *t*<sub>2</sub> dimension and 15.6 Hz/point in the *t*<sub>1</sub> dimension. The *t*<sub>2</sub> dimension was processed by multiplication with a  $\pi/2$  shifted sinebell window function, Fourier transform, and phase correction, and the *t*<sub>1</sub> dimension by Zhu-Bax linear prediction to 1024 points with 16 coefficients, multiplication with a  $\pi/2$  shifted sinebell window function, Fourier transform, and phase correction. Only positive contours are shown. The *f*<sub>1</sub> trace corresponds to the one-dimensional spectrum (see Fig. 2A).



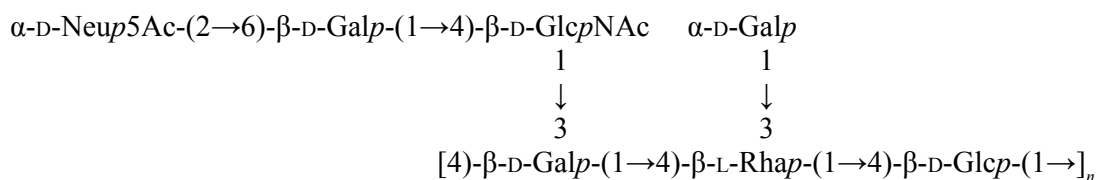
**Figure S8. Portion of the 700.3 MHz heteronuclear single-quantum coherence (HSQC) spectrum.** The gradient-enhanced two-dimensional spectrum of the native capsular polysaccharide (CPS) was obtained in 80 mM phosphate buffer (p<sup>2</sup>H 8.0) in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O at 77 °C. 2 × 200 increments of 700 complex data points were acquired in the States with time-proportional phase incrementation (States-TPPI) mode with a digital resolution of 9.3 Hz/point in the *t*<sub>2</sub> dimension and 65.0 Hz/point in the *t*<sub>1</sub> dimension. The *t*<sub>2</sub> dimension was processed by multiplication with a  $\pi/2$  shifted sinebell window function, zero filling, Fourier transform, and phase correction, and the *t*<sub>1</sub> dimension by Zhu-Bax linear prediction to 512 points with 16 coefficients, multiplication with a  $\pi/2$  shifted sinebell window function, Fourier transform, and phase correction. Only positive contours are shown. Red labels indicate three-bond correlations. The *f*<sub>1</sub> trace corresponds to the one-dimensional spectrum.



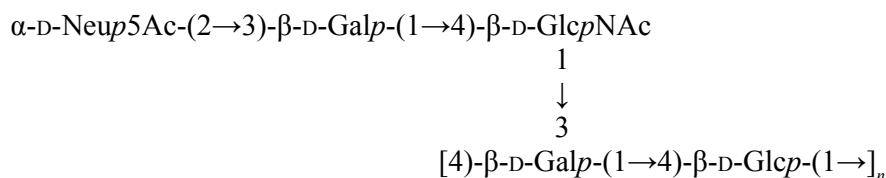
**Scheme S1. Reaction scheme for the preparation of the oligosaccharide.** The native capsular polysaccharide (CPS) was oxidized with periodate, reduced with sodium borohydride in aqueous ammonia to obtain the modified polysaccharide, which was submitted to Smith degradation consisting in a mild acid hydrolysis followed also by reduction



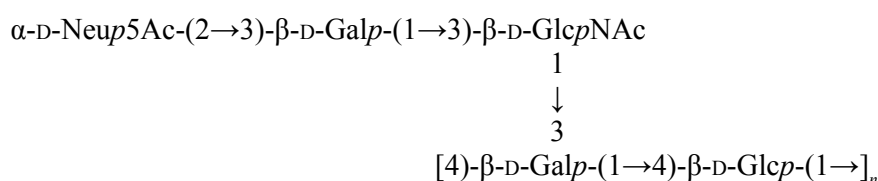
**Figure S9. Mass spectra of the oligosaccharide obtained by Smith degradation of the oxidized–reduced polysaccharide.** (A) Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI–MS/MS) spectrum of the molecular ion at  $m/z$  648.3 in negative-ion mode. (B) Portion of the ESI–MS/MS spectrum of the molecular ion at  $m/z$  672.2 in positive-ion mode. (C) Fragmentation scheme.



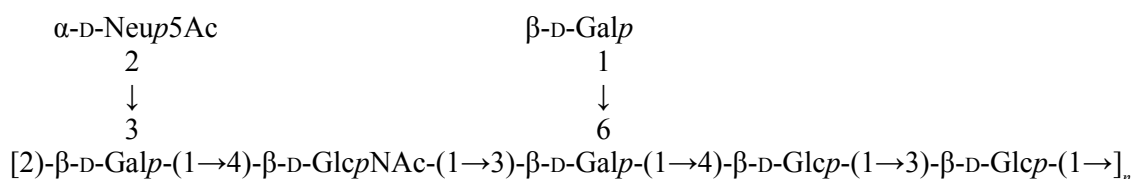
*Streptococcus suis* serotype 2



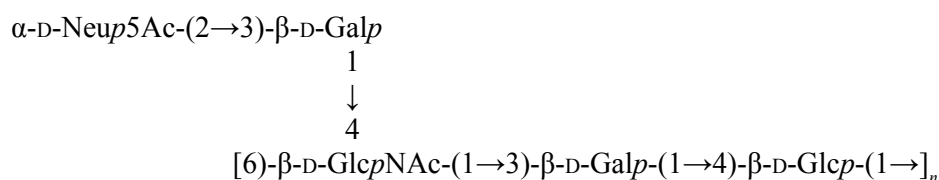
Group B *Streptococcus* (GBS) type Ia



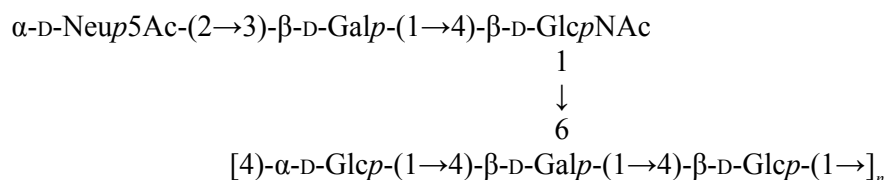
Group B *Streptococcus* (GBS) type Ib



Group B *Streptococcus* (GBS) type II



Group B *Streptococcus* (GBS) type III



Group B *Streptococcus* (GBS) type IV

**Figure S10. Structures of pathogenic streptococci capsular polysaccharides (CPSs) having features in common with that of *Streptococcus suis* serotype 14.**

**Table SI. Genes in the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 14 encoding enzymes responsible for capsular polysaccharide (CPS) biosynthesis and similarity to genes of other bacteria**

| Locus tag     | Similar gene products                       |                             |                                    | Accession no. |
|---------------|---|-----------------------------|------------------------------------|---------------|
|               | Source                                      | Gene tag                    | Product (putative)                 |               |
| <i>cps14E</i> | <i>S. suis</i> P1/7<br><i>S. agalactiae</i> | SSU0519<br>( <i>cps2E</i> ) | Glucosyltransferase                | CAR45151      |
| <i>cps14G</i> | NEM316<br><i>S. pneumoniae</i>              | <i>cpsG</i>                 | $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase | CAD46901      |
| <i>cps14H</i> | CGSP14<br><i>S. agalactiae</i>              | SPCG_0353                   | Polymerase                         | ACB89605      |
| <i>cps14I</i> | COH1  | <i>cpsI</i><br>SSU0525      | Glycosyltransferase                | AAD53070      |
| <i>cps14J</i> | <i>S. suis</i> P1/7                         | ( <i>cps2J</i> )<br>SSU0526 | Glycosyltransferase                | CAR45167      |
| <i>cps14K</i> | <i>S. suis</i> P1/7                         | ( <i>cps2K</i> )            | Glycosyltransferase                | CAR45169      |
| <i>cps14O</i> | <i>S. suis</i> P1/7                         | SSU0533                     | Sialyltransferase                  | CAR45180      |

## References

- Baums, C.G., and Valentin-Weigand, P. 2009. Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Anim. Health Res. Rev.* **10**(1): 65–83. doi:10.1017/S146625230999003X. PMID:19558750.
- Brandrup, J., Immergut, E.H., and Grulke, E.A. (Editors). 2005. *Polymer Handbook*. 4th ed. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Brisson, J.-R., Uhrinova, S., Woods, R.J., van der Zwan, M., Jarrell, H.C., Paoletti, L.C., et al. 1997. NMR and molecular dynamics studies of the conformational epitope of the type III group B *Streptococcus capsular polysaccharide* and derivatives. *Biochemistry* **36**(11): 3278–3292. doi:10.1021/bi961819l. PMID:9116006.
- Carpita, N.C., and Shea, E.M. 1989. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. *In* *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*. Edited by C.J. Biermann and G.D. McGinnis. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp. 157–216.
- Charland, N., Kellens, J.T.C., Caya, F., and Gottschalk, M. 1995. Agglutination of *Streptococcus suis* by sialic acid-binding lectins. *J. Clin. Microbiol.* **33**(8): 2220–2221. PMID:7559986.
- Cieslewicz, M.J., Chaffin, D., Glusman, G., Kasper, D., Madan, A., Rodrigues, S., et al. 2005. Structural and genetic diversity of group B *Streptococcus capsular polysaccharides*. *Infect. Immun.* **73**(5): 3096–3103. doi:10.1128/IAI.73.5.3096-3103.2005. PMID:15845517.
- Ciucanu, I., and Costello, C.E. 2003. Elimination of oxidative degradation during the per-O-methylation of carbohydrates. *J. Am. Chem. Soc.* **125**(52): 16213–16219. doi:10.1021/ja035660t. PMID:14692762.
- Dell, A., Reason, A.J., Khoo, K.-H., Panico, M., McDowell, R.A., and Morris, H.R. 1992. Mass spectrometry of carbohydrate-containing biopolymers. *Methods Enzymol.* **230**: 108–132. doi:10.1016/0076-6879(94)30010-0. PMID:8139492.
- Domon, B., and Costello, C.E. 1988. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J.* **5**(4): 397–409. doi:10.1007/BF01049915.
- Fittipaldi, N., Segura, M., Grenier, D., and Gottschalk, M. 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol.* **7**(2): 259–279. doi:10.2217/FMB.11.149. PMID:22324994.
- Gornik, O., and Lauc, G. 2007. Enzyme linked lectin assay (ELLA) for direct analysis of transferin sialylation in serum samples. *Clin. Biochem.* **40**(9–10): 718–723. doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.01.010. PMID:17320850.
- Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M., Mittal, K.R., and Henrichsen, J. 1989. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* **27**(12): 2633–2636. PMID:2480359.
- Gottschalk, M., Segura, M., and Xu, J. 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim. Health Res. Rev.* **8**(1): 29–45. doi:10.1017/S1466252307001247. PMID:17692141.
- Gottschalk, M., Xu, J., Calzas, C., and Segura, M. 2010. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol.* **5**(3): 371–391. doi:10.2217/FMB.10.2. PMID:20210549.
- Haleis, A., Alfa, M., Gottschalk, M., Bernard, K., Ronald, A., and Manickam, K. 2009. Meningitis caused by *Streptococcus suis* serotype 14, North America. *Emerg. Infect. Dis.* **15**(2): 350–352. doi:10.3201/eid1502.080842. PMID:19193296.
- Higgins, R., and Gottschalk, M. 1990. An update on *Streptococcus suis* identification. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2**(3): 249–252. doi:10.1177/104063879000200324. PMID:2094457.
- Hough, L., Jones, J.V.S., and Wusteman, P. 1972. On the automated analysis of neutral monosaccharides in glycoproteins and polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **21**(1): 9–17. doi:10.1016/S0008-6215(00)81725-5. PMID:5044142.
- Hu, P., Yang, M., Zhang, A., Wu, J., Chen, B., Hua, Y., et al. 2011. Complete genome sequence of *Streptococcus suis* serotype 14 strain JS14. *J. Bacteriol.* **193**(9): 2375–2376. doi:10.1128/JB.00083-11. PMID:21398551.

- Katsumi, M., Saito, T., Kataoka, Y., Itoh, T., Kikuchi, N., and Hiramune, T. 1996. Comparative preparation methods of sialylated capsule antigen from *Streptococcus suis* type 2 with type specific antigenicity. *J. Vet. Med. Sci.* **58**(10): 947–952. PMID:8915993.
- Kerdsin, A., Oishi, K., Sripakdee, S., Boonkerd, N., Polwichai, P., Nakamura, S., et al. 2009. Clonal dissemination of human isolates of *Streptococcus suis* serotype 14 in Thailand. *J. Med. Microbiol.* **58**(11): 1508–1513. doi:10.1099/jmm.0.013656-0. PMID:19661209.
- Leontein, K., Lindberg, B., and Lönngrén, J. 1978. Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols. *Carbohydr. Res.* **62**(2): 359–362. doi:10.1016/S0008-6215(00)80882-4.
- Lundborg, M., and Widmalm, G. 2011. Structural analysis of glycans by NMR chemical shift prediction. *Anal. Chem.* **83**(5): 1514–1517. doi:10.1021/ac1032534. PMID:21280662.
- Machytka, D., Klein, R.A., and Egge, H. 1994. Reporter resonances in the NMR spectra of oligosaccharides containing sialic acid linked to galactopyranose rings. *Carbohydr. Res.* **254**: 289–294. doi:10.1016/0008-6215(94)84262-0. PMID:8180992.
- Miller, R.L., Collawn, J.F., Jr., and Fish, W.W. 1982. Purification and macromolecular properties of a sialic acid-specific lectin from the slug *Limax flavus*. *J. Biol. Chem.* **257**(13): 7574–7580. PMID:7085639.
- Severi, E., Hood, D.W., and Thomas, G.H. 2007. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology* **153**(9): 2817–2822. doi:10.1099/mic.0.2007/009480-0. PMID:17768226.
- Shibuya, N., Goldstein, I.J., Broekaert, W.F., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B., and Peumans, W.J. 1987. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac( $\alpha$ 2–6)Gal/GalNAc sequence. *J. Biol. Chem.* **262**(4): 1596–1601. doi:10.1016/S0014-5793(98)00193-8. PMID:3805045.
- Smith, H.E., de Vries, R., van't Slot, R., and Smits, M.A. 2000. The *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: genetic determinant for the synthesis of sialic acid. *Microb. Pathogen.* **29**(2): 127–134. doi:10.1006/mpat.2000.0372. PMID:10906268.
- Sweet, D.P., Shapiro, R.H., and Albersheim, P. 1975. Quantitative analysis by various g.l.c. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydr. Res.* **40**(2): 217–225. doi:10.1016/S0008-6215(00)82604-X.
- Van Calsteren, M.-R., Gagnon, F., Lacouture, S., Fittipaldi, N., and Gottschalk, M. 2010. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide. *Biochem. Cell Biol.* **88**(3): 513–525. doi:10.1139/O09-170. PMID:20555393.
- Wang, K., Fan, W., Cai, L., Huang, B., and Lu, C. 2011. Genetic analysis of the capsular polysaccharide synthesis locus in 15 *Streptococcus suis* serotypes. *FEMS Microbiol. Lett.* **324**(2): 117–124. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02394.x. PMID:22092812.
- Watkins, E.J., Brooksby, P., Schweiger, M.S., and Enright, S.M. 2001. Septicaemia in a pig-farm worker. *Lancet* **357**(9249): 38. doi:10.1016/S0140-6736(00)03570-4. PMID:11197360.
- Wishart, D.S., Bigam, C.G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H.J., Oldfield, E., et al. 1995.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* **6**(2): 135–140. doi:10.1007/BF00211777. PMID:8589602.
- York, W.S., Darvill, A.G., McNeil, M., Stevenson, T.T., and Albersheim, P. 1986. Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. *Methods Enzymol.* **118**: 3–40. doi:10.1016/0076-6879(86)18062-1.
- Zhu, G., and Bax, A. 1992. Improved linear prediction of damped NMR signals using modified “forward–backward” linear prediction. *J. Magn. Reson.* **100**(2): 202–207. doi:10.1016/0022-2364(92)90379-L.



## ANNEXE, ARTICLE VII

# The NOD2 receptor does not play a major role in the pathogenesis of Group B *Streptococcus* in mice

Paul Lemire<sup>a</sup>, Cynthia Calzas<sup>a</sup>, Mariela Segura<sup>a</sup>

Laboratory of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal,  
Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada<sup>a</sup>

Publié dans: *Microb Pathog.* **2013**. 65:41-47.

doi: 10.1016/j.micpath.2013.09.006.

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

J'ai participé partiellement aux infections expérimentales.

**Abstract**

Group B *Streptococcus* (GBS) capsular type III is an important agent of life-threatening invasive infections. It has been previously shown that encapsulated GBS is easily internalized by dendritic cells (DCs) and this internalization has an impact on cytokine production. The intracellular receptors or pathways underlying this response are not well understood. In this work, we investigated the role of NOD2 in the pathogenesis of GBS using a mouse model of infection. NOD2<sup>-/-</sup> mice showed similar levels of survival and bacteremia than control mice. Interestingly, *ex vivo* analysis of total spleen cells from infected animals showed that the absence of NOD2 results in reduced production of inflammatory cytokines. However this abridged inflammatory response does not seem to improve mouse survival. In conclusion, we demonstrated that NOD2 is not a crucial receptor to fight GBS infection and only partially contributes to the inflammatory response.

## Introduction

Group B *Streptococcus* (GBS) or *Streptococcus agalactiae* is the main cause of life-threatening invasive bacterial infections in pregnant women and newborns in North America and Western Europe (1). Clinical manifestations of GBS infection are mainly associated with pneumonia, septicemia, and meningitis. GBS is also increasingly associated with invasive disease in nonpregnant adults, especially among the elderly and individuals with underlying chronic illnesses (2). Like many pathogenic bacteria, clinical isolates of GBS are covered by a capsular polysaccharide (CPS), recognized as the most important factor for bacterial survival within the host. Among ten GBS capsular types that have so far been characterized (1, 2), capsular type III GBS is the most common type in GBS meningitis (1). In a recent work, we showed that mouse-derived dendritic cells (DCs) efficiently internalize encapsulated GBS, but the presence of CPS confers to GBS and intracellular survival advantage compared with a non-encapsulated mutant (3). Likewise, Mancuso *et al.* (4) found GBS antigens in two distinct DC intracellular compartments: DNA<sup>+</sup> late endosomes/phagosomes and DNA<sup>-</sup> phagolysosomes containing partially digested GBS material. These observations suggest that DCs possess a high intracellular activity in response to GBS and, thus, it could be assumed that intracellular recognition of GBS is important in the immune response against this pathogen.

The innate immune system has evolved an arsenal of mechanisms to sense and destroy pathogenic bacteria (5). Innate immune response depends on pattern recognition receptors (PRRs) for detection of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). These receptors include Toll-like receptors (TLRs), RIG-I-like receptors and Nod-like receptors (NLRs) family of proteins (6). Most TLRs are transmembrane proteins for sensing extracellular pathogens whereas NLRs sense PAMPs in the cytosolic compartment. In particular, NLRs consist of more than 20 family members including nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 or 2 (NOD1, NOD2) and NLR family pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) receptors (6). NOD1 and NOD2 are known to sense molecules produced during the synthesis and/or degradation of bacterial peptidoglycan (PGN), leading to the activation of transcription factor nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (7). Particularly, NOD2 is expressed mainly in the myeloid cells such as DCs and macrophages (8, 9) and recognize muramyl dipeptide (MDP) (8), a PGN constituent of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Several *in vitro* or *in vivo* studies demonstrated that NOD2 is an important mediator of host defense against a variety of

pathogens, including intracellular bacteria like *Listeria monocytogenes* (10), *Mycobacterium tuberculosis* (11-13) and *Legionella pneumophila* (14). NOD2 has also been reported to modulate the immune response to extracellular bacteria, such as *Streptococcus pneumoniae* (15-17), *Streptococcus pyogenes* (18), *Streptococcus suis* (19, 20) and *Staphylococcus aureus* (21-25).

Recently, Costa *et al.* reported that activation of the inflammasome, an inflammatory signaling complex, by GBS type III is involved in host defense against this pathogen and mediates *in vitro* production of interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) and IL-18, but not of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) by DCs. Activation of the NLRP3 inflammasome required GBS expression of  $\beta$ -hemolysin, an important virulence factor (26). In previous studies, we demonstrated that GBS internalization by DCs is largely required for modulation of IL-12, IL-10 and C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) pathways (3). We hypothesized that, besides NLRP3, other intracellular receptors sense GBS and influence the immune response and/or bacterial clearance. *In vitro* studies performed so far failed to demonstrate a clear role of NOD in GBS interactions with macrophages (27, 28). Thus, to clarify the impact of NOD2 in the pathogenesis of GBS infection, we performed *in vivo* studies using NOD2<sup>-/-</sup> mice.

## Materials and Methods

### *Bacterial strains and growth conditions*

In this study, we used strain COH-1, a highly encapsulated type III GBS isolate, extensively described in previous work (3, 4, 36, 37). This strain was kindly provided by Dr. C.E. Rubens, Children's Hospital and Medical Center, University of Washington, Seattle, WA. GBS organisms were grown in Todd–Hewitt Broth (THB) or agar (THA) (Becton Dickinson, Mississauga, Ontario, Canada) or on sheep blood agar plates at 37°C for 18 h. Isolated GBS colonies were inoculated in THB, incubated for 8 h at 37°C with shaking. Working cultures for *in vivo* infection were prepared by transferring 10 µl of 1/1000 dilutions of 8 h-cultures into 30 ml of THB which was incubated for 12 h at 37°C with agitation. Bacteria were washed and resuspended in 20 ml of THB to obtain an OD<sub>600 nm</sub> value of 0.5-0.6, which corresponded to  $2 \times 10^7$  CFU/ml. The number of CFU/ml in the final suspension used for mouse infection was determined by plating samples onto THA using an Autoplate 4000 Automated Spiral Plater (Spiral Biotech, Norwood, MA).

### *Mouse strains*

B6.129S1-*Nod2*<sup>tm1Flv/J</sup> mice possessing a nucleotide-binding oligomerization domain targeted mutation (referred here as NOD2<sup>-/-</sup>) and respective control C57BL/6J WT mice were used (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). All experiments involving mice were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals by the Animal Welfare Committee of University of Montreal.

### *Experimental infections*

Female, 6-week-old, NOD2<sup>-/-</sup> or respective control WT mice (Jackson Laboratories) were acclimatized to standard laboratory conditions of a 12-h-light/12-h-dark cycle with free access to rodent chow and water. On the day of the experiment, a 0.5 ml volume of either the bacterial suspension ( $10^6$  CFU or  $10^7$  CFU) or the vehicle solution (sterile THB) was administrated by intraperitoneal (i.p.) injection. Three independent preliminary trials were performed to establish the optimal bacterial doses and time points (data not shown). A total of 8 mice per mouse strain and dose were closely monitored daily to record mortality and clinical signs of disease, such as

depression, rough appearance of hair coat, and swollen eyes. Mice exhibiting extreme lethargy were considered moribund and were humanely euthanized. Blood samples were collected from the tail at 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 24 h and every 24-48 h until 7 days post-infection, and plated onto blood agar plates. Blood agar plates were incubated overnight at 37 °C. Colonies were counted as described above and expressed as CFU/ml of blood.

#### *Ex-vivo cytokine production by total spleen cells*

To measure ongoing cytokine production in the spleen, mice were euthanized at 8 h post-infection. Spleens from normal and infected ( $10^7$  CFU) mice were removed aseptically. Single-cell suspensions were prepared in of RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovin serum, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine and 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol. All reagents were from Gibco (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Red blood cells were lysed and the cell suspensions were filtered through a sterile mesh. The viability of the cells was determined by trypan blue (Invitrogen) exclusion and was always >95%. Aliquots of 1-ml cell suspensions at a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/ml were cultured in triplicate in 48-well tissue culture plates in complete medium. After 4 h of incubation, the bacteriostatic agent chloramphenicol (12  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) was added to the culture to prevent cell toxicity as previously reported (3). The above described final culture conditions for *ex vivo* analysis were selected based on multiple pre-trials using different post-infection times (6 h and 12 h) combined with different times of chloramphenicol addition (data not shown). The cultures were incubated for 24 h to 72 h at 37°C in a humidified CO<sub>2</sub> incubator. Supernatants were collected and stored at -20°C until assayed for cytokine levels. In selected experiments, cells were harvested at 48 h of incubation and analyzed by FACS (see below). In addition to spleens, blood was collected by cardiac puncture from infected and control mice at 8 h post-infection to measure cytokine levels in serum.

#### *Cytokine quantification by ELISA*

Levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) in cell culture supernatants and/or serum were measured by sandwich ELISA using pair-matched antibodies from R&D Systems (Minneapolis, MN), according to the manufacturer's recommendations. Twofold dilutions of recombinant mouse cytokines were used to generate standard curves. Sample dilutions giving OD readings in the

linear portion of the appropriate standard curve were used to quantify the levels of each cytokine.

#### *Ex vivo FACS analysis of total splenocytes*

For multi-parametric FACS of total splenocytes,  $10^6$  cells were washed and treated for 15 min on ice with FcR-blocking reagent (Fc $\gamma$ III/II Rc Ab, BD PharMingen, BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada) in sorting buffer (PBS-1% heat-inactivated fetal bovine serum). Blocked cells were then incubated with PE-conjugated anti-CD19 (clone 1D3), FITC-conjugated anti-CD3 (clone 17A2), and PE-conjugated anti-mouse CD69 mAb (clone H1.2F3) for 30 min on ice. Anti-CD19 and anti-CD69 were from BD PharMingen and anti-CD3 was from BioLegend (San Diego, CA). FACS was performed using a FACSCanto II instrument (BD Biosciences). Fifty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using FACSDiva Version 6.1.3 software.

#### *Statistical analysis*

Data are presented as survival curves using the Kaplan-Meier method, mean  $\pm$  SEM or geometric mean with 95% confidence interval where appropriate. Prism v.5 (Graphpad) was used for data analysis. Log-rank (Mantel-Cox) tests were used to compare the survival curves of the different studied groups. An independent Student *t*-test was performed to find statistical differences between groups.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results and Discussion

### *NOD2 does not contribute to host defense against GBS in adult mice*

NOD2 is known to be involved in host recognition of bacteria, although its role in the host response to Group B *Streptococcus* infection has not been fully described. The primary function of NOD2 is to serve as pattern recognition receptors for bacteria and/or their products (8). Several hypotheses are possible about the role of NOD2 in bacterial pathogenesis. The first hypothesis is that bacterial recognition by NOD2 leads a protective response and allows the host immune system to fight infection. Indeed, it was reported that NOD2<sup>-/-</sup> mice were significantly more susceptible to *S. aureus* infection and had higher bacterial tissue burden than control mice (21). To explore if NOD2 also plays a protective role in the pathogenesis of GBS type III disease, we infected wild-type (WT) C57BL/6 or NOD2<sup>-/-</sup> mice with a sub-lethal bacterial dose (10<sup>6</sup> CFU). Mice were monitored every 4 h for clinical signs and mortality up to 14 days post-infection. In addition, bacterial burden was measured in blood samples at different times post-infection. All WT mice survived the infection and presented low bacterial load in the blood (10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> CFU) during the first hours post-infection (Fig. 1A and B). Bacterial load remained stable at 8 h post-infection and started to decrease at 24 h post-infection (data not shown). No significant differences in clinical signs, survival levels or blood bacterial burdens were observed between sub-lethally infected NOD2<sup>-/-</sup> mice and WT mice (Fig. 1), suggesting that NOD2 is not playing a major role in host protection against GBS infection in adult mice.

A second hypothesis is that, at high bacterial doses, NOD2 contributes to an exacerbated inflammatory response and thus worsen disease progression. A previous study reported that NOD2 mRNA expression was up-regulated after pneumococcal infection and contribute to the recognition and establishment of *S. pneumoniae* infection (16). Pre-trial studies indicated that at a dose of 10<sup>7</sup> CFU, GBS causes severe clinical signs associated with septicemia and/or septic shock, such as depression, swollen eyes, rough hair coat, weakness and high bacterial load in blood during the first 24 h post-infection (data not shown). Thus, we used this bacterial infectious dose to evaluate the contribution of NOD2 to the development of immuno-pathology. We observed 100% of mortality in infected WT mice after 24 h post-infection. Mice presented extremely high levels of bacteremia (10<sup>8</sup> CFU) as early as 4 h post-infection (Fig. 1A and B). Similar results were obtained with 10<sup>7</sup> CFU-infected NOD2<sup>-/-</sup> mice and the Kaplan-Meier survival curves were non-significantly different ( $P > 0.05$ ).



Based on these findings, and independently of the bacterial dose, NOD2 does not seem to have an important role in the pathogenesis of GBS disease in an adult mouse model of infection. We cannot, however, rule out the possibility that other compensatory pathways might also be involved. For instance, Costa *et al.* reported a role of NLRP3 in the recognition of GBS type III *in vitro*. In addition, adult mice lacking NLRP3 were more susceptible to infection by a GBS type Ib strain, suggesting involvement of NLRP3 in anti-GBS defense (26). It remains to evaluate *in vivo* whether NLRP3 plays a role in the context of GBS type III infection. In addition, the role of NOD2 in a neonate mouse model of GBS infection warrants further studies.

#### *NOD2 contributes to cytokine and chemokine production during GBS infection*

In aforementioned experiments, we demonstrated that NOD2 does not seem to play a major role in modulating bacterial clearance and does not influence mouse survival. Cytokines and chemokines are known to be important mediators of early immune responses. Thus, to give more insight into the observed phenotype of GBS-infected NOD2<sup>-/-</sup> mice, we measured expression levels of several cytokines and chemokines following GBS infection. To this aim, we infected NOD2<sup>-/-</sup> mice and control WT mice with 10<sup>7</sup> CFU of GBS type III for 8 h. Total spleen cells were harvested and analyzed *ex vivo*. Production of cytokines was observed at 24 h of *ex vivo* incubation (data not shown) reaching maximal levels between 48 h and 72 h. The only exception was IFN- $\gamma$ , as its production was optimal at 72 h post-incubation (Fig. 2). GBS-infected NOD2<sup>-/-</sup> mice exhibited reduced levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  and of the chemokine CXCL9 and CXCL10 compared to GBS-infected WT mice. Reduced levels of the T helper (Th) 1 cytokine IFN- $\gamma$  were also observed (Fig. 2). To evaluate the role of NOD2 in GBS induction of circulating cytokines, serum levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL9 and CXCL10 were measured at 8 h post-infection. Fig. 3 shows diminished levels of circulating cytokines in GBS-infected NOD2<sup>-/-</sup> mice that in WT infected counterparts, confirming results obtained with total spleen cells.

The NOD2 receptor was reported to be implicated in elevated levels of inflammatory mediators, astrogliosis and demyelination, following *in vivo* administration of *S. pneumoniae* (17). The role of NOD2 during *S. aureus* infection is controversial. Kapetanovic *et al.* demonstrated that NOD2 is not a crucial receptor to fight *S. aureus*-induced pneumonia, but that it contributes to the inflammatory response in the lungs. In fact, the absence of NOD2 led to a lesser inflammation and was finally beneficial for

the animal recovery (24). In contrast, another study showed that NOD2<sup>-/-</sup> mice are more susceptible to *S. aureus* infection and that NOD2 have a critical role in regulating the immune response. Increased susceptibility was due in part to defective neutrophil phagocytosis, elevated serum levels of Th1 cytokines, and a higher bacterial tissue burden (21). In our GBS mouse infection model, serum and *ex vivo* cytokine profiles do not correlate with mouse survival, suggesting that NOD2 receptor is not crucial in regulating the inflammatory response during the course of the infection or the observed reduced levels are not sufficient to alter the immuno-pathological outcome. Finally, we cannot rule out the involvement of other compensatory receptors, such as surface expressed TLRs and/or intracellular located TLRs (29, 30). For example, the release of IL-23 by *S. suis*-stimulated dendritic cells was reported to involve complex synergies between TLR2, NOD2 and other unknown TLRs (19).

#### *Role of NOD2 in the regulation of CD69 expression by cells of the adaptive immune system*

The impaired cytokine secretion in infected NOD2-deficient mice may suggest a consequent role of NOD2 in adaptive immune response to GBS. However, few studies have examined the contribution of NOD2 to the adaptive immune response (31, 32). To start dissecting a potential role of NOD2 in this response, we evaluated expression levels of the T and B cell activation marker CD69 (33). CD69 is a type II C-type lectin involved in lymphocyte migration and cytokine secretion. CD69 expression represents one of the earliest available indicators of leukocyte activation and its rapid induction occurs through transcriptional activation. Multi-parametric FACS analyses of *ex vivo* total splenocytes showed no major differences in CD69 expression levels (either at the % or mean fluorescence intensity levels) between WT T and B cells and NOD2<sup>-/-</sup> cells during GBS type III infection (Fig. 4). Further studies would be required to measure the impact of NOD2 in the development of adaptive immunity, and more importantly on the generation of anti-GBS specific antibodies.

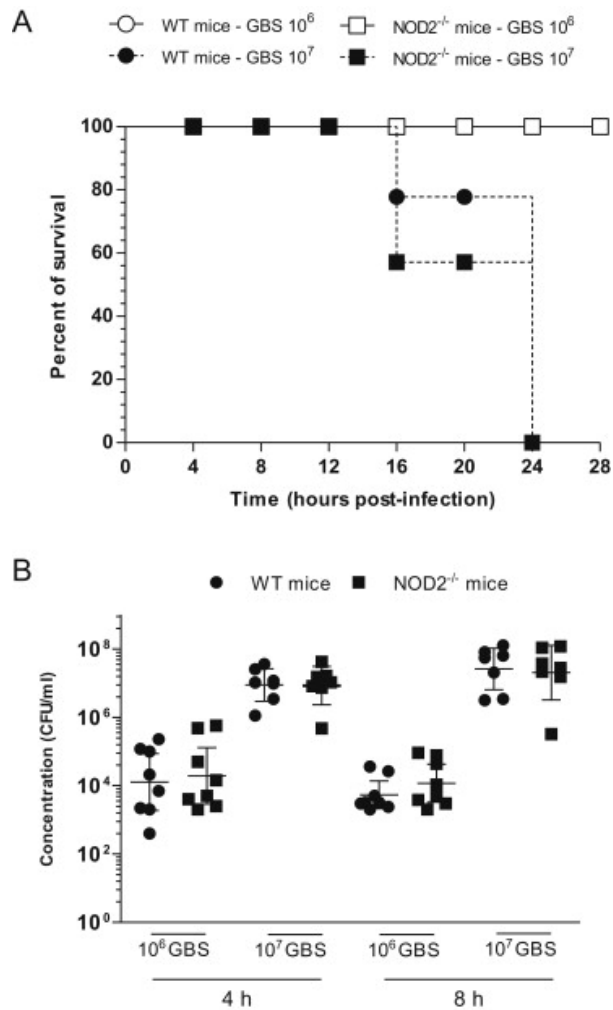
#### **Conclusion**

In our present study we demonstrated that in the case of GBS type III infection, cytokine production is partially attenuated in NOD2<sup>-/-</sup> mice. However, this reduced inflammatory response does not seem to significantly influence bacterial burden in blood or survival rates under our assays conditions. Altogether, our data and previous

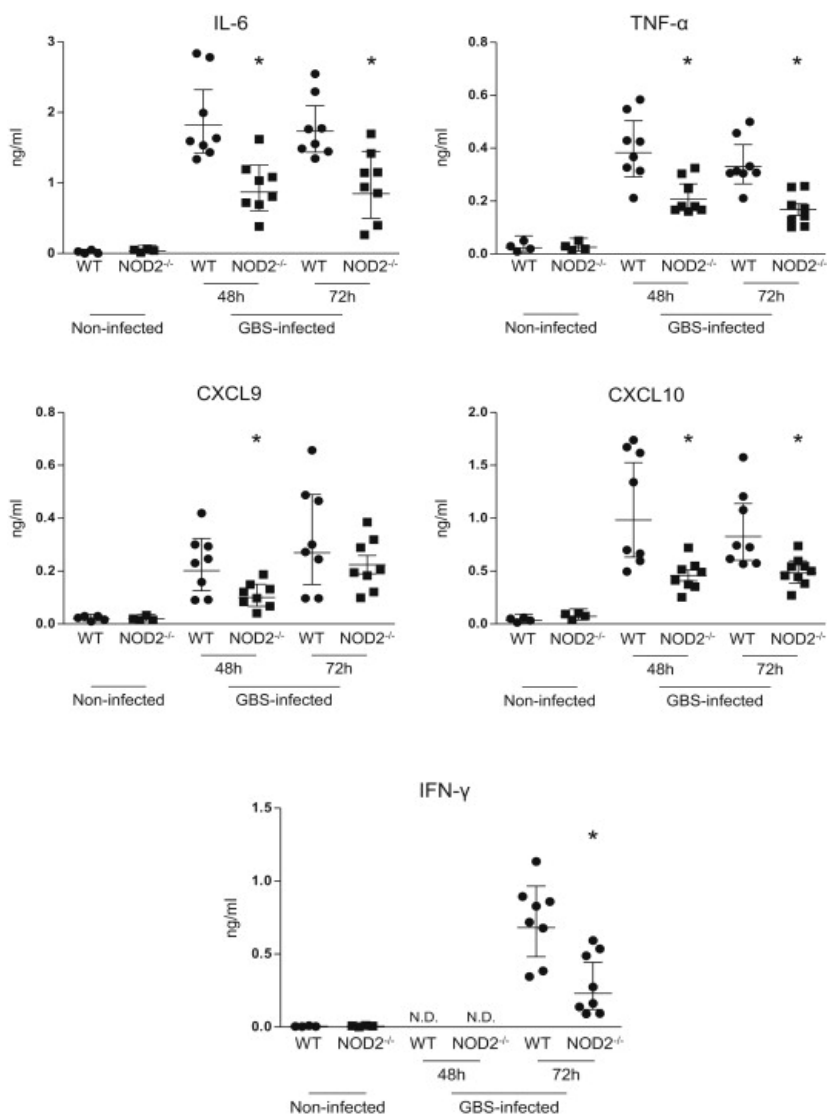
*in vitro* studies support the hypothesis that GBS use complex TLR-dependent, NLRP3-dependent, NOD2-dependent in addition to TLR/NOD2-independent pathways to modulate host immune responses (4, 26-28, 34, 35).

### **Acknowledgments**

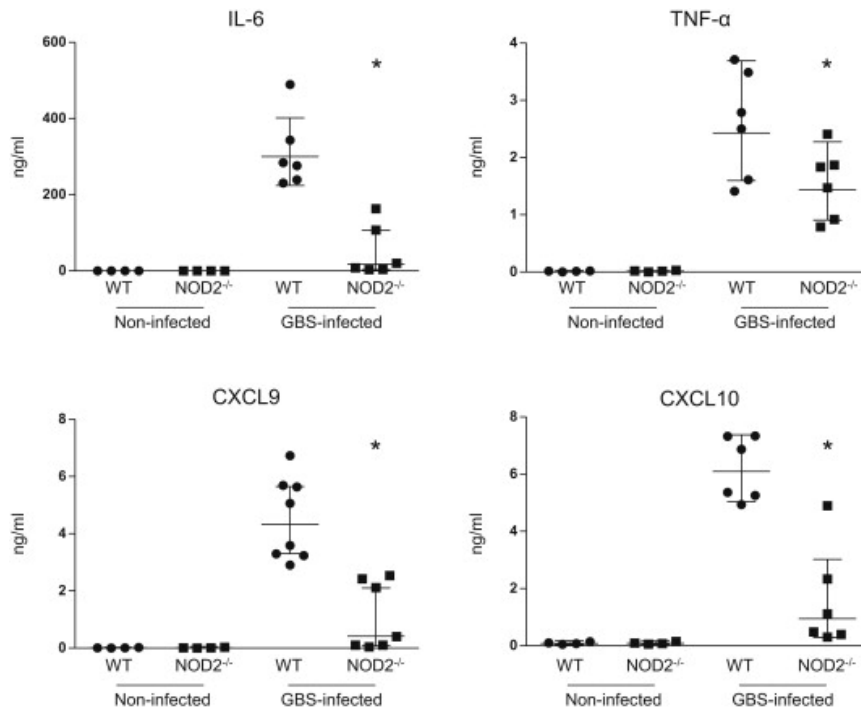
We are grateful to Sonia Lacouture (Université de Montréal, Canada) for useful discussions and technical help with mouse infections. We would like to thank Tristan Galbas and Jacques Thibodeau (Université de Montréal, Canada) for their contribution to FACS data acquisition and analysis. This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through grant to MS (#342150-07). PL is the recipient of a PhD Award granted by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies.



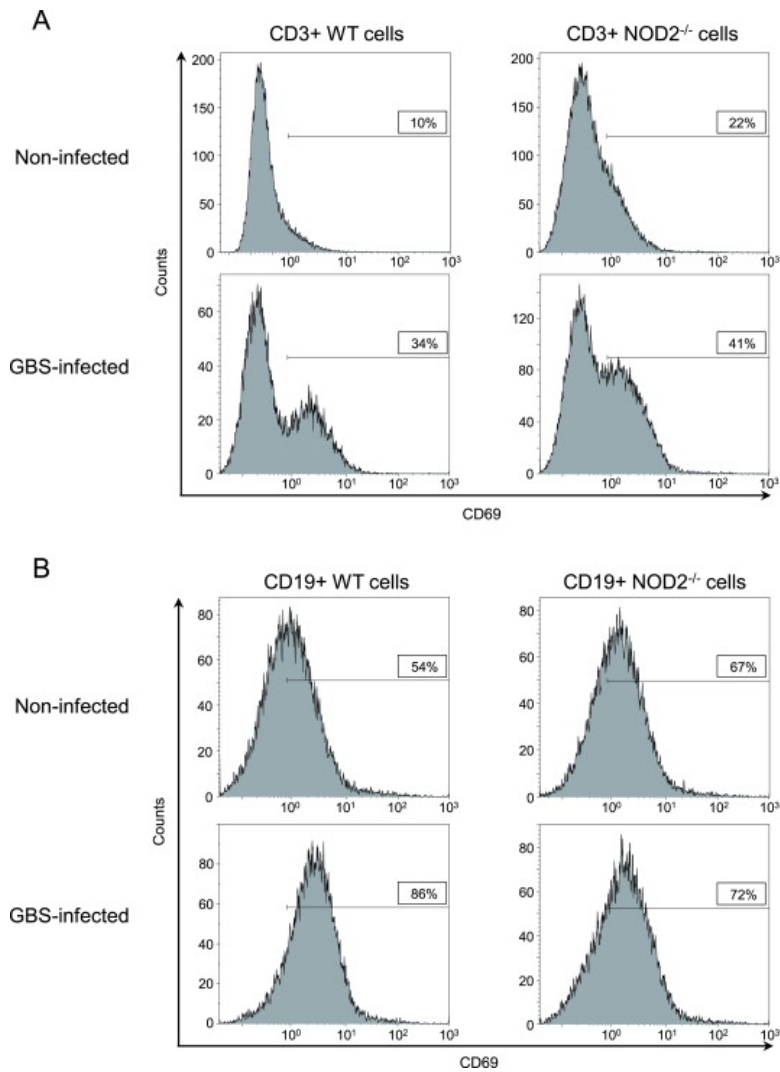
**Figure 1. Absence of NOD2 receptor does not alter mouse susceptibility to GBS infection.** (A) Survival curves of wild-type (WT) C57BL/6 and NOD2<sup>-/-</sup> mice intraperitoneally-infected with  $1 \times 10^6$  or  $1 \times 10^7$  CFU of GBS type III strain COH-1 ( $n = 8$ ). (B) Blood bacteremia of mice infected as described above. Blood samples were collected from the tail at 4 h and 8 h post-infection, and plated onto blood agar plates. Colonies were counted and data expressed as CFU/ml of blood. Data are displayed as individual mouse values, geometric means with 95% confidence interval are also indicated.



**Figure 2. Ex-vivo production of pro-inflammatory cytokines and chemokines is reduced in NOD2<sup>-/-</sup> mice infected with GBS.** Wild-type (WT) C57BL/6 and NOD2<sup>-/-</sup> mice were intraperitoneally infected with  $1 \times 10^7$  CFU of GBS type III strain COH-1, and euthanized at 8 h post-infection. Mock-infected mice (vehicle solution only) were used as non-infected controls. Spleen cells were harvested, cultured *ex vivo* and production of IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL9 and CXCL10 in culture supernatants was measured by ELISA after 48 h and 72 h of incubation. IFN- $\gamma$  levels were measured after 72 h of incubation. Cells from non-infected mice served as negative control (no differences in control cytokine levels were observed between 48 h and 72 h; the latter time point is shown in the figure). Data are displayed as individual mouse values ( $n = 8$ ) from 2 independent experiments (using 4 mice per group, per experiment). Geometric means with 95% confidence interval are also indicated. \*  $P < 0.05$  indicates statistically significant differences between WT infected-mice and NOD2<sup>-/-</sup> infected-mice. N.D. not determined.



**Figure 3. Serum pro-inflammatory cytokine production is reduced in NOD2<sup>-/-</sup> mice infected with GBS.** Wild-type (WT) C57BL/6 and NOD2<sup>-/-</sup> mice were intraperitoneally infected with  $1 \times 10^7$  CFU of GBS type III strain COH-1, and euthanized at 8 h post-infection. Mock-infected mice (vehicle solution only) were used as non-infected controls. Serum was collected and production of IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL9 and CXCL10 measured by ELISA. Data are displayed as individual mouse values ( $n = 8$ ) from 2 independent experiments (using 4 mice per group, per experiment). Geometric means with 95% confidence interval are also indicated. \* $P < 0.05$  indicates statistically significant differences between WT infected-mice and NOD2<sup>-/-</sup> infected-mice.



**Figure 4. CD69 expression by T and B cells is not significantly altered in GBS-infected NOD2<sup>-/-</sup> mice.** Wild-type (WT) C57BL/6 and NOD2<sup>-/-</sup> mice were intraperitoneally infected with  $1 \times 10^7$  CFU of GBS type III strain COH-1, and euthanized at 8 h post-infection. Mock-infected mice (vehicle solution only) were used as non-infected controls. Spleen cells were harvested and cultured for 48 h. Cells were recovered and stained for CD69 in combination with the surface markers CD3 (T cells; Panel A) and CD19 (B cells; Panel B) for multi-parametric FACS analysis. Representative data from 3 individual mice. Numbers in the boxes indicate the % of CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> cells or CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> cells, respectively.

## References

1. **Koenig JM, Keenan WJ.** 2009. Group B *Streptococcus* and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatr Clin North Am* **56**:689-708.
2. **Edwards MS, Baker CJ.** 2005. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* **41**:839-847.
3. **Lemire P, Houde M, Lecours MP, Fittipaldi N, Segura M.** 2012. Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells. *Microbes Infect* **12**:1064-1076.
4. **Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, et al.** 2009. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* **10**:587-594.
5. **Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783-801.
6. **Creagh EM, O'Neill LA.** 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* **27**:352-357.
7. **Franchi L, Park JH, Shaw MH, Marina-Garcia N, Chen G, et al.** 2008. Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol* **10**:1-8.
8. **Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nunez G.** 2009. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol* **4**:365-398.
9. **Kanneganti TD, Lamkanfi M, Nunez G.** 2007. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* **27**:549-559.
10. **Anand PK, Tait SW, Lamkanfi M, Amer AO, Nunez G, et al.** 2011. TLR2 and RIP2 pathways mediate autophagy of *Listeria monocytogenes* via extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation. *J Biol Chem* **286**:42981-42991.
11. **Gandotra S, Jang S, Murray PJ, Salgame P, Ehrt S.** 2007. Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2-deficient mice control infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **75**:5127-5134.
12. **Juarez E, Carranza C, Hernandez-Sanchez F, Leon-Contreras JC, Hernandez-Pando R, et al.** 2012. NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Eur J Immunol* **42**:880-889.
13. **Ferwerda G, Girardin SE, Kullberg BJ, Le Bourhis L, de Jong DJ, et al.** 2005. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **1**:279-285.
14. **Berrington WR, Iyer R, Wells RD, Smith KD, Skerrett SJ, et al.** 2010. NOD1 and NOD2 regulation of pulmonary innate immunity to *Legionella pneumophila*. *Eur J Immunol* **40**:3519-3527.
15. **Davis KM, Nakamura S, Weiser JN.** 2011. Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice. *J Clin Invest* **121**:3666-3676.
16. **Opitz B, Puschel A, Schmeck B, Hocke AC, Rosseau S, et al.** 2004. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **279**:36426-36432.
17. **Liu X, Chauhan VS, Young AB, Marriott I.** 2010. NOD2 mediates inflammatory responses of primary murine glia to *Streptococcus pneumoniae*. *Glia* **58**:839-847.
18. **Heinhuis B, Koenders MI, van de Loo FA, van Lent PL, Kim SH, et al.** 2010. IL-32gamma and *Streptococcus pyogenes* cell wall fragments synergise for IL-1-dependent destructive arthritis via upregulation of TLR2 and NOD2. *Ann Rheum Dis* **69**:1866-1872.
19. **Lecours MP, Segura M, Fittipaldi N, Rivest S, Gottschalk M.** 2012. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS One* **7**:e44746.
20. **Zheng H, Sun H, Dominguez-Punaro Mde L, Bai X, Ji S, et al.** 2013. Evaluation of the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* sequence type 7 using the infection of BV2 microglial cells. *J Med Microbiol* **62**:360-368.
21. **Deshmukh HS, Hamburger JB, Ahn SH, McCafferty DG, Yang SR, et al.** 2009. Critical role of NOD2 in regulating the immune response to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **77**:1376-1382.



22. **Hruz P, Zinkernagel AS, Jenikova G, Botwin GJ, Hugot JP, et al.** 2009. NOD2 contributes to cutaneous defense against *Staphylococcus aureus* through alpha-toxin-dependent innate immune activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:12873-12878.
23. **Volz T, Nega M, Buschmann J, Kaesler S, Guenova E, et al.** 2010. Natural *Staphylococcus aureus*-derived peptidoglycan fragments activate NOD2 and act as potent costimulators of the innate immune system exclusively in the presence of TLR signals. *FASEB J* **24**:4089-4102.
24. **Kapetanovic R, Jouvion G, Fitting C, Parlato M, Blanchet C, et al.** 2010. Contribution of NOD2 to lung inflammation during *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia. *Microbes Infect* **12**:759-767.
25. **Fournier B, Philpott DJ.** 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* **18**:521-540.
26. **Costa A, Gupta R, Signorino G, Malara A, Cardile F, et al.** 2012. Activation of the NLRP3 inflammasome by Group B streptococci. *J Immunol* **188**:1953-1960.
27. **Charrel-Dennis M, Latz E, Halmen KA, Trieu-Cuot P, Fitzgerald KA, et al.** 2008. TLR-independent type I interferon induction in response to an extracellular bacterial pathogen via intracellular recognition of its DNA. *Cell Host Microbe* **4**:543-554.
28. **Bebien M, Hensler ME, Davanture S, Hsu LC, Karin M, et al.** 2012. The Pore-Forming Toxin beta hemolysin/cytolysin Triggers p38 MAPK-Dependent IL-10 Production in Macrophages and Inhibits Innate Immunity. *PLoS Pathog* **8**:e1002812.
29. **Kawai T, Akira S.** 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* **21**:317-337.
30. **Takeuchi O, Akira S.** 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**:805-820.
31. **Lecat A, Piette J, Legrand-Poels S.** 2010. The protein NOD2: an innate receptor more complex than previously assumed. *Biochem Pharmacol* **80**:2021-2031.
32. **Magalhaes JG, Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Travassos LH, et al.** 2008. NOD2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *J Immunol* **181**:7925-7935.
33. **Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR.** 1994. The activation antigen CD69. *Stem Cells* **12**:456-465.
34. **Wennekamp J, Henneke P.** 2008. Induction and termination of inflammatory signaling in Group B streptococcal sepsis. *Immunol Rev* **225**:114-127.
35. **Deshmukh SD, Kremer B, Freudenberg M, Bauer S, Golenbock DT, et al.** 2011. Macrophages recognize streptococci through bacterial single-stranded RNA. *EMBO Rep* **12**:71-76.
36. **Chaffin DO, Mentele LM, Rubens CE.** 2005. Sialylation of Group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by *cpsK* and is required for optimal capsule polymerization and expression. *J Bacteriol* **187**:4615-4626.
37. **Lemire P, Houde M, Segura M.** 2012. Encapsulated Group B *Streptococcus* modulates dendritic cell functions via lipid rafts and clathrin-mediated endocytosis. *Cell Microbiol* **14**:1707-1719.