

dm 11.3091.7

Université de Montréal

Effet du fer et du manganèse sur la croissance bactérienne et l'expression de
protéines de surface chez *Streptococcus suis* sérotype 2

par
Fatmé Younes

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option Microbiologie

Avril, 2003

© Fatmé Younes, 2003



SF

607

USD

2003

v.018

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effet du fer et du manganèse sur la croissance bactérienne et l'expression de
protéines de surface chez *Streptococcus suis* sérotype 2

présenté par :

Fatmé Younes

À été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Sylvain Quessy

.....
président-rapporteur

Dr. Marcelo Gottschalk

.....
directeur de recherche

Dr. Donald Niven

.....
codirecteur

Dr. Mario Jacques

.....
membre du jury

Mémoire accepté le :

Résumé

Les infections occasionnées par *Streptococcus suis* sont un problème à l'échelle mondiale. Elles affectent l'industrie porcine ainsi que les humains qui travaillent dans l'environnement à proximité des porcs ou de ses produits. La méningite est l'une des pathologies les plus communes causées par ce pathogène. La pathogénèse des infections causées par *S. suis* est encore peu comprise. Cependant, il est rapporté que *S. suis* survit plusieurs jours dans la circulation sanguine, un environnement habituellement peu propice à la prolifération bactérienne, avant de se rendre au système nerveux central du porc. Le but de cette étude était donc de déterminer si les concentrations de fer (Fe) et de manganèse (Mn) affectaient la croissance bactérienne et l'expression de protéines membranaires chez *S. suis* sérotype 2. Des isolats pathogènes et non-pathogènes *S. suis* sérotype 2, provenant d'Amérique du Nord et d'Europe, ont été cultivés dans différentes conditions de croissance enrichies et appauvries en Fe et/ou Mn. Toutes les souches testées ont été capables de pousser relativement bien dans des conditions restreintes en Fe ([Fe] disponible nulle) et appauvries en Mn ([Mn] disponible faible). Par contre, les souches virulentes paraissaient plus affectées par des conditions limitantes en Mn que les souches non-virulentes. Le phénotype et l'origine géographique des souches n'ont fait aucune différence dans les résultats observés. A l'aide de gels d'électrophorèse en une et deux dimensions, nous avons comparé les profils protéiques d'un isolat pathogène Nord-Américain cultivé dans les différents milieux conditionnés. Les conditions restreintes en

fer n'ont pas entraîné de modifications dans le profil des protéines membranaires. Toutefois, les conditions limitantes en Mn pourraient influencer l'expression protéique de la souche. Nos résultats indiquent que des concentrations réduites en Mn provoquent la régulation positive et négative de certaines protéines attachées à la paroi, parmi lesquelles une protéine de 38 kDa présentant une homologie de séquence avec PstC, un transporteur de phosphate de type ABC. Les épreuves d'immunobuvardage avec des sérums de porcs convalescents infectés expérimentalement avec *S. suis* suggèrent que la protéine de 38 KDa est exprimée *in vivo* et immunogène. Nous pensons que l'expression de PstC représente un mécanisme utilisé par *S. suis* pour faire face au stress oxydatif à la fois endogène et exogène.

Mots clés: *Streptococcus suis*, expression protéique différentielle, fer, manganèse.

Summary

Streptococcus suis infections represent a major problem world-wide in the swine industry and also affect humans who work in close proximity to pigs or pig products. Meningitis is the most common pathological manifestation of infection due to this pathogen. The pathogenesis of *S. suis* infection is not well understood. During meningitis, virulent *S. suis* survive in the hostile environment of the bloodstream for almost five days whereas avirulent strains are cleared quickly. In the present work, the effects of low iron (Fe) and/or manganese (Mn) conditions on the growth of *S. suis* and on its production of cell-envelope proteins were studied. For this, pathogenic and non-pathogenic isolates from North America and Europe were tested. All strains, whether from Europe or North America, were able to grow in total absence of Fe and surface protein profiles were unchanged by Fe-restriction. Both growth and protein expression were observed to be influenced by medium Mn concentration. There was an important correlation between virulence and the ability to grow in Mn-depleted media but the geographical origin and the phenotype did not seem to make a difference. Comparison by one- and two-dimensional- gel electrophoresis between cell-envelope fractions from a virulent North American *S. suis* strain grown in Mn-replete and Mn-deficient media revealed up- and down- regulation of many polypeptides including a 38 kDa polypeptide with good sequence homology to a phosphate ABC-transporter PstC. Immunoblot analysis using sera from convalescent pigs experimentally infected with *S. suis* suggested expression *in vivo* of the 38

kDa Mn-regulated protein. One of the most likely explanations for overexpression of PstC is that it may help *S. suis* to cope with oxidative stress originating both endogenously and exogenously.

Key words: *Streptococcus suis*, differential protein expression, iron, manganese.

Table des matières

Page

Résumé	iii
Summary	v
Table des matières	vii
Liste des figures	x
Liste des sigles et abréviations	xi
Remerciements	xiii
Dédicace	xiv
Introduction	1
Revue de la littérature	3
1. <i>Streptococcus suis</i>	3
1.1. Historique de l'espèce <i>S. suis</i>	3
1.2. Les infections causées par <i>S. suis</i>	4
1.3. Facteurs de virulence.....	6
1.3.1. Définition de la virulence.....	6
1.3.2. Facteurs de virulence potentiels chez <i>S. suis</i>	6
1.3.2.1. La capsule.....	7
1.3.2.2. Adhésines.....	10
1.3.2.2.1. Protéine liant les IgG.....	10
1.3.2.2.2. Protéine liant l'albumine.....	11
1.3.2.2.3. Protéine liant la fibronectine.....	11
1.3.2.2.4. Hémagglutinines.....	13
1.3.2.3. Protéines MRP et EF.....	13
1.3.2.4. Hémolysine.....	15
1.3.2.5. Autres facteurs.....	16
1.3.2.5.1. Protéines de stress.....	16
1.3.2.5.2. Fimbriae.....	17
1.3.2.5.3. Sortase.....	17
1.3.2.5.4. Plasmides.....	18

1.3.3. Différences souches européennes vs nord-américaines.....	18
1.4. Pathogénie de l'infection.....	19
1.5. Traitement et contrôle de l'infection.....	20
2. Le fer.....	22
2.1. Importance du fer pour les microorganismes pathogènes.....	22
2.2. Problèmes liés au fer	23
2.2.1. Solubilité/disponibilité	23
2.2.2. Toxicité	23
2.3. Le rôle du fer dans l'infection et la virulence bactérienne.....	24
2.3.1. Adaptations bactériennes.....	25
2.3.1.1. Systèmes d'acquisition du fer.....	25
2.3.1.2. Système de défense anti-oxydatif.....	27
2.3.2. Le fer et la régulation de la virulence bactérienne.....	28
2.3.3. Le fer entre la bactérie et l'hôte : effets bactéricides et bactériostatiques.....	30
2.3.4. Le fer et la sensibilité aux agents antimicrobiens.....	30
2.4. Relations des bactéries Gram (+) avec le fer.....	31
2.4.1. Les staphylocoques.....	31
2.4.2. Les streptocoques.....	33
2.4.3. <i>S. suis</i>	35
3. Le manganèse.....	36
3.1. Importance du manganèse pour les microorganismes.....	36
3.1.1. Généralités.....	36
3.1.2. Le manganèse : un antioxydant.....	38
3.1.3. Autres rôles du manganèse.....	39
3.2. Le transport du manganèse.....	40
3.2.1. Les trois types de transporteurs de manganèse.....	41
3.2.1.1. ATPase de type-P chez <i>L. plantarum</i>	41
3.2.1.2. Transporteurs de type-ABC	42
3.2.1.3. NRAMP.....	44
3.2.2. La régulation du mécanisme d'acquisition du manganèse..	46

3.2.2.1. Importance de l'acquisition du manganèse.....	47
3.2.2.1.1. La croissance et l'expression protéique.....	47
3.2.2.1.2. La protection contre les ROS.....	48
3.3. Le rôle du manganèse dans l'infection et la virulence bactérienne.....	50
3.4. Homéostasie du manganèse et pathogénie des infections streptococciques.....	53
3.5. Rôle du manganèse dans la pathogénie des microorganismes intracellulaires.....	54
Article: Effect of iron and manganese availability on growth and expression of surface-associated proteins by <i>Streptococcus suis</i> serotype 2.....	58
Discussion	102
Conclusions	111
Références	112
Annexe	135

Liste des figures

Page

Revue de la littérature

Figure 1: Model linking Mn ²⁺ homeostasis and ROS-detoxification pathways in streptococci.....	53
---	----

Article

Figure 1: Growth of virulent versus avirulent <i>S. suis</i> serotype 2 strains from North-America and Europe in different environmental conditions.....	99
--	----

Figure 2: Comparison of cell-envelope protein profiles and immunoblotting of <i>S. suis</i> 89-999 grown in various environmental conditions.....	100
---	-----

Figure 3: Two-dimensional (2D) separation of <i>S. suis</i> 89-999 cell-envelope extracts from Mn-replete (A) or Mn-deplete (B) cultures.	101
--	-----

Annexe

Figure 1: Growth of <i>A. suis</i> in different environmental conditions.....	136
---	-----

Liste des sigles et abréviations

AD:	Arginine déaminase
Bf:	Bactéioferritine
BHM:	Barrière hémato-méningée
BMEC:	Brain microvascular endothelial cell
CPS:	Capsule polysaccharidique
EDDA:	Ethylenediamine di-o-hydroxyphenylacetic acid
EF:	Extracellular factor
FBPS:	Fibronectin/Fibrinogen-binding proteins
Fe:	Fer
Fur:	Ferric uptake regulation repressor protein
GAPDH:	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GAS:	Group A Streptococci
GBS:	Group B Streptococci
Hb:	Hémoglobine
HUVEC:	Human umbilical vein endothelial cell
IBP:	Iron-binding protein
IgG:	Immunoglobuline de type G
IL:	Interleukine
kDa	Kilodaltons
Lf:	Lactoferrine
Mn:	Manganèse
MRP:	Muramidase-released protein

PCR:	Polymerase chain reaction
PVDF:	Polyvinylidene difluoride
ROS:	Reactive oxygen species
SNC:	Système nerveux central
SOD:	Superoxyde dismutase
sTYE-H:	Supplemented TYE-H
Tf:	Transferrine
TNF- α :	Tumor necrosis factor alpha
TYE-H:	HEPES-buffered tryptone-yeast extract medium

Remerciements

Même si la plupart du temps ils ne comprenaient pas tout ce que je faisais au laboratoire, ma famille et mes ami(e)s ont toujours été d'un grand soutien, je les remercie pour leur présence dans les bons et moins bons moments et pour leur affection. J'aimerais adresser mes remerciements à tous mes collègues (passés et présents) de l'Université McGill et de l'Université de Montréal qui m'ont apporté leur soutien technique et moral tout au long de ce projet, spécialement : Dr. Andrew Ekins, Fred Bahrami, Nahuel Fittipaldi, Dina Al-Numani, Dr. Gabriela Martinez et Dr. Benoit d'Amours. Je suis sincèrement reconnaissante au Dr. Marcos Di Falco et au Dr. Leonid Kriazhev de Génome Québec pour le temps généreusement accordé et leur patience. Micheline St-Germain, Hélène Boucher et Yolande Beaudry n'ont jamais été avares de réponses devant toutes mes interrogations du côté administratif.

J'aimerais remercier spécialement mes superviseurs Dr. Marcelo Gottschalk et Dr. Donald Niven pour m'avoir donné l'opportunité d'entreprendre ce projet de maîtrise dans leurs laboratoires et pour leur patience lorsque je traversais des moments difficiles. Je n'oublie pas Sonia Lacouture qui prendra soin de ce petit « bébé » après mon départ. Je remercie tous les membres du laboratoire ainsi que tous les membres et étudiants du Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc.

J'adresse une pensée très particulière à ma mère, à ma soeur et à ma collègue et amie Dina Al-Numani pour le trésor de sollicitude qu'elles ont manifesté à mon endroit ces derniers temps, toutes ces petites ou grandes attentions qui m'ont facilité la vie. Je vous remercie d'avoir cru en moi lorsque j'avais de la difficulté à croire en moi-même...

Dédicace

***« Rien ne s'obtient jamais sans en payer le prix
Le succès ne dépend que de la volonté
C'est le fruit du labeur et de l'assiduité
Persévérez toujours, envers et contre tout
Gardez la tête haute au plus dur du combat
Reprenez votre souffle, mais n'abandonnez pas »***

À mes parents, pour leur amour et leur présence...

Introduction

L'interaction entre l'hôte et le microorganisme pathogène lors d'une infection est un vrai champ de bataille où les stratégies du microbe pour survivre et se multiplier se heurtent au système de défense immunitaire de l'hôte. Pour supporter leur croissance et leur multiplication, les germes virulents doivent être capables, entre autre, de satisfaire leurs besoins nutritionnels spécifiques. *In vivo*, ils peuvent acquérir la plupart des nutriments dont ils ont besoin, vitamines, carbone, azote, nucléotides, sulfates, phosphates etc... Le fer ($Fe/Fe^{2+}/Fe^{3+}$) et le manganèse (Mn/Mn^{2+}) sont des nutriments indispensables pour la plupart des organismes vivants. En fait, ils participent à une panoplie de réactions chimiques vitales pour la cellule. Dans les fluides extracellulaires des animaux, la concentration de fer libre et de manganèse semble incompatible avec la croissance de la plupart des microorganismes. Pourtant, les bactéries pathogènes se multiplient avec succès et arrivent à causer l'infection, voire la mort dans les cas extrêmes.

Les infections à *Streptococcus suis* sont très répandues dans tous les pays producteurs de porcs. La maladie a des répercussions économiques importantes au niveau mondial et les pertes sont de l'ordre de 300 millions de dollars pour les seuls Etats Unis d'Amérique. Depuis une dizaine d'années, le nombre de cas d'infections à *S. suis* chez l'espèce porcine a considérablement augmenté et il semble que ce soit un problème en émergence. *S. suis* est un microorganisme qui a d'abord été reconnu comme un pathogène pour l'espèce porcine, mais on le retrouve maintenant de plus en plus chez d'autres espèces animales (bovins, équins, oiseaux). Il est aussi un agent de zoonose, surtout pour les personnes travaillant en contact avec des porcs ou avec de la viande de porcs contaminés, causant des méningites, des septicémies et des endocardites. Son importance ne doit donc pas être sous-estimée si l'on tient compte de l'envergure de l'industrie porcine au Québec. De tous les sérotypes de *S. suis* officiellement décrits jusqu'à maintenant, le sérotype 2 est reconnu comme le plus fréquent et le plus pathogène à travers le monde. Actuellement, il est impossible de

différencier aisément les souches de sérotype 2 virulentes des souches non-virulentes. En effet, les facteurs de virulence de *S. suis* ne sont pas encore bien connus, ce qui complique l'étude de la pathogénie de l'infection ainsi que le développement de vaccins efficaces. Différentes structures bactériennes ou produits bactériens tels que la capsule, les fimbriae, des protéines extracellulaires ou associées à la paroi cellulaire ainsi qu'une hémolysine ont été considérés comme facteurs de virulence potentiels. Plusieurs évidences laissent suggérer que la capsule a pour rôle, entre autres, d'aider la bactérie à survivre plus longtemps dans la circulation sanguine chez l'hôte, mais ce seul facteur ne suffit pas puisque des souches virulentes capsulées y survivent en grand nombre pour plus de cinq jours tandis que des souches non-virulentes tout aussi capsulées disparaissent de la circulation sanguine en deux jours.

Des résultats préliminaires indiquent que la croissance de la souche de référence de *S. suis* sérotype 2 nécessite du manganèse mais pas de fer. L'indifférence vis à vis du fer serait un avantage non négligeable pour la bactérie *in vivo* puisque contrairement aux autres microorganismes, elle ne serait pas confrontée aux conditions limitantes en fer imposées par l'hôte, et pourrait coloniser plus facilement les muqueuses, envahir les tissus et la circulation sanguine. Certes, l'habilité d'un microorganisme à se multiplier dans l'environnement pauvre en fer de l'hôte est un facteur essentiel, mais certainement pas le seul affectant l'issue d'une infection. Le pouvoir de multiplication sera finalement la résultante de l'activité bactérienne, de ses facteurs de pathogénicité et des réactions de défense de l'hôte.

L'objectif général de ce projet est de déterminer si les conditions pauvres en fer et en manganèse imposées par l'hôte influencent la croissance bactérienne et l'expression de protéines de surface chez des souches virulentes et non-virulentes de *S. suis* sérotype 2 d'origine Européenne et Nord-Américaine.

Revue de la littérature

1. *Streptococcus suis*

1.1. Historique de l'espèce *Streptococcus suis*

Au début des années 1960, en Europe, De Moor isole des streptocoques α -hémolytiques chez des porcelets atteints de méningite et de septicémie (de Moor, 1963). D'abord identifiées comme appartenant à de nouveaux groupes de Lancefield (R, S, RS et T), il est finalement démontré que ces bactéries étaient capsulées et que leur caractérisation était fondée sur la composition du matériel capsulaire (et non sur la paroi). La capsule masquait en fait la paroi typique du groupe D. C'est alors que fut proposée une nouvelle espèce, *S. suis*, et que les groupes R, S et RS devinrent respectivement les sérotypes 2, 1 et 1/2. Ce n'est cependant qu'en 1987 qu'elle est officiellement acceptée comme une espèce distincte (Kilpper-Balz and Schleifer, 1987). Elle est reconnue comme une espèce génétiquement homogène, différente des autres membres du groupe D et ce, malgré une composition de la paroi qui est semblable. Au cours des dernières années, plusieurs autres sérotypes ont été mis en évidence. La sérotypie est importante et en Amérique du Nord, elle est le plus souvent effectuée au moyen de la co-agglutination (Gottschalk and Segura, 2000). On dénombre jusqu'à présent 35 sérotypes différents (sérotypes 1 à 34 et sérotypes 1/2) (Higgins *et al.*, 1995). Le séquençage de l'ARN ribosomal 16S a montré une forte similarité (94-100%) entre la plupart des souches de référence des 35 sérotypes de *S. suis* (Chatellier *et al.*, 1998). Des études de typage de ce même ARN ribosomal 16S révèlent que *S. suis* est génétiquement très éloigné des autres membres du groupe D (Brousseau *et al.*, 2001; Chatellier *et al.*, 1999). Les 35 sérotypes répertoriés ne se retrouvent pas en proportion équivalente dans la population porcine : si le sérotypes 1 est généralement associé aux infections chez de très jeunes porcelets (2 à 6 semaines), le

sérotype 2, lui, affecte des porcs de tous âges (Higgins and Gottschalk, 1999; Touil and Higgins, 1988). C'est aussi le sérotype le plus prévalent à travers le monde et aussi le plus fréquemment associé à la maladie.

1.2. Les infections causées par *S. suis*

S. suis est considéré comme un habitant normal des voies respiratoires supérieures des porcs: près de 100% des animaux sont porteurs d'au moins un des sérovars de *S. suis* au niveau des amygdales sans pour autant présenter de symptômes. Cependant, les streptocoques deviennent parfois opportunistes et entraînent l'apparition de signes cliniques. Il faut souligner qu'il n'y a pas de corrélation entre le taux de porteurs et l'incidence de la maladie. Même si le premier peut être de 100%, la seconde n'excède généralement pas 5% (Touil and Higgins, 1988). D'une manière générale, le stress, les changements brusques de température, une mauvaise ventilation, de mauvaises conditions d'élevage, le regroupement d'animaux de différents âges et provenances ou la présence d'autres infections, prédisposeraient à l'apparition des signes cliniques chez les porcelets (Dee *et al.*, 1993). En effet, *S. suis* peut agir comme agent pathogène primaire mais il est aussi souvent présent comme agent secondaire. Chez le porc, les agents primaires reconnus pour favoriser l'infection à *S. suis* sont: le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) (Galina *et al.*, 1994), *Bordetella bronchiseptica* (Vecht *et al.*, 1989) et le virus de la pseudorage porcine (Iglesias *et al.*, 1992). Il est également fréquent d'isoler *S. suis* simultanément avec d'autres bactéries comme *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli* et *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Higgins *et al.*, 1990).

Plusieurs observations sur la maladie causée par *S. suis* type 2 ont démontré que le germe pénétrait dans un élevage via l'introduction de porteurs sains qui hébergent une souche nouvelle ou un sérotype différent dans leurs cavités nasales, les amygdales et parfois dans les poumons ou le vagin. Les porteurs sains ne représentent pas la seule source de

contamination et celle-ci peut se réaliser par l'intermédiaire d'objets inanimés (mangeoires), du personnel ou de diverses espèces animales présentes sur la ferme comme les insectes, les oiseaux et les souris. Dans un élevage infecté, l'infection serait transmise de manière très précoce de la truie au porcelet par la voie respiratoire, par le tractus génital lors de la parturition ou par le tractus digestif lors de la période d'allaitement (Robertson and Blackmore, 1989; Berthelot-Herault, Cariolet *et al.*, 2001; Higgins and Gottschalk, 1999). Les amygdales seraient aussi une porte d'entrée puisque la transmission aérogène de *S. suis* sérotype 2 chez des porcs a été démontrée (Berthelot-Herault, Gottschalk *et al.*, 2001; Madsen *et al.*, 2002).

Les signes cliniques associés à l'infection varient en fonction de la souche bactérienne et de l'élevage. Ils peuvent être caractérisés par de la fièvre, de l'anorexie, de la boiterie ou de la dépression dans les cas les moins sévères (Clifton-Hadley *et al.*, 1984). Chez les sujets touchés plus sévèrement, les animaux sont retrouvés morts sans signe prémonitoire (Reams *et al.*, 1994) ou présentent des signes nerveux tels que l'incapacité à se tenir debout, du pédallement ou des convulsions et éventuellement de la cécité et de la surdité qui sont les conséquences d'une méningite. D'autres formes cliniques sont observées : bronchopneumonies, arthrites, endocardites, septicémies, avortements (Touil *et al.*, 1988; Higgins and Gottschalk, 2001).

S. suis est impliqué dans une multitude d'infections chez les ruminants, les chevaux, les oiseaux et d'autres animaux et il est aussi responsable d'une zoonose professionnelle rare mais grave puisqu'elle se manifeste principalement par des méningites et/ou des septicémies (Higgins *et al.*, 1997; Devriese and Haesebrouck, 1992; Halaby *et al.*, 2000) pouvant dégénérer en surdité ou en ataxie. Les personnes à risque sont principalement les individus en contact avec des porcs ou de la viande de porc, comme les bouchers, les éleveurs de porcs et les employés d'abattoirs (Higgins and Gottschalk, 1989). La contamination se ferait par contact direct

avec un animal contaminé ou avec ses produits à la faveur de lésions cutanées.

1.3 Facteurs de virulence

1.3.1 Définition de la virulence

Aussi virulent soit-il, un microorganisme n'est pas automatiquement pathogène. La virulence est la capacité, pour un microorganisme, en profitant de circonstances particulières, à produire un état pathologique donné. Elle est mesurée en terme de mortalité et de morbidité, c'est à dire par le pourcentage d'individus d'une population donnée mourant de cette infection et le pourcentage d'individus atteints de la maladie. Les germes virulents doivent posséder des structures ou des constituants spéciaux (paroi, capsule, endospores, toxines) qui les protègent efficacement, en particulier de la phagocytose (Salyers and Whitt, 1994). La virulence dépend aussi de l'hôte et de ses facultés de résistance. L'âge, l'état de fatigue, la malnutrition, les tares viscérales, l'état général déficient, les traitements chimiques (corticoïdes, immunodépresseurs) sont autant de facteurs qui prédisposent aux infections graves.

1.3.2. Facteurs de virulence potentiels chez *S. suis*

Malgré les efforts déployés ces dernières années pour comprendre *S. suis*, les connaissances sur les facteurs de virulence et la pathogénie de l'infection restent limitées. La virulence est fonction du sérotype et des souches (Vecht *et al.*, 1989) : tous les sérotypes ne sont pas impliqués dans des infections et des souches d'un même sérotype peuvent causer des infections diverses ou ne pas causer d'infection du tout (Staats *et al.*, 1997). Actuellement, il est impossible de différencier aisément les souches virulentes des souches non-virulentes. Différentes composantes bactériennes ont été

identifiées comme étant des facteurs de virulence potentiels (Gottschalk and Segura, 2000), mais elles ont été principalement étudiées pour *S. suis* sérotype 2. Entre autres, on mentionne la capsule, des adhésines et des protéines extracellulaires et enfin, des protéines de la paroi cellulaire.

1.3.2.1. La capsule

La présence d'une capsule, formée de polysaccharides, riche en acide sialique, est considérée comme un facteur de virulence chez certaines bactéries (certains sérotypes) car elle joue un rôle anti-phagocytaire en inactivant la voie alternative du complément (Salyers and Whitt, 1994). Il semblerait que la position de l'acide sialique à l'intérieur des chaînes de polysaccharides répétitives est importante pour son implication dans la virulence (Edwards *et al.*, 1982). Chez *S. suis* par contre, l'acide sialique retrouvé au niveau de la capsule ne semble pas jouer un rôle critique dans la virulence, puisque ni la virulence ni le taux de phagocytose en présence de monocytes de porcs, ne sont modifiés lors de l'élimination de l'acide sialique chez une souche de *S. suis* sérotype 2 (Charland *et al.*, 1996). Seule la survie intracellulaire est quelque peu diminuée lorsque la bactérie possède une capsule dépourvue d'acide sialique. Suite au traitement des bactéries à la sialidase, il apparaît que l'acide sialique contenu dans la capsule de *S. suis* pourrait être en partie responsable de l'attachement des bactéries aux macrophages (Segura and Gottschalk, 2002). Cette interaction est probablement cruciale pour la dissémination bactérienne, la bactériémie et/ou la septicémie et elle est éventuellement responsable de la réponse inflammatoire de l'hôte observée pendant la méningite. Les soupçons concernant l'implication de la capsule de *S. suis* sérotype 2 dans la pathogénie de l'infection ont été confirmés par les travaux de Charland et coll. (1998). Des études réalisées dans un premier temps avec des mutants spontanés et ensuite avec des souches génétiquement caractérisées, ont montré que la capsule est indispensable à la virulence des souches. En effet,

il a été démontré qu'un mutant non-capsulé obtenu d'une souche virulente (souche de référence S735 sérotype 2) par mutagenèse à l'aide du transposon auto-conjugatif Tn916, devenait avirulent chez la souris et que cette souche se trouvait hautement phagocytée. La capsule pourrait donc permettre la persistance de la bactérie dans le sang, et permettre ainsi l'expression d'autres facteurs de virulence. Segura et coll. sont les premiers à obtenir des résultats quantitatifs de phagocytose en utilisant une technique de compte viable (Segura *et al.*, 1998). La souche de référence S735 du sérotype 2 n'est pratiquement pas phagocytée par les macrophages murins et ce, même après 90 minutes d'incubation. Par contre, comparativement à la souche mère, le mutant acapsulé 2A dérivé de la souche de référence est très phagocyté (Charland *et al.*, 1998). Une autre étude confirme que la capsule protège contre la phagocytose et qu'elle est un facteur de virulence important (Smith *et al.*, 1999). Selon les conditions utilisées *in vitro*, la souche mère est résistante à la phagocytose. Par contre, après 90 minutes, plus de 99% des cellules mutantes non-capsulées sont ingérées par les macrophages alvéolaires porcins. De tous les mutants ingérés, 90 à 98% sont tués en 90 minutes. Les propriétés de virulence de la souche mère et des deux mutants isogéniques non-capsulés ont été testées par infection expérimentale de porcelets nouveaux-nés exempts de pathogènes. Tous les porcs inoculés avec la souche mère sont morts au cours de l'expérience, ou encore euthanasiés après apparition de sérieux signes cliniques. Par contre, les porcs inoculés avec les mutants acapsulés n'ont démontré aucun signe de maladie et ils ont tous survécu jusqu'à la fin de l'expérience. Pour plusieurs pathogènes tels *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus agalactiae*, et *Neisseria meningitidis*, la perte de la capsule signifie une augmentation de l'adhérence et/ou de l'invasion de cellules épithéliales et/ou endothéliales (Hulse *et al.*, 1993).

Différentes études se sont intéressées au rôle de la capsule de *S. suis* lors de l'adhérence à des cellules. La bactérie adhère aux cellules épithéliales porcines et humaines, étape importante dans la colonisation de l'hôte

(Lalonde *et al.*, 2000). L'adhésion observée est médiée par des composantes de la paroi cellulaire et est considérablement réduite en présence de capsule. Les mêmes auteurs ont rapporté une absence d'invasion par *S. suis* des cellules épithéliales d'origine humaine et de différentes espèces animales incluant le porc. En fait, les auteurs de l'étude précédente considéraient l'invasion comme un « évènement rare » (Norton *et al.*, 1999).

Puisque la présence de la capsule inhibe la phagocytose, *S. suis* en circulation vient en contact avec les cellules endothéliales des micro vaisseaux cérébraux (*Brain Microvascular Endothelial Cells*, BMEC) (Charland *et al.*, 2000). Les jonctions serrées des BMEC constituent la base anatomique de la barrière hémato-méningée (BHM). La BHM est une barrière séparant le cerveau du compartiment intravasculaire et maintenant l'homéostasie de l'environnement du système nerveux central. Lors d'une méningite, la perméabilité de la BHM est accrue due à une séparation des jonctions serrées intercellulaires et une augmentation de la pinocytose (Quagliariello and Scheld, 1992). Une étude récente a montré que *S. suis* libre adhère préférentiellement aux BMEC humains (Charland *et al.*, 2000). *S. suis* capsulé et non-capsulé adhèrent de façon similaire aux BMEC. Comme mentionné précédemment, les souches non-capsulées lient les cellules épithéliales à un taux plus élevé que les souches capsulées. Ceci pourrait indiquer que le degré de capsulation de *S. suis* pourrait être modulé dépendamment du stade de l'infection. L'encapsulation pourrait être régulée négativement pendant la colonisation des cellules épithéliales, et une fois les bactéries dans la circulation, une régulation positive de la production de capsule les protégerait contre le système immunitaire (Charland *et al.*, 2000). Ce modèle a déjà été décrit pour *Haemophilus influenzae* type b (St Geme and Cutter, 1996). Une corrélation a été démontrée entre l'épaisseur de la capsule et la capacité à adhérer à des coupes congelées de tissu pulmonaire de porc (Gottschalk *et al.*, 1991). L'épaisseur de la capsule des isolats adhérents est de 100 à 140 nm alors que celle des isolats non-adhérents est de 80 à 100 nm. Toutefois, la présence de la capsule ne semble pas être

essentielle car une souche acapsulée présente au moins le même degré d'adhérence que la souche mère.

Bien que la capsule soit un facteur de virulence nécessaire, son rôle dans la pathogénie demeure controversé puisque des souches capsulées peuvent être non-virulentes et des souches non capsulées peuvent être virulentes. Ceci suggère que la capsule serait nécessaire mais pas suffisante à la virulence de ce pathogène et permet de proposer d'autres structures ou composantes qui joueraient un rôle important dans la virulence de *S. suis* (Gottschalk and Segura, 2000).

1.3.2.2. Adhésines

Les adhésines peuvent être considérées comme facteurs de virulence puisqu'elles jouent un rôle dans l'attachement des microorganismes pathogènes aux cellules de l'hôte, ce qui est un pré-requis pour l'établissement de l'infection (Ofek and Beachey, 1980). Des protéines auxquelles on a attribué un rôle d'adhésine ont été décrites chez *S. suis*: une protéine liant les IgG, une protéine liant la fibronectine, une protéine liant l'albumine et une adhésine P responsable des propriétés hémagglutinantes de la bactérie. Comme les souches non-virulentes possèdent aussi ces protéines, on peut penser que ce type d'activité ne suffit pas pour rendre une souche virulente.

1.3.2.2.1. Protéine liant les IgG

Une protéine de 52 kDa isolée au niveau de la paroi et capable de lier les IgG, les IgA mais aussi la fibronectine humaine a été rapportée comme jouant un rôle dans la virulence de *S. suis*. Elle préviendrait l'opsonisation et la phagocytose permettant ainsi à *S. suis* d'échapper aux défenses naturelles de l'hôte (Serhir *et al.*, 1995).

1.3.2.2.2 Protéine liant l'albumine

Lors de tests de croissance bactérienne *in vivo* dans des chambres intrapéritonéales chez le rat, on retrouve une protéine de plasma de 67 kDa liée aux bactéries (Quessy *et al.*, 1997). Cette protéine a été identifiée comme étant de l'albumine. Grâce à cette protéine de liaison, ces mêmes auteurs ont mis en évidence chez *S. suis* une protéine de 39 kDa liant l'albumine chez toutes les souches virulentes et non-virulentes de *S. suis* sérotype 2 testées. Des souches mutées chez qui cette protéine est absente présentent une réduction significative d'adhérence à des anneaux de trachées bovins et porcins (Brassard *et al.*, 2001). Elle possède une homologie avec l'enzyme glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) des streptocoques du groupe A, qui est aussi impliquée dans diverses liaisons avec des protéines de l'hôte (ex : fibronectine, lysozyme, plasmine) (Pancholi and Fischetti, 1992). Cette capacité à lier la fibronectine présente à la surface des cellules eucaryotes serait très utile pour la colonisation des muqueuses par les microorganismes. Son rôle dans la virulence est incertain puisque, comme mentionné plus haut, les souches non-virulentes produisent aussi cette protéine.

1.3.2.2.3. Protéine liant la fibronectine

La fibronectine (Fn) est une glycoprotéine ubiquitaire dans les fluides extracellulaires (plasma, fluide cérébrospinal, liquide amniotique), elle est aussi présente sous forme insoluble dans les tissus et la matrice extracellulaire des cellules-hôtes. *fnbA* est le premier gène codant pour une MSCRAMM (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) chez *Staphylococcus aureus* et liant la Fn (FnBPA) à être cloné, séquencé et exprimé dans *E. coli* (Signas *et al.*, 1989). Plus récemment, des gènes codant pour d'autres MSCRAMMs comme FnBPB et CnA (*S. aureus*), Sfb (*Streptococcus pyogenes*), FnBA et FnBB (*Streptococcus dysagalactiae*) ont été caractérisés.

Lors de l'étude des gènes régulés par les conditions environnementales chez *S. suis* sérotype 2, c'est-à-dire durant une infection expérimentale de porcelets, vingt-deux gènes régulés *in vivo* (*ivs*) ont été identifiés (Smith *et al.*, 2001). L'un de ces gènes présentait une forte homologie avec des gènes codant pour une protéine liant la fibronectine et/ou le fibrinogène de *Streptococcus gordonii* et *Streptococcus pyogenes*. Dans une étude subséquente, les mêmes auteurs se sont penchés sur la contribution de cette protéine (FBPS) à la pathogénie de l'infection par *S. suis* (de Greeff *et al.*, 2002). Elle serait impliquée dans la colonisation de certains organes des porcs touchés par une infection à *S. suis* mais ne serait pas impliquée dans la colonisation de leurs amygdales. FBPS serait immunogène et exprimée *in vivo* puisqu'elle réagit avec un sérum de porc convalescent à une infection par *S. suis* type 2. La plupart des protéines décrites liant la fibronectine et le fibrinogène interviennent dans l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales et endothéliales, et il serait tentant d'assimiler le même rôle à la FBPS de *S. suis*. L'adhésion de *S. aureus* aux HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) est importante dans la pathogénie des infections staphylococciques. On a récemment montré que les fibrilles de Fn présentes à la surface des HUVEC facilitaient l'attachement des bactéries. Un mutant isogénique *fnbAfnbB* de *S. aureus*, incapable de lier la Fn, n'y adhère presque pas, mais lorsque doté d'un plasmide permettant la synthèse accrue de FnBPA et FnBPB, il y adhère cette fois-ci beaucoup plus que la souche sauvage (Peacock *et al.*, 1999). Une étude démontre que, chez *S. pyogenes* (GAS), la protéine F liant la Fn favorise son adhérence aux cellules épithéliales des muqueuses respiratoires de hamster (Hanski and Caparon, 1992). Il en est de même pour l'adhérence de *Streptococcus mutans* aux cellules endothéliales humaines *in vitro* (Chia *et al.*, 2000).

1.3.2.2.4. Hémagglutinines

Une adhésine protéique, nommée adhésine P, a été mise en évidence chez *S. suis* sérotype 2 lors d'une étude sur l'activité hémagglutinante des érythrocytes (Kurl *et al.*, 1989). Cette adhésine de 18 kDa (Tikkanen *et al.*, 1996) lie de façon spécifique un disaccharide galactosyl-(α 1-4)-galactose, lequel fait partie des glycolipides de la surface des cellules eucaryotes (Haataja *et al.*, 1994). Cette adhésine est reconnue comme hautement immunogène et représenterait un candidat potentiel pour l'élaboration d'un vaccin qui pourrait prévenir la colonisation des tissus par *S. suis*.

1.3.2.3. Protéines MRP et EF

Vecht et coll. ont identifié deux protéines présentes chez des souches européennes de *S. suis* sérotype 2 isolées à partir de porcs malades : l'une de 136 kDa à la fois associée à la paroi cellulaire et secrétée dans le surnageant de culture (MRP= *Muramidase-Released Protein*) et l'autre de 110 kDa, uniquement détectée dans le surnageant (EF= *Extracellular Factor*), permettent de distinguer 4 phénotypes de *S. suis*: les souches MRP⁺ EF⁺, MRP⁺ EF⁻, MRP⁻ EF⁺ et MRP⁻ EF⁻ (Galina *et al.*, 1996; Vecht *et al.*, 1991). D'autres phénotypes ont été identifiés car des variantes des protéines MRP et EF ont été subséquemment décrites. Il s'agit des protéines MRP* (poids moléculaire supérieur à 136 kDa), MRPs (poids moléculaire inférieur à 136 kDa) et EF* (poids moléculaire supérieur à 110 kDa). On retrouve MRP* et EF* chez des porcs cliniquement sains alors que les souches isolées de porcs malades synthétisent les protéines de 110 et 136 kDa. Ceci appuie l'hypothèse selon laquelle MRP* et EF* seraient les ancêtres des formes virulentes MRP et EF. De plus, la protéine EF* possède plusieurs séquences répétées de 76 acides aminés qui ne sont pas présentes dans la protéine EF, ce qui amène l'hypothèse que le gène codant pour EF aurait évolué par délétion à partir du gène codant pour EF* (Smith *et al.*, 1993). On comprend alors pourquoi les porteurs sains de *S. suis* sont fortement incriminés dans

l'épidémiologie de l'infection au sein d'un troupeau (Luque *et al.*, 1999). La protéine MRP possède une séquence en acides aminés similaire à une séquence présente chez la protéine M de *S. pyogenes* (Vecht *et al.*, 1989), ce qui suggère qu'elle puisse lier la fibronectine (Smith *et al.*, 1992). La protéine M est un facteur de virulence non négligeable chez les streptocoques du groupe A puisque seules les souches M⁺ résistent à la phagocytose et adhèrent aux cellules épithéliales buccales humaines. Toutefois, l'équivalent d'une protéine M n'a pas été identifié chez *S. suis* (Mogollon *et al.*, 1992). Le rôle des protéines MRP et EF comme facteurs de virulence a été suggéré car les souches virulentes de *S. suis* sérotype 2 semblaient être MRP⁺ EF⁺, alors que les souches non-virulentes semblaient être MRP⁻ EF⁻ (Vecht *et al.*, 1991). Toutefois peu de souches canadiennes de *S. suis* isolées de porcs malades possèdent ces protéines (Gottschalk *et al.*, 1998). L'absence d'implication de MRP et EF dans la virulence a été confirmée récemment à l'aide de mutants isogéniques défectifs dans la production de ces deux protéines. Ces mutants restent aussi virulents pour le porc que la souche mère MRP⁺ EF⁺, suggérant que les protéines MRP et EF ne contribuent pas directement à la pathogénie de l'infection ou que d'autres facteurs compensent leur absence (Quessy *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1997). Dans le même registre, après analyse de la présence des protéines MRP, EF et suilysine chez 122 souches de *S. suis* type 2, 1/2, 9, 7 et 3 isolées à la fois de porcs malades et sains en France dans le but d'évaluer leur implication dans la virulence chez *S. suis*, Berthelot-Hérault et coll. concluent que la présence de ces protéines ne devrait pas être la seule condition pour juger de la virulence d'un isolat en France (Berthelot-Hérault *et al.*, 2000). Par contre, des vaccins contenant MRP et EF semblent protéger les porcs infectés par *S. suis* type 2 de phénotype MRP⁺ EF⁺ (Wisselink *et al.*, 2001), mais ces vaccins ne seraient pas efficaces en Amérique du Nord où la plupart des souches virulentes ne possèdent pas ces protéines.

1.3.2.4. Hémolysine

Une protéine extracellulaire thermolabile de type hémolysine a été associée à la virulence chez *S. suis* type 2 (Jacobs *et al.*, 1994; Gottschalk *et al.*, 1995). Cette protéine, appelée suilysine, appartient à une famille de toxines connues comme antigéniquement reliées aux toxines cytolytiques liant le cholestérol. Ce type de toxine a pour caractéristiques d'être sensible à des agents oxydants, activé par des agents réducteurs et inhibé par une faible concentration de cholestérol. Les hémolysines se fixent sur les molécules de cholestérol qui stabilisent les phospholipides de la membrane cytoplasmique. Sous l'action de cette toxine, il se forme des complexes toxine-cholestérol qui modifient l'agencement des molécules des couches lipidiques. Les réarrangements moléculaires entraînent alors la formation de pores dans la membrane par lesquels s'échappe le contenu cellulaire. C'est avec la pneumolysine que la suilysine partage le plus de séquences en acides aminés identiques et est la plus phylogénétiquement rapprochée. Cependant, on peut mentionner aussi des différences importantes : la pneumolysine est une protéine intracellulaire alors que la suilysine est exportée à l'extérieur de la cellule, la pneumolysine est exprimée par virtuellement tous les isolats cliniques de *Streptococcus pneumoniae* alors que la suilysine est absente chez environ 37% des isolats de *S. suis* (Segers *et al.*, 1998). Des anticorps dirigés contre cette hémolysine ont permis d'obtenir une protection chez la souris et le porc (Jacobs *et al.*, 1996). Par contre, ce facteur n'est pas présent chez toutes les souches virulentes. En effet, il est rapporté qu'en Europe la majorité des souches appartenant au sérotype 2 possèderaient l'hémolysine (Jacobs *et al.*, 1995) tandis qu'au Canada très peu d'isolats virulents de ce sérotype en produiraient (Gottschalk *et al.*, 1998). Ceci a été confirmé par Segers et coll. qui rapportent que, si en Europe 95% des souches sont munies du gène de l'hémolysine, en Amérique du Nord, seulement 7% des souches le possèdent (Segers *et al.*, 1998). Allen et coll. (2001) ont produit et caractérisé un mutant par échange allélique du gène *sly* codant pour la suilysine chez un isolat pathogène européen de *S.*

suis sérotype 2. Contrairement à la souche sauvage, la souche mutée est non-hémolytique, non-cytotoxique pour des cellules de macrophages en culture, non-virulente dans un modèle d'infection murin, et légèrement atténuée dans un modèle porcin d'infection systémique. Les souches productrices d'hémolysine sont très cytotoxiques pour les cellules épithéliales (Lalonde *et al.*, 2000; Norton *et al.*, 1999) et cette cytotoxicité est inhibée en présence d'anticorps monoclonaux spécifiques à l'hémolysine de *S. suis*. Aussi, ces souches sont capables d'envahir les cellules, les auteurs proposent donc que les souches productrices d'hémolysine utilisent l'invasion et la lyse cellulaire pour faire une brèche dans la muqueuse épithéliale. Dans la même étude, les souches incapables de produire l'hémolysine se sont révélées non toxiques pour les cellules épithéliales, bien que leur capacité d'invasion des cellules n'ait pas été estimée. La suilysine serait cytotoxique pour les cellules épithéliales et endothéliales (Charland *et al.*, 2000) mais on ignore encore si elle contribue à la pathogénie de l'infection durant les premières étapes de colonisation et d'infection des amygdales; ceci nécessiterait l'utilisation d'un modèle d'infection intranasal (Allen *et al.*, 2001).

1.3.2.5. Autres facteurs

1.3.2.5.1. Protéines de stress

Les protéines de stress appartiennent à une famille de protéines essentielles et sont synthétisées par une variété de microorganismes. Lors d'un stress cellulaire, elles vont jouer le rôle de chaperonines et permettre un transport et une translocation des protéines efficaces en plus de les protéger contre la dénaturation. Leur expression est constitutive et leur synthèse régulée positivement en réponse à plusieurs formes de stress. Benkirane et coll. identifient une protéine de stress de 60 kDa chez plusieurs souches virulentes et non-virulentes de *S. suis* testées (Benkirane *et al.*, 1997). Après 2 heures de croissance à 42°C, ils remarquent une augmentation de

l'expression de cette protéine comparativement à une culture contrôle incubée à 37°C. Il semblerait que cette protéine soit en fait identique à la protéine liant les IgG découverte par Serhir et coll. (1995). On rapporte chez *S. suis* une expression différentielle de deux protéines de surface de 47 et 53 kDa appartenant au système AD (*Arginine Deiminase*) suite à un changement de la température de croissance de 32 ou 37 à 42°C (Winterhoff *et al.*, 2002). Ces dernières ne semblent pas appartenir à la famille des protéines de stress puisqu'elles ne réagissent pas avec un sérum anti-protéines de stress dans des réactions d'immunoblots.

1.3.2.5.2. Fimbriae

En 1990, la présence de fimbriae répartis sur toute la surface de la bactérie chez plusieurs souches de référence de *S. suis* appartenant aux sérotypes 1 à 8 et 1/2 est révélée par coloration négative en microscopie électronique (Jacques *et al.*, 1990). Leur rôle n'est pas connu et leur implication dans la virulence n'est toujours pas démontrée.

1.3.2.5.3. Sortase

La sortase (srtA) est une enzyme de 206 acides aminés dotée à la fois des activités protéase et transpeptidase et associée à la membrane de nombreuses bactéries Gram (+). Elle intervient dans l'ancrage à la paroi des protéines (facteur de coagulation, protéine liant la fibronectine, protéine A etc...) portant le motif C-terminal LPXTG (X étant un acide aminé quelconque). Chez *S. aureus*, une inactivation du gène *srtA* codant pour la sortase diminue énormément la virulence de la bactérie pour la souris en affectant l'ancrage des protéines de surface impliquées dans l'adhésion aux tissus, la résistance à la phagocytose et aussi dans l'invasion des cellules-hôtes (Mazmanian *et al.*, 2000). On a rapporté l'existence du système srtA chez *S. suis* (Osaki *et al.*, 2002). Il semblerait que ce mécanisme faisant

Intervenir la sortase est une stratégie universelle des bactéries Gram (+) pour afficher des facteurs de virulence à leur surface. Il serait intéressant de tester le rôle de la sortase dans les infections à streptocoques et autres microbes Gram (+) pour lesquels existent d'excellents modèles animaux d'infection. Cette enzyme serait une cible bien intéressante pour des agents thérapeutiques contre les bactéries Gram (+).

1.3.2.5.4. Plasmides

Bien que des plasmides aient été mis en évidence chez plusieurs isolats de *S. suis* (Cantin *et al.*, 1992), leur implication dans la virulence n'a pas été prouvée. La résistance aux antibiotiques est corrélée avec la présence de plasmides sans que l'on puisse affirmer que ceux-ci soient le support de la résistance.

1.3.3. Différences souches européennes vs nord-américaines

Les souches de *S. suis* sérotype 2 isolées au Canada présentent un profil différent des souches européennes quant à la production de certains facteurs ou marqueurs de virulence, tels que les protéines MRP et EF, ainsi que l'hémolysine. En effet, la plupart des souches isolées en Europe sont reconnues comme possédant ces trois facteurs, tandis qu'au Canada une minorité d'entre elles présente ce profil de virulence (Gottschalk *et al.*, 1998; Quessy *et al.*, 1995). Les souches européennes MRP⁺, EF⁺ et hémolysine⁺ semblent être relativement éloignées génotypiquement de la plupart des souches canadiennes (Chatellier *et al.*, 1999). A ce jour, il n'existe aucune explication pour ces différences de profil, et aucun marqueur de virulence n'a encore été proposé pour les souches de type 2 en provenance du Canada.

1.4. Pathogénie de l'infection

Une infection à *S. suis* sérotype 2 se traduit généralement par une méningite. A ce jour, il existe peu d'informations quant à la pathogénie de l'infection causée par ce pathogène mais elle serait possiblement le résultat d'un procédé complexe comprenant plusieurs étapes (Gottschalk *et al.*, 2001) Il est généralement accepté que la bactérie se transmette par voie aérienne et loge au niveau des voies respiratoires. Le germe peut rester localisé et provoquer une infection inapparente ou être disséminé dans l'organisme et provoquer une bactériémie suivie parfois d'une septicémie et finalement d'une méningite. *S. suis* interagit avec les cellules épithéliales des poumons et/ou des vaisseaux lymphatiques ou sanguins des amygdales afin de passer des voies respiratoires vers la circulation sanguine. Une phase importante précédant la méningite est la bactériémie. Les mécanismes utilisés par la bactérie pour survivre dans la circulation sanguine et traverser la BHM sont peu compris. Pendant longtemps, l'hypothèse selon laquelle *S. suis* voyagerait dans la circulation sanguine à l'intérieur des monocytes a été considérée comme la plus probable (Williams, 1990). Toutefois, le faible pourcentage de phagocytose (moins de 10%) (Brazeau *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1999) suggère plutôt qu'elle circule librement pour entrer dans le système nerveux central (SNC) (Gottschalk and Segura, 2000). Il a été proposé que l'organisme en circulation envahisse le SNC à l'intérieur des monocytes. Ils migreraient via les plexus choroïdiens par un mécanisme de « cheval de Troie » (Williams and Blakemore, 1990). Cette possibilité est mise en doute car pour les quelques bactéries phagocytées, la survie à l'intérieur des monocytes est très faible (Segura *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999). Segura et Gottschalk ont rapporté dernièrement que *S. suis* adhère à une lignée de macrophages murins J774 sans pour autant être phagocyté et reste extracellulaire (Segura and Gottschalk, 2002). *S. suis* provoquerait aussi un effet cytotoxique sur ces cellules via sa suilysine. Bien qu'aucune preuve n'existe à ce jour, différentes études suggèrent que les bactéries pathogènes qui se retrouvent au niveau des voies respiratoires inférieures ou supérieures,

traversent les cellules épithéliales des poumons et/ou des vaisseaux lymphatiques ou sanguins des amygdales en les envahissant. Des expériences récentes ont montré que *S. suis* est incapable d'envahir les cellules épithéliales ou les cellules endothéliales du cerveau, comme d'autres agents pathogènes (*E. coli*, *S. pneumoniae*) (Charland *et al.*, 2000). En revanche, la bactérie est capable d'y adhérer. Une conséquence de l'adhésion de *S. suis* aux BMEC est la régulation positive de la production de cytokines pro-inflammatoires par ces cellules (Vadeboncoeur *et al.*, 2003). *S. suis* est capable de stimuler la production d'IL-6, IL-8 et MCP-1 par BMEC. De plus, les souches hémolytiques provoquent un effet hautement toxique envers ces cellules, ce qui pourrait avoir pour conséquence l'augmentation de la perméabilité de la BHM (Charland *et al.*, 2000). Les souches non-hémolytiques pourraient augmenter la perméabilité de la BHM par la stimulation de la production des cytokines pro-inflammatoires, ce qui contribuerait au développement de la méningite (Segura and Gottschalk, 1999; Gottschalk and Segura, 2000). En résumé, on peut supposer que les souches productrices de suilysine tirent profit de l'adhérence et de la destruction des cellules pour leur dissémination dans l'hôte tandis que les souches incapables de produire la suilysine pourraient adhérer et se disséminer de façon dépendante des macrophages pour causer la maladie chez l'hôte.

1.5. Traitement et contrôle de l'infection

Le contrôle de l'infection à *S. suis* est généralement difficile. En complément des moyens mis en oeuvre pour diminuer les facteurs de stress, le contrôle des infections est fondé sur l'antibiothérapie, l'antibioprophylaxie et la vaccination. La pénicilline est le traitement de choix (Durand *et al.*, 2001) puisque 80 à 90% des souches de *S. suis* seraient sensibles aux β -lactamines (Dee *et al.*, 1993; Marie *et al.*, 2002). Certaines souches ne sont que modérément sensibles à la pénicilline; ce type de résistance ne semble

pas être lié à l'existence de β -lactamases, mais à une diminution de l'affinité des protéines liant la pénicilline, ce qui indiquerait que le pourcentage de souches résistantes pourrait augmenter dans les prochaines années (Cain *et al.*, 1995).

Avec un traitement adapté, la mortalité est faible (moins de 5%), mais en l'absence de traitement, elle peut atteindre 20%. Le traitement doit être administré rapidement suite à l'apparition des premiers signes cliniques car l'infection est souvent fatale et rapide. Malheureusement les premiers symptômes sont parfois difficiles à détecter. Afin d'aider au contrôle des infections associées à *S. suis*, plusieurs essais de vaccination ont été tentés, particulièrement avec le sérotype 2 et ce, sous différents types de vaccins. Récemment, deux vaccins composés d'un mutant isogénique acapsulé vivant et mort (formaline) de *S. suis* sérotype 2 ont été comparés pour leur efficacité de protection chez le porc avec un vaccin composé de la souche parentale capsulée (Wisselink *et al.*, 2002). Des titres d'anticorps contre la capsule purifiée de *S. suis* sérotype 2 ont été seulement mesurés chez les porcs vaccinés avec la souche mère, suggérant que la CPS et d'autres composantes de la souche mère sont probablement essentiels pour une protection complète lors d'une infection. De plus, un vaccin sous-unitaire contenant à la fois les protéines MRP et EF et formulé avec l'adjuvant WO (*water-in-oil emulsion*), protège les porcs lors d'un challenge avec des souches virulentes de *S. suis* type 2 (Wisselink *et al.*, 2001). Lors d'un programme de vaccination, le vaccin doit être représentatif des souches retrouvées au sein du troupeau (Dee *et al.*, 1993). Il est donc important d'établir les sérotypes présents au sein du troupeau pour déterminer s'il est préférable d'avoir recours à un vaccin autogène ou à un vaccin commercial.

L'infection à *S. suis* type 2 est un bon exemple d'une infection apparue avec l'intensification de la production porcine. Bien que leurs effets ne soient pas toujours déterminants, les conditions environnementales (état nutritionnel, salubrité de l'habitat, surpopulation, hygiène générale de la population, conditions climatiques ambiantes) constituent des facteurs

importants de l'expression de la virulence (Higgins and Gottschalk, 1999). Même si cela est reconnu et accepté depuis longtemps, du moins par certains, la découverte de relations entre le système nerveux et le système immunitaire renforce l'importance accordée à cette dernière catégorie de facteurs. Le contrôle des facteurs de stress et des infections concomitantes ne peut donc que favoriser le contrôle de l'infection à *S. suis*.

2. Le fer

2.1. Importance du fer pour les microorganismes pathogènes

Le fer est un des éléments les plus abondants de la croûte terrestre. Par l'abondance, il vient au quatrième rang des éléments après l'oxygène, le silicium et l'aluminium. Ses propriétés chimiques sont remarquables. En effet, il présente 2 états d'oxydation stables, ferreux (Fe^{2+}) et ferrique (Fe^{3+}), interchangeables, ce qui lui confère une forte réactivité et lui permet de participer à une panoplie de réactions chimiques essentielles à la cellule (Archibald, 1986). Le fer joue un rôle important dans la chimie des organismes vivants puisqu'il se retrouve au centre actif de nombreuses molécules biologiques. Ces molécules participent à de nombreux processus : respiration (système des cytochromes), activation de l'oxygène (cytochrome oxydase), dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du superoxyde (O_2^-), synthèse d'ADN (ribonucléotide réductase), dégradation de composés aromatiques (toluate 1,2-dioxygénase) etc...Quelques exceptions à la règle : *Borrelia burgdorferi* et les bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*). Une souche en particulier, *Lactobacillus plantarum*, a été bien étudiée et semble se passer de la présence de fer. Nous en reparlons en détail un peu plus loin.

2.2. Problèmes liés au fer

Bien qu'indispensable aux cellules, le fer présente des propriétés qui peuvent se révéler problématiques :

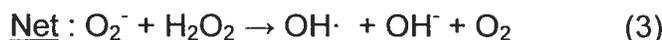
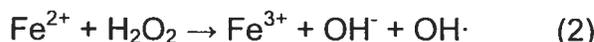
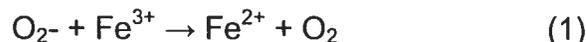
2.2.1. Solubilité/ disponibilité

Il est connu que même si le fer est abondant chez les organismes supérieurs (35-45 mg/kg), la quantité de fer libre disponible pour les bactéries est extrêmement faible car dans les conditions physiologiques, le fer a tendance à précipiter sous forme d'hydroxyde ferrique et d'oxyhydroxyde. C'est pourquoi, dans l'organisme il se trouve complexé à des protéines variées : hémoglobine Hb (65% du fer total chez l'homme), ferritine f (principale protéine de réserve ferrique), transferrine Tf (forme de transport du fer dans le sérum et la lymphe), lactoferrine Lf (fer des cellules phagocytaires et des sécrétions muqueuses tels que les larmes et le lait), cytochromes, catalases, peroxydases et bien d'autres. Ainsi, dans les conditions physiologiques, la concentration de Fe^{2+} et Fe^{3+} libre est respectivement évaluée à environ 10^{-1} et 10^{-18} M, concentration incompatible avec la croissance microbienne (Archibald, 1986; Griffiths *et al.*, 1991; Bullen, 1981). Ce métal, pourtant si répandu dans la nature, est en biologie un produit indispensable et rare.

2.2.2. Toxicité

Un autre problème, et non le moindre, associé au fer, est sa tendance à réagir avec l'oxygène et ses sous-produits (O_2^- , H_2O_2) pour générer des radicaux libres fortement réactifs et néfastes pour la cellule car ils s'attaquent aux membranes (protéines, lipides) et à l'ADN avec pour conséquences l'apoptose, la nécrose cellulaire et de possibles mutations. Les sous-produits O_2^- et H_2O_2 , générés par la plupart des systèmes biologiques, sont légèrement réactifs en solution; mais en présence de fer, des radicaux

hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) sont formés via la réaction de Fenton (équation 2). O_2^- participe à la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} (équation 1).



Fe catalytique

L'utilisation de ce nutriment doit donc être régulée et coordonnée avec soin car le fer catalyse la production de radicaux libres, ce qui signifie que sa présence non contrôlée dans la cellule peut être fatale. D'autre part, trop peu de fer aurait la fâcheuse conséquence d'affecter la croissance, voire même d'amener la mort cellulaire. Le fer fait ainsi l'objet d'un double paradoxe pour les organismes aérobiques dépendants du fer : il est à la fois essentiel et dangereux, abondant mais peu disponible.

2.3. Le rôle du fer dans l'infection et la virulence bactérienne

Lors d'infections expérimentales d'animaux ayant reçu des injections de fer, on note une plus grande susceptibilité à l'infection bactérienne que chez les contrôles non traités (Bullen, Leigh *et al.*, 1968; Bullen, Wilson *et al.*, 1968). Cette augmentation de la virulence a été rapportée pour plusieurs microorganismes (*E. coli*, *P. multocida*, *S. aureus*). De la même manière, lorsque le taux de fer dans l'organisme est anormalement élevé, comme c'est le cas dans certaines conditions pathologiques (alcoolisme, β -thalassémie majeure, leucémie), ou lors des menstruations, la susceptibilité aux infections est plus grande et les infections plus sévères (Weinberg, 2000). Il est reconnu que lors d'une infection, les bactéries pathogènes subissent des changements phénotypiques considérables aussi bien dans leur métabolisme que dans la composition de leurs membranes externes pour s'adapter aux conditions pauvres en fer imposées par l'hôte (Bullen, 1981). Comprendre la

nature de ces changements pourrait être très bénéfique au développement de mesures préventives et thérapeutiques contre les infections bactériennes.

2.3.1. Adaptations bactériennes

La plupart de nos connaissances sur l'adaptation des bactéries pathogènes aux conditions limitantes en fer retrouvées dans les tissus de l'hôte découlent d'études effectuées sur des microorganismes Gram (-), en particulier *E. coli*. Il faut toutefois se méfier de l'extrapolation des résultats obtenus *in vitro* (conditions pauvres en fer) à la situation *in vivo* (tissus de l'hôte pauvres en fer) : lors d'une infection, les bactéries doivent être capables de se procurer le fer complexé aux protéines de l'hôte (*Iron-binding protein*, IBP), ce processus n'a lieu qu'*in vivo* (sérum, sécrétions muqueuses), et pas dans un bouillon ou un milieu minimal préparé au laboratoire. De fait, on a remarqué que des bactéries se multipliant parfaitement bien *in vitro* en présence d'IBP sont parfois incapables d'en faire autant dans le sérum ou le colostrum bovin. Ceci est dû au fait qu'en plus de contenir des glycoprotéines séquestrant le fer (Tf, Lf, Hb), les milieux biologiques contiennent aussi des anticorps et des composantes du complément.

2.3.1.1. Systèmes d'acquisition du fer

Les contraintes imposées par les propriétés réactives et la solubilité du fer sont satisfaites chez les microorganismes par la synthèse de systèmes spécialisés de transport du fer leur permettant de solubiliser, transporter et d'assimiler le minéral dans la cellule. Il existe ainsi une multitude de mécanismes d'assimilation du fer, souvent pour une même cellule; le fait de posséder plusieurs de ces mécanismes confère aux cellules la possibilité de vivre dans un environnement changeant.

Plusieurs bactéries obtiennent le fer via un mécanisme faisant intervenir les sidérophores qui sont de petites molécules (500-1000 Da)

secrétées par les bactéries et capables de chélater fortement le fer (Fe^{3+}) sous sa forme insoluble (incluant Fe lié à Tf et Lf). On les classe en trois catégories : hydroxamates, catécholates et α -hydroxycarboxylates. Le complexe fer-sidérophore est alors incorporé par les bactéries via les récepteurs spécifiques correspondants situés dans la membrane externe des bactéries à Gram-négatif. La synthèse de ces récepteurs est essentielle puisque la taille des sidérophores excède souvent la limite de diffusion des pores situés dans la membrane externe des bactéries à Gram-négatif (Nikaido, 1979). Une fois absorbé, le complexe est dissocié : la plupart du temps, le fer est relâché via sa réduction en Fe^{2+} qui se lie beaucoup moins fortement aux sidérophores. Cependant, il peut aussi être relâché suite à une dégradation enzymatique du chélateur. Jusqu'à ce jour, des centaines de sidérophores ont été caractérisés (entérochéline, aérobactine), surtout chez les organismes appartenant aux genres *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, et *Shigella*. Les bactéries peuvent produire plus d'un type de chélateurs, et sont quelquefois capables d'utiliser les sidérophores secrétés par d'autres espèces pour satisfaire leurs besoins en fer.

D'autres mécanismes d'acquisition du fer indépendants des sidérophores existent. Ils ont été surtout étudiés pour *Neisseria*. spp. et *Haemophilus*. spp. (Niven *et al.*, 1989). Par exemple, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae* utilisent des récepteurs sur leur membrane externe (*Tf-binding protein*, Tf-bp; *Lf-binding protein*; Lf-bp) qui lient directement et de façon spécifique les IBP de l'hôte (Tf, Lf) (Williams and Griffiths, 1992). On rapporte aussi la sécrétion de molécules, comme des protéases, qui endommagent la Tf et libèrent le fer. Certaines bactéries pathogènes, comme *Vibrio cholerae*, *Neisseria*. spp., *H. influenzae*, *E. coli* se procurent le fer en absorbant l'hème ou l'hémoglobine Hb. L'utilisation du fer héminique s'accompagne généralement de la production d'hémolysines et de cytolysines qui libèrent l'Hb des cellules.

2.3.1.2. Système de défense anti-oxydatif

Pour réduire le problème de la toxicité, les cellules doivent avoir un moyen de détoxifier l'excès de fer qui pourrait s'accumuler et un moyen efficace et sécuritaire de le stocker (bactéioferritine) dans le but de l'utiliser dans les périodes de « pénurie » en fer. Les bactéries utilisent un système de défense antioxydatif (ex : glutathione) et des enzymes (ex : superoxyde dismutase (SOD), catalase, peroxydase) qui dégradent les espèces réactives au fur et à mesure de leur production pour éviter qu'elles n'entrent en contact avec le fer, ainsi que des systèmes de réparation (ex : endonucléase). Il est toutefois ironique de penser que les catalases, plusieurs peroxydases et les SOD ont essentiellement pour cofacteurs le fer et l'hème. En général, les bactéries lactiques, incluant *S. suis* ne possèdent ni cytochrome, ni catalase, ni NADH peroxydase (Niven and Ekins, 2001; Zitzelsberger *et al.*, 1984); ce qui ne les empêche pas d'être aérotolérantes. Yamamoto et coll. (2000, 2002) décrivent le gène *dpr* (Dps-like peroxide resistance gene) qui est induit lorsque les cellules de *S. mutans* sont exposées à l'air et qui code pour une IBP de 20 kDa (Dpr). En séquestrant le fer, Dpr l'empêche de prendre part à la réaction de Fenton, ce qui pourrait expliquer la tolérance de ces microorganismes à l'effet toxique du fer et de H₂O₂. Des homologues de Dpr ont été rapportés chez *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* (Yamamoto *et al.*, 2000) et *S. suis* (Haataja *et al.*, 2002; Niven and Ekins, 2001). Une autre propriété non-négligeable de la famille des protéines Dps serait leur capacité à lier l'ADN pour le protéger, cependant Dpr ne lie pas l'ADN et pourrait fonctionner comme une ferritine authentique chez *S. mutans* (Yamamoto *et al.*, 2002). On peut se questionner quant à l'importance du gène *dpr* pour la survie et la virulence des bactéries *in vivo*. Pour se débarrasser d'O₂⁻, tous les streptocoques incluant *S. suis* produisent une SOD ayant pour cofacteur le Mn (Niven *et al.*, 1999; Zitzelsberger *et al.*, 1984), excepté *S. mutans* qui utilise aussi le fer (Martin *et al.*, 1986). Langford et coll. (1991) ont démontré qu'il n'y avait pas de différences significatives entre la production de SOD par des isolats virulents et non-virulents de *S. suis* type 2. L'enzyme ne semble

donc pas intervenir dans la pathogénie de l'infection en augmentant la survie intracellulaire des bactéries pathogènes dans les macrophages comme on aurait pu l'imaginer.

2.3.2. Le fer et la régulation de la virulence bactérienne

L'hôte retire un double bénéfice du contrôle des concentrations en fer disponibles dans l'organisme. En effet, en même temps qu'il se protège des effets toxiques liés au métal libre dans les tissus, il se protège aussi des infections bactériennes (réponse non spécifique de l'hôte à l'infection). Un manque de fer prévient en effet la colonisation des tissus par les microorganismes pathogènes et accroît la sensibilité de ces derniers à l'oxygène réactionnel car comme mentionné plus haut, le fer est le cofacteur d'enzymes essentielles intervenant dans le système de défense au stress oxydatif. Les facteurs bactériens qui facilitent l'acquisition du fer chez l'hôte sont sans aucun doute des facteurs de virulence étant donné l'effort prodigieux investis par l'hôte pour priver les microbes de ce précieux nutriment. L'acquisition du fer est cruciale pour les microbes pendant l'infection (invasion, survie intracellulaire et multiplication), en particulier pour les parasites intracellulaires qui résident dans les macrophages, car à la fois l'hôte et les pathogènes compétitionnent pour le même « pool » intracellulaire de cations divalents. Les macrophages utilisent les ions métalliques pour la synthèse des radicaux toxiques et comme cofacteurs des systèmes de détoxification pour une autoprotection. De même, le fer est un nutriment essentiel pour la croissance microbienne intracellulaire et avec le manganèse, est un important cofacteur pour les défenses enzymatiques antioxydatives des pathogènes.

Certaines bactéries sont incapables de proliférer *in vivo*, probablement parce qu'elles ne sont pas dotées de mécanismes leur permettant de satisfaire leurs besoins en fer. *Vibrio vulnificus*, responsable d'infections localisées chez l'homme, ne semble pas posséder de systèmes efficaces

d'acquisition du fer, il est incapable de pousser dans le sérum provenant d'humain sain, mais se multiplie rapidement dans le sérum des patients souffrant d'hyperferremie (présence de fer libre) (Chart and Griffiths, 1985). *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis* utilisent le fer de la Tf tandis que les espèces commensales appartenant à *Neisseria*. spp. en sont incapables, et par conséquent ne prolifèrent pas en présence de cette protéine.

Une panoplie d'autres facteurs potentiellement impliqués dans la virulence est régulée par le fer. En effet, en plus d'être un nutriment indispensable à la croissance bactérienne, le fer permet l'expression d'un certain nombre de gènes qui sont silencieux lorsqu'il est suffisamment disponible. Cette régulation a lieu au niveau de l'ADN, et fait intervenir le gène *fur* (*ferric uptake regulation repressor protein*). Fur est une métalloprotéine qui, en présence de Fe^{2+} et Mn^{2+} , se lie aux opérateurs d'une vingtaine de gènes et réprime la transcription des gènes codant pour les protéines impliquées dans l'acquisition du fer (sidérophores, Tf-bp, Lf-bp) pour prévenir l'excès de fer libre intracellulaire. D'autre part, les gènes pour la biosynthèse de bactérioferritine Bf, et pour la réponse au stress oxydatif sont activés. En absence de fer, la protéine Fur ne se lie pas à l'ADN et les gènes qui étaient jusque là silencieux s'expriment. En plus des protéines impliquées dans le métabolisme du fer, d'autres protéines comme des toxines sont régulées par Fur. On pense tout de suite à l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa*, l'hémolysine de *Serratia marcescens* et à la toxine diphtérique de *Corynebacterium diphtheriae* dont la synthèse est augmentée lorsqu'elles poussent dans des conditions limitantes en fer (Pappenheimer, 1977; Bjorn et al., 1978). La production d'autres substances extracellulaires, comme l'alkaline protéase et l'élastase (enzymes hydrolytiques qui clivent la laminine), est réduite lorsque *P. aeruginosa* pousse dans un milieu enrichi en fer (Bjorn et al., 1978). Ces facteurs sont tous reliés à la pathogénicité des bactéries. Chez *C. diphtheria* et les bactéries à Gram (+) ayant un %GC élevé, ce sont les protéines de la famille DtxR (*diphtheria toxin repressor*), soit DtxR et IdeR, qui remplissent le mandat de Fur. Cependant ces deux

protéines régulatrices partagent très peu de similarités de séquences. Fur maintient ainsi l'homéostasie du fer, prévenant la formation de radicaux OH[•] toxiques via la réaction de Fenton.

2.3.3. Le fer entre la bactérie et l'hôte : effets bactéricides et bactériostatiques

Même si les bactéries pathogènes s'adaptent et se multiplient dans les tissus de l'hôte pauvres en fer, elles vont généralement y croître plus lentement que si elles étaient en présence d'une concentration optimale de fer. Par exemple, lorsqu'on fait pousser *E. coli in vitro* en présence de Lf ou de Tf, son temps de génération passe de 25 à 35 minutes; celui de *P. aeruginosa* passe de 30 à 72 minutes (Bullen *et al.*, 1974). Des études réalisées *in vitro* ont démontré que l'apo-Tf et l'apo-Lf avaient un effet bactéricide et/ou bactériostatique sur plusieurs bactéries et champignons. Une réduction même minime du taux de croissance peut faire une grande différence dans la taille de la population microbienne au bout de quelques heures et se révéler cruciale pour déterminer l'issue de l'infection. En effet, le ralentissement de la multiplication bactérienne donne le temps à l'hôte de mettre en place des actions défensives pour contrôler l'attaque. On rapporte un effet bactéricide de l'apo-Lf humaine sur une variété de microorganismes incluant *E. coli*, *P. aeruginosa*, et *S. mutans* (Arnold *et al.*, 1982). Un contact direct de la protéine avec la surface de la cellule bactérienne est nécessaire pour provoquer la mort cellulaire. Nul doute alors que la non-susceptibilité aux Tf et Lf constitue un avantage considérable pour les bactéries pathogènes, en leur permettant de coloniser les muqueuses, d'envahir les tissus de l'hôte ainsi que la circulation sanguine ou encore de survivre dans le liquide amniotique.

2.3.4. Le fer et la sensibilité aux agents antimicrobiens

On rapporte que chez *P. aeruginosa* et *S. aureus*, les conditions limitantes en fer affectent la production des protéines liant la pénicilline et par

conséquent la sensibilité des bactéries aux β -lactamines (Reynolds and Brown, 1985; Brown and Williams, 1985). Ceci suggère que les conditions limitantes en fer retrouvées *in vivo* pourraient affecter la susceptibilité des microorganismes pathogènes aux agents antimicrobiens. Il est donc important de tester la performance de ces composés sur des bactéries cultivées en absence de fer. D'ailleurs, une nouvelle approche intéressante pour la production d'agents antimicrobiens consiste à complexer des antibiotiques ou des métaux toxiques aux sidérophores qui vont les transporter dans la cellule bactérienne par le mécanisme usuel d'acquisition du fer. Diarra et coll. (1996) ont testé les propriétés antimicrobiennes de plusieurs conjugués sidérophore-antibiotique chez des pathogènes porcins et bovins, entre autres *P. multocida*, *S. suis* et *S. aureus* pour lesquels les systèmes de transport de fer sont peu connus. Aucune activité antibactérienne significative n'a été rapportée pour *S. suis*, ce qui semble logique puisqu'elle n'utilisait aucun des onze sidérophores testés (source de fer) pour sa croissance dans des conditions restreintes en fer (Diarra *et al.*, 1996).

2.4. Relations des bactéries Gram (+) avec le fer

On en sait très peu quant à l'implication exacte du fer dans l'étiologie des maladies causées par des Gram (+). A part les travaux effectués avec *C. diphtheriae*, on en sait très peu sur la façon des bactéries pathogènes Gram (+) comme les staphylocoques et les streptocoques, d'acquérir le fer *in vivo* ou encore les changements subis dans ces circonstances.

2.4.1. Les staphylocoques

Par exemple, l'acquisition de fer lié à la Tf par les staphylocoques impliquerait à la fois des mécanismes faisant intervenir des sidérophores (staphyloferrine A, B) et d'autres indépendants des sidérophores (Modun *et*

al., 1994; Courcol *et al.*, 1997). Lorsque cultivées dans des conditions pauvres en fer, *S. aureus* et *Staphylococcus epidermidis* présentent un profil protéique différent pour les composantes de la surface cellulaire. Elles expriment des protéines nouvelles, entre autres, un récepteur de 42 kDa spécifique pour la Tf humaine qui possède aussi une activité GAPDH (Modun *et al.*, 1994; Modun and Williams, 1999). Ce récepteur est capable de lier la plasmine humaine, de la même manière que la GAPDH associée à la paroi des streptocoques du groupe A. Cette propriété permettrait l'invasion des tissus par les agresseurs puisque la plasmine clive les protéines de la matrice extracellulaire des cellules hôtes et dissout les caillots sanguins (Lottenberg *et al.*, 1994). Une étude menée par Courcol et coll. (1997) décrit la production par *S. aureus* d'un nouveau sidérophore, l'aureochéline, et de cinq protéines de surface principalement induites en absence de fer. Parmi ces protéines, deux en particulier semblent immunogènes; elles réagissent fortement avec le sérum de patients convalescents à une infection staphylococcique tandis que le sérum provenant de patients sains ne les reconnaît pas.

S. aureus exprime deux types de sortase qui s'occupent de l'ancrage de différentes classes de protéines de surface. SrtA prend en charge les protéines au motif C-terminal LPXTG tandis que SrtB se spécialise dans l'ancrage des protéines régulées par le fer portant le signal NPQTN. Elles sont toutes deux sans aucun doute des facteurs de virulence; mais leur rôle dans l'infection est différent : SrtA s'occupe de l'ancrage des protéines impliquées dans l'adhérence aux tissus et dans l'évasion de la réponse immunitaire alors que SrtB semble vouée au processus essentiel d'acquisition du fer pendant l'infection microbienne (Mazmanian *et al.*, 2002). SrtB fait partie d'un locus appelé *isd* (« iron-responsive surface determinants ») qui contient aussi un transporteur de ferrichrome et des protéines de surfaces porteuses des motifs LPXTG et NPQTN. *S. aureus* est généralement considéré plus virulent que les staphylocoques coagulase négatif (CoNS). On explique cette différence de pathogénicité par la capacité de *S. aureus* à pousser relativement bien dans des conditions limitantes en

fer et de produire de grandes quantités de sidérophores tandis que dans les mêmes conditions, les CoNS synthétisent très peu, sinon pas de sidérophores et ne se multiplient pas (Lindsay and Riley, 1994). Cependant, même si dans cette étude, les CoNS ne semblent pas posséder de systèmes efficaces d'acquisition du fer, ils sont quand même aptes à survivre *in vivo* et à causer des infections. Ils doivent donc être dotés d'autres mécanismes sophistiqués encore inexplorés. Enfin, la plupart des staphylocoques virulents comme *S. aureus* possèdent une activité hémolytique qui pourrait jouer aussi un rôle dans le métabolisme du fer car en lysant les érythrocytes, les hémolysines libèrent l'hème des cellules qui devient ainsi disponible pour la croissance microbienne (Francis *et al.*, 1985; Martinez *et al.*, 1990).

2.4.2. Les streptocoques

Nos connaissances sur le rôle du fer dans la physiologie et la virulence des streptocoques sont limitées. Tandis que *S. pyogenes* et *S. pneumoniae* semblent avoir absolument besoin de fer, d'autres streptocoques peuvent se contenter de petites quantités, et semblent même s'en passer (von Hunolstein *et al.*, 1992). On rapporte que les bactéries lactiques ne sont nullement affectées par des conditions appauvries en fer, ne semblent pas incorporer de fer radioactif (^{59}Fe) dans ces conditions et ne produisent pas de sidérophores (Pandey *et al.*, 1994). Aucun des membres de la famille des streptocoques ne semblent produire de sidérophores (Eichenbaum, Green *et al.*, 1996; Eichenbaum, Muller *et al.*, 1996). Lorsque cultivée en présence d'acide éthylènediamine-di-*o*-hydroxyphénylacétique (EDDA), un agent chélateur du fer ou dans un milieu traité au chelex-100 dans le but de réduire le contenu en fer du milieu, Tai et coll. obtiennent une croissance très faible voire nulle de la souche virulente de *S. pneumoniae* sérotype 2 (Pn-2) comparativement à celle observée dans le milieu non traité. La croissance est rétablie après addition d'hémine, d'hémoglobine ou de sulfate ferrique. *S. pneumoniae* est un pathogène redoutable pour l'humain fréquemment isolé

de bactériémies. La capacité à utiliser l'hémine pour combler ses besoins en fer pourrait jouer un rôle non négligeable dans la pathogénie de l'infection. Un mutant ST330 obtenu par mutagenèse à partir de la souche Pn-2 et incapable d'utiliser l'hémine (Tai *et al.*, 1993) s'est révélé moins virulent que la souche sauvage pour des souris infectées expérimentalement. Il est très probable qu'une combinaison de l'activité de la pneumolysine avec l'utilisation de l'hémine soit favorable à l'infection pneumococcique.

Les streptocoques du groupe A (GAS, *S. pyogenes*) sont des pathogènes très virulents chez l'humain causant notamment l'impétigo et le syndrome du choc toxique. Parmi les facteurs de virulence connus, la protéine M à la surface des GAS figure en tête de liste. Elle jouerait un rôle essentiel dans l'établissement et la progression des infections streptococciques en prévenant la phagocytose des bactéries par les polymorphonucléaires PMNs, permettant ainsi leur survie dans le sang. McIver et coll. ont étudié la régulation de la transcription du gène *emm* codant pour la protéine M chez les GAS par les conditions environnementales de croissance (osmolarité, température, dioxyde de carbone (CO₂), disponibilité de Fe). La chélation du fer dans le milieu de culture par l'acide nitrilotriacétique (NTA) entraîne une baisse drastique de la transcription du gène *emm* par les GAS par rapport à l'expression dans le milieu contrôle (McIver *et al.*, 1995). Même si les résultats décrits ici défient le principe général selon lequel des conditions limitantes en fer régulent l'expression de certains facteurs de virulence chez les bactéries, il faut se rappeler qu'ils ont été obtenus en laboratoire et que l'extrapolation aux conditions *in vivo* est difficile. En présence de NTA, la croissance des GAS est fortement inhibée et des protéines nouvelles sont produites dans le surnageant de culture. Parmi celles-ci figure la protéine ADP-ribosylante, encore connu sous le nom de glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Lorsque qu'une quantité suffisante de fer est disponible, GAPDH reste associé à la paroi cellulaire des GAS; tandis qu'en absence de fer, la protéine est relâchée dans le surnageant de culture. Ceci pourrait jouer un rôle fondamental dans la

virulence des GAS car lorsque GAPDH est relâché, il peut diffuser librement et cibler plus de tissus. En s'associant à la plasmine, GAPDH permet la destruction des tissus (activité protéolytique de la plasmine) et l'invasion des couches plus profondes par les GAS. Il est aussi probable que GAPDH modifie la structure et la fonction des protéines humaines pendant l'infection par ADP-ribosylation comme le font plusieurs des toxines produites par les bactéries pathogènes (ex : exotoxine A, toxine cholérique) (Eichenbaum, Green *et al.*, 1996). L'hémine, la catalase, l'hémoglobine, la ferritine et la myoglobine sont toutes capables de supporter la croissance de *S. pyogenes* dans un milieu pauvre en fer. Par contre, aucune croissance n'est observée lorsque la source de fer est la Tf ou la Lf (Eichenbaum, Muller *et al.*, 1996). Les sources de fer utilisées par les GAS semblent donc être celles retrouvées à l'intérieur des cellules de l'hôte. Ces bactéries produisent plusieurs substances extracellulaires, notamment la streptolysine S, O, la streptokinase, des protéases qui causent la lyse cellulaire et endommagent les tissus. Ceci entraîne la libération du fer intracellulaire (hème, hémoglobine, ferritine) qui devient ainsi disponible pour la croissance microbienne. Enfin, il est rapporté que le fer (concentration optimale 1.2 µg/mL) peut stimuler la croissance des GAS et la production de streptolysine S *in vitro* (Griffiths and McClain, 1988).

2.4.3. *S. suis*

Deux études se sont penchées particulièrement sur les relations de *S. suis* avec le fer. Niven et coll. (1999) constatent que le Mn améliore la croissance de la souche de référence de *S. suis* sérotype 2 tandis que le fer ne semble pas être un nutriment limitant pour la bactérie. Cependant, cette étude n'est basée que sur une souche de *S. suis*, elle ne permet donc pas de tirer de conclusion quant aux besoins en fer de l'espèce en général. D'autre part, une étude très récente décrit chez *S. suis* des gènes régulés par l'environnement en utilisant des conditions pauvres en fer (*in vitro*) et

l'infection expérimentale de porcelets (Smith *et al.*, 2001). Dix-huit gènes sont induits chez *S. suis in vitro* (« *iri* ») tandis que vingt-deux gènes sont induits *in vivo* (« *ivs* »). Deux gènes « *ivs* » étaient similaires à des gènes codant pour des facteurs de virulence potentiels. L'un d'eux, *ivs-31* présentait une homologie avec le gène codant pour une protéine liant la fibronectine de *S. gordonii* et des GAS. Chez les streptocoques, l'adhésion aux protéines des cellules de l'hôte comme la fibronectine ou le collagène est très importante dans la pathogénie de l'infection car elle favorise l'adhérence et l'invasion cellulaire. Etudier ces gènes en détail (par exemple, produire un mutant par délétion *ivs* et observer l'effet sur la croissance et la survie de *S. suis* dans des conditions restreintes en fer) pourrait contribuer à améliorer nos connaissances de la pathogénie de l'infection à *S. suis* et même à développer de nouvelles stratégies de lutte contre la bactérie.

3. Le manganèse

3.1. Importance du manganèse pour les microorganismes

3.1.1. Généralités

Le manganèse est un élément essentiel pour presque tous les systèmes biologiques, passant du simple rôle de catalyseurs à celui d'un élément impliqué dans l'oxydation de l'eau pendant la photosynthèse aérobie (réaction de Hill du photosystème II) chez les plantes. Il serait le cofacteur d'une multitude d'enzymes vitales pour le métabolisme cellulaire (synthèse d'ADN, métabolisme du sucre, glycosylation protéique, transduction) (Jakubovics and Jenkinson, 2001), puisqu'un certain nombre de protéines ont développé une préférence naturelle pour le Mn. Pour ne citer qu'un exemple, *Brevibacterium ammoniagenes* et des espèces apparentées montrent une croissance déséquilibrée (à la baisse) en absence de Mn^{2+} comparativement

au milieu contrôlé, amenant la mort qui est apparemment due à un défaut de biosynthèse d'ADN (Auling *et al.*, 1980). Le Mn assure un rôle bien plus important chez le genre *Bacillus* que chez la plupart des autres microorganismes. Chez *Bacillus subtilis* par exemple, Mn^{2+} influence la composition, la structure et la germination des spores et s'avère indispensable pour une sporulation efficace (Eisenstadt *et al.*, 1973; Charney *et al.*, 1951). Il interviendrait aussi dans la production de métabolites secondaires comme les antibiotiques peptidiques (Weinberg, 1977). Les microorganismes aérobies s'en servent comme cofacteurs pour les enzymes du système de défense antioxydatif (mangani-catalase, MnSOD) qui les protègent des dommages liés à l'oxygène réactionnel (*ROS : reactive oxygen species*). Nous avons déjà décrit dans la deuxième partie de cette revue l'implication du fer dans ce stress oxydatif via la réaction de Fenton. Pour éliminer les problèmes considérables associés à l'acquisition et à la toxicité du fer, une alternative pour une bactérie pathogène serait donc de pouvoir s'en priver ou encore de le substituer par un métal équivalent.

Plusieurs études montrent que les membres du groupe *Lactobacillus sp.*, mais aussi *Mycoplasma pneumoniae*, *Treponema pallidum* et *B. burgdorferi* n'ont pas besoin de fer. Aussi, plusieurs espèces de streptocoques se sont avérées capables de pousser en absence de fer. Tous ces microorganismes semblent cependant avoir un besoin absolu de Mn^{2+} pour croître. La capacité à se passer du fer et l'habileté à utiliser Mn^{2+} pour la croissance peut conférer aux bactéries pathogènes un avantage sélectif dans les environnements naturels où la compétition pour le fer est « féroce » à la seule condition qu'elles possèdent des mécanismes pour s'approprier avec succès le Mn^{2+} disponible. Dans les conditions aérobies et au pH physiologique, contrairement au fer, Mn^{2+} est relativement soluble et bio-disponible pour les microorganismes mais sa concentration serait tout de même trop faible (traces) pour satisfaire leurs besoins nutritionnels dans les tissus de l'hôte. Pour croître et survivre, les microorganismes ont évolué en adoptant des stratégies métaboliques et de survie qui s'accommodent bien

du Mn^{2+} et des systèmes spécialisés dévoués à l'acquisition de ce métal rare. Le taux intracellulaire de Mn^{2+} doit aussi être minutieusement contrôlé puisque le métal est potentiellement toxique. C'est pourquoi, dans bien des cas, l'acquisition de Mn^{2+} est régulée par la biodisponibilité du métal.

3.1.2. Le manganèse : un antioxydant

Les bactéries lactiques contiennent très peu ou pas du tout de fer et on rapporte que la plupart, dont *L. plantarum* l'excluraient activement pour minimiser les effets toxiques de la réaction de Fenton (Archibald, 1983), mais cela n'est pas le cas pour *S. suis* (Niven and Ekins, 2001). L'absence unique de fer chez les bactéries comme *Borrelia burgdorferi* et *L. plantarum* est originale puisque les tissus végétaux en fermentation normalement habités par ces derniers sont amplement riches en fer. *L. plantarum*, par exemple, accumule des concentrations de Mn^{2+} allant jusqu'à 30-35 mM. Puisqu'une forte concentration intracellulaire de Mn^{2+} peut neutraliser l'action toxique de O_2^- , cette forte accumulation du métal contourne le besoin vital de défenses enzymatiques qui font défaut aux bactéries lactiques pourtant aérotolérantes. En effet, aucune des souches testées appartenant aux *Lactobacillaceae* ne possèdent la SOD, quoique deux genres dans les *Streptococcaceae*, soit les streptocoques et les aérocoques, possèdent une SOD ayant le Mn pour cofacteur. Il est possible que l'absence de fer intracellulaire permette de pousser en présence d'oxygène (O_2) et d'accumuler des concentrations élevées de H_2O_2 sans perte de viabilité.

On décrit le Mn^{2+} comme un antioxydant qui s'associe aux anions comme le phosphate et aux intermédiaires métaboliques tels le malate et le lactate (Horsburgh *et al.*, 2002). Initialement, on pensait que cette activité était serait inexistante chez la majorité des bactéries aérobies possédant un système enzymatique efficace. Pourtant, des mutants de *B. subtilis* et *E. coli* dépourvus de SOD éprouvent des problèmes de croissance en présence d'oxygène causés par les effets nocifs des radicaux O_2^- formés durant la

respiration. Dernièrement, il a été rapporté que ces problèmes pouvaient être minimisés après supplémentation de Mn^{2+} (Inaoka *et al.*, 1999; Al-Maghrebi *et al.*, 2002). L'utilisation du citrate pour solubiliser et acquérir le fer extracellulaire a été proposée comme un mécanisme antérieur à la sécrétion de sidérophores. De la même façon, on peut penser que la neutralisation de O_2^- par des complexes phosphate- Mn^{2+} chez *L. plantarum* soit l'ancêtre de la MnSOD retrouvé chez les organismes plus « évolués. Mais la présence de vraies SOD chez un nombre considérable d'archaebactéries appartenant à des taxons très anciens contredit cette hypothèse. On peut penser qu'en procurant un niveau basal de protection à la cellule contre les ROS, ce mécanisme pourrait augmenter sa « fitness » en minimisant la dépense d'énergie pour la synthèse d'un régulon de défense. Cependant, cette « fitness » ne peut se maintenir qu'à condition de répondre rapidement à un changement environnemental. Comme les conditions externes à une bactérie fluctuent beaucoup, il n'est pas impossible de rencontrer des taux de Mn^{2+} trop faibles pour supporter ce système de défense basé sur le Mn^{2+} . De plus, la bactérie fait face à des concentrations croissantes de ROS au fur et à mesure que la croissance cellulaire ralentit, ou encore lorsqu'elle est attaquée par les cellules du système immunitaire de l'hôte (ROS exogènes). De telles conditions rendent un tel mécanisme de défense basé sur Mn^{2+} inadéquat.

Malgré un besoin nul en fer et leur habileté à ignorer les systèmes de séquestration de l'hôte, les lactobacilles envahissent rarement, voire jamais leurs hôtes vertébrés. Peut être que les ionophores employés par les lactobacilles pour lier et transporter Mn^{2+} sont incapables de capter ce métal des hôtes potentiels (Weinberg, 1997).

3.1.3. Autres rôles du manganèse

Le Mn^{2+} « non enzymatique » est aussi crucial pour la production de pigments, la thermo tolérance, la transformation, la synthèse et le fonctionnement adéquat de plusieurs produits bactériens, entre autres les

antibiotiques produits par les bacilles (Archibald, 1986). Plusieurs semblent en effet produire des antibiotiques peptidiques capables de lier et transporter Mn^{2+} (« manganiphores » analogues aux sidérophores) en réponse à une privation en Mn^{2+} . Il contribue aussi à la stabilisation des parois cellulaires (Doyle, 1989). Le rôle que pourraient jouer les ions divalents dans le maintien de la turgescence et de la morphologie cellulaire n'est pas clair. Les parois cellulaires des bactéries à Gram-positif sont chargées négativement et composées en grande partie de peptidoglycane et d'acide teichoïque. L'acide teichoïque est capable de séquestrer des ions métalliques, et le peptidoglycane aussi contribue significativement à l'habileté des parois cellulaires à complexer des cations pour les offrir entre autres aux enzymes membranaires qui requièrent des métaux traces pour leur activité. On peut citer les autolysines (*B. subtilis*), les synthétases d'acide teichoïque et de phospholipides, la lectine liant les glucanes (*S. cricetus*) qui dépend du Mn^{2+} pour son activité (Drake *et al.*, 1988). Le magnésium (Mg^{2+}) est le plus commun et le plus important cation métallique divalent chez la grande majorité des procaryotes et sa concentration cellulaire peut atteindre 15-30 mM. Les valeurs élevées sont typiques des bacilles Gram (+) possédant une paroi très épaisse, où Mg^{2+} est impliqué dans la structure et la stabilisation de la paroi. De façon surprenante, chez *L. plantarum*, le taux de Mg^{2+} est faible malgré la paroi riche en peptidoglycane/acide teichoïque. Chez cette espèce, on peut penser que Mn^{2+} remplace Mg^{2+} pour plusieurs rôles intracellulaires (cofacteur enzymatique, stabilisation des parois et membranes). Par conséquent, il n'est plus approprié de considérer le Mn comme un bioélément d'utilité limitée ou obscure.

3.2. Le transport du manganèse

Comparé au fer ou autre macronutriments, on en sait très peu sur l'acquisition du Mn^{2+} . La littérature existante sur les transporteurs bactériens de Mn^{2+} est éparse et hétérogène. Malgré ses besoins faibles en Mn^{2+} , un

système d'acquisition de haute affinité pour Mn^{2+} a été décrit chez *E. coli* voilà trente ans mais ce n'est que ces trois dernières années que les gènes et les régulateurs transcriptionnels répondant à Mn^{2+} ont été identifiés. Des transporteurs de Mn^{2+} ont aussi été identifiés chez plusieurs bactéries à Gram-positif, seulement contrairement à *E. coli*, le transport du Mn^{2+} chez *S. aureus*, *B. subtilis* et *L. plantarum* est inhibé (compétition) par le cadmium (Cd^{2+}). Le mécanisme de transport de Mn^{2+} était très peu compris jusqu'à la découverte par Bartsevich et Pakrasi (1995) de l'opéron *mntABC* codant pour un transporteur de type ABC (*ATP-binding cassette*) chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, une cyanobactérie unicellulaire fortement dépendante du Mn^{2+} pour la photosynthèse. Il s'en est suivi une recherche intensive sur le sujet et la caractérisation de plusieurs transporteurs bactériens de Mn^{2+} .

3.2.1. Les trois types de transporteurs de manganèse

Très souvent, il y a plus d'un système de transport pour un ion : un système synthétisé de façon constitutive pour les périodes d'abondance, et un autre système hautement spécifique et induit lors de pénurie. Ce dernier, opérant dans des conditions de stress, est généralement couplé à l'ATP (Silver and Walderhaug, 1992). Il y a deux familles de transporteurs : le type-P et le type-ABC (*ATP-binding cassette*). Au moins, trois types de systèmes de transport de Mn^{2+} sont aujourd'hui décrits. Le premier est le transporteur peu commun de type-P de *L. plantarum* (*MntA*), le seul jusqu'à ce jour ayant démontré une forte spécificité pour Mn^{2+} (Hao *et al.*, 1999). Le deuxième type se conforme à la superfamille des ABC-transporteurs (Claverys, 2001). Le troisième type appartient à la famille des transporteurs *Nramp/MntH* (*natural resistance-associated macrophage protein*) (Cellier *et al.*, 2001).

3.2.1.1. ATPase de type-P chez *L. plantarum*

La vitesse maximale calculée pour l'acquisition du Mn^{2+} par *L. plantarum* est largement plus élevée que la valeur déterminée pour d'autres

bactéries. On ignorait si cette valeur était associée à un nombre plus abondant de transporteurs (Mn^{2+}) transmembranaires ou tout simplement à un système de transport plus rapide. Deux systèmes d'acquisition de Cd^{2+} ont été décrits chez *L. plantarum*. Le premier de haute affinité et haute vélocité est induit dans des conditions limitantes en Mn^{2+} ; Cd^{2+} et Mn^{2+} sont des inhibiteurs compétitifs l'un pour l'autre dans ce système, quoique l'affinité pour Cd^{2+} est plus forte que celle pour Mn^{2+} . Cd^{2+} est en fait le substrat préféré, mais il faut noter qu'il n'est pas un substrat naturel pour *L. plantarum* puisqu'il est bactéricide à des concentrations de l'ordre du μM , particulièrement pour des cellules privées de Mn^{2+} . Le second système d'acquisition pour Cd^{2+} est de faible affinité et exprimé de façon constitutive dans des cellules comblées en Mn^{2+} , mais sa fonction n'est pas claire. Le gène *mntA* de *L. plantarum* ATCC 14917 pour l'acquisition de Cd^{2+} et Mn^{2+} a été cloné et caractérisé chez *E. coli* (Hao *et al.*, 1999). Des analyses de séquences indiquent que MntA est une protéine membranaire (81 kDa) qui appartient à la famille des ATPases de type-P, enzymes membranaires transloquant des cations. À la fois la transcription et la translation de *mntA* sont induites chez *L. plantarum* dans des conditions pauvres en Mn^{2+} , comme l'indiquent les résultats de reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) et de *western blot* avec des anticorps contre MntA (Hao *et al.*, 1999). La seule source d'énergie pour ce système est l'ATP (Archibald, 1986).

3.2.1.2. Transporteurs de type-ABC

La caractérisation de cette famille dorénavant très large de perméases révèle qu'elles transportent le Mn et dans plusieurs cas aussi le fer et/ou le zinc (Zn^{2+}). Les ABC perméases transportent aussi des sucres, des peptides, des acides aminés. Ce sont des transporteurs bactériens dépendant d'un récepteur extracytoplasmique. Chez les Gram (-), il s'agit de protéines périplasmiques, tandis que chez les Gram (+), ce sont des lipoprotéines ancrées dans la membrane. Ce type a été d'abord identifié non pas pour sa

capacité de transport mais plutôt pour son rôle d'adhésine chez les streptocoques (Novak *et al.*, 1998; Kolenbrander *et al.*, 1998). La propriété à transporter le Mn^{2+} a été démontrée chez un mutant de *Synechocystis* incapable de photosynthèse qui avait une demande en Mn^{2+} très élevée (Bartsevich and Pakrasi, 1995). Ainsi, chez *Synechocystis* 6803, on a identifié et caractérisé le complexe de transport de Mn^{2+} , MntABC, qui joue un rôle central dans l'acquisition du métal. Cette ABC-perméase se compose de trois sous-unités : MntC, composante périplasmique qui capture le métal, MntB, une protéine transmembranaire et MntA, la protéine cytoplasmique liant l'ATP. La protéine MntC partage 32% d'identité en acides aminés avec ScaA chez *S. gordonii* préalablement identifiée comme une lipoprotéine associée à un ABC-transporteur de fonction inconnue. Des protéines semblables à ScaA ont été trouvées chez plusieurs streptocoques et entérocoques. Elles constituent une famille de protéines originellement désignées Lral (*Lipoprotein receptor-associated antigen I*) et maintenant reconnues comme un nouveau groupe de protéines solubles (*solute-binding proteins* : SBP) affectées au transport d'ions métalliques. La production de ScaA et d'autres SBPs est beaucoup plus importante chez les cellules cultivées dans des conditions pauvres en Mn^{2+} comme celles retrouvées dans le sérum où la majorité du Mn^{2+} disponible est complexé à l'albumine et à la transferrine (Harris and Chen, 1994; Davidsson *et al.*, 1989) et où le taux tourne autour de 20 nM (Krachler *et al.*, 1999). Les mêmes effets sont observés en présence de salive et de sérum (Jakubovics *et al.*, 2000). Ceci suggère que des composantes contenues dans la salive et le sérum séquestrent le Mn^{2+} et par le fait même réduisent la concentration de Mn^{2+} disponible pour les bactéries. ScaA est une lipoprotéine vraisemblablement attachée à la membrane cytoplasmique, mais détectée aussi dans les fluides extracellulaires. On suggère que les protéines Lral, en liant le Mn^{2+} ou des complexes- Mn^{2+} , pourraient représenter un moyen de concentrer le Mn^{2+} environnemental rare dans une communauté bactérienne. Puisque le Mn^{2+} n'est pas fortement accroché à l'albumine, il peut être séquestré directement

par ScaA ou transporter via des protéines et glycoprotéines à la surface d'autres cellules bactériennes ou d'autres protéines-hôtes. Si la protéine de liaison peut lier Mn^{2+} complexé à l'albumine ou autres protéines, alors ce processus peut se révéler ayant une fonction adhésive, qui pourrait rendre compte de l'évidence logique que les polypeptides de la famille Lral sont des adhésines. Comme les streptocoques lient plusieurs protéines sériques et produisent de nombreuses protéases, il se pourrait que le Mn^{2+} soit aussi relâché des complexes protéiques suite à une activité bactérienne protéolytique. Certaines SBPs ont déjà été impliquées dans la coaggrégation bactérienne, dans l'adhésion des streptocoques oraux aux glycoprotéines salivaires et à la fibrine, dans l'attachement des streptocoques du groupe B à la laminine et aussi dans l'adhésion des pneumocoques aux cellules épithéliales (Jakubovics *et al.*, 2000). Par contre, quelques études remettent en doute ces dernières données. Même si ScaA semble médier la coaggrégation de *S. gordonii* avec *Actinomyces naeslundii* (Andersen *et al.*, 1993), l'inactivation des gènes *scaA*, *scaC* ou *scaR* n'a aucun effet sur la coaggrégation *in vitro* (Jakubovics *et al.*, 2000). Aussi, alors que FimA a été impliqué dans l'adhésion de *S. parasanguinis* à la fibrine (Burnette-Curley *et al.*, 1995), aucune différence significative dans la liaison des cellules parentales et des mutants isogéniques *scaA*, *scaC* ou *scaR* de *S. gordonii* à des couches de fibrine n'a été observée (Jakubovics *et al.*, 2000). Bien que le fonctionnement des polypeptides Lral *in vivo* reste spéculatif, il semblerait qu'ils soient essentiels pour la croissance des bactéries dans des environnements où la concentration de Mn^{2+} est faible (Kolenbrander *et al.*, 1998).

3.2.1.3. NRAMP

Chez les mammifères, les protéines NRAMP1 forment une classe de transporteurs de cations métalliques divalents fortement exprimés dans les macrophages/neutrophiles et importants pour contrôler la réplication des

pathogènes bactériens et protozoaires durant les infections chroniques (Gruenheid and Gros, 2000; Cellier *et al.*, 1994). *Nramp1* code pour une phosphoglycoprotéine membranaire (100 kDa) exprimée dans le compartiment lysosomal des macrophages et recrutée vers la membrane des phagosomes contenant les microbes peu après l'achèvement de la phagocytose où elle enlève les métaux comme le Mn^{2+} de l'espace phagososomal.

Des séquences génomiques (Langford *et al.*, 1991) ont révélé que de nombreuses bactéries (*S. aureus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*) possèdent aussi des protéines appartenant à la famille NRAMP. Chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium*, les homologues NRAMP sont des transporteurs hautement sélectifs pour Mn^{2+} , stimulés par des protons et étroitement régulés par des systèmes de contrôle transcriptionnels. Ces gènes ont, par conséquent, été désignés *mntH* pour *proton (H^+)-coupled manganese transport*. Les protéines NRAMP bactériennes versus animales partagent 35% d'identité en acides aminés (Cellier *et al.*, 1996). L'évolution de la famille NRAMP/MntH serait liée à l'adaptation aux environnements oxydatifs, incluant ceux découlant de l'infection animale et végétale. Un rôle plausible des protéines homologues à NRAMP chez les bactéries serait d'aider les cellules à se protéger des ROS, fonction particulièrement utile lors de l'infection de l'hôte en transportant du Mn et quelquefois du Fe. Kehres et coll. (2000) suggèrent qu'une des réponses bactériennes suivant l'entrée dans les macrophages est l'induction de *mntH* et une accumulation rapide de Mn^{2+} . La quantité élevée de Mn^{2+} dans la bactérie servira de cofacteur enzymatique et/ou non-enzymatique pour la détoxification des ROS et RNS (*reactive nitrogen species*) rencontrés. Dans ce scénario, il y a compétition entre MntH et NRAMP1 (hôte), centrée autour du Mn^{2+} plutôt que du Fe^{2+} . MntH représenterait un nouveau mode d'acquisition du fer chez les *Enterobacteriaceae* (Makui *et al.*, 2000). Un triple mutant d'*E. coli* (*aroB*, *tonB*, *feoB*) déficient à la fois pour la synthèse d'entérochéline et pour l'acquisition du fer via les systèmes ATP-dépendants et les sidérophores est encore

capable de pousser, dénotant la présence d'un transporteur de fer additionnel, qui pourrait être MntH (Hantke, 1997). Toutefois, la préférence de MntH pour Mn^{2+} suggère que le transport de Mn^{2+} est la fonction physiologique première des homologues NRAMP bactériens.

3.2.2. La régulation du mécanisme d'acquisition du manganèse

Jusqu'à tout récemment, les réponses transcriptionnelles des bactéries aux métaux autres que le fer étaient très peu comprises ; mais la situation a changé ces cinq dernières années avec l'identification de nouveaux métallorégulateurs pour l'homéostasie du cobalt (Co^{2+}), du cuivre (Cu^{2+}), du Zn^{2+} et du Mn^{2+} . Plusieurs protéines régulatrices apparentées à DtxR (homologue de Fur chez les bactéries Gram (+)) et répondant uniquement à Mn^{2+} ont été décrites : ScaR chez *S. gordonii* (Jakubovics *et al.*, 2000), SirR chez *S. epidermidis*, TroR chez *T. pallidum* (Posey *et al.*, 1999), MntR chez *S. aureus*, *B. subtilis* et *E. coli* (Que and Helmann, 2000). Contrairement à DtxR, ces derniers ne modulent pas la transcription en réponse à Fe^{2+}/Fe^{3+} mais en réponse au Mn^{2+} . Les rôles des protéines appartenant à ce nouveau groupe de métallorégulateurs (famille MntR) ont depuis peu commencé à être explorés. Des études suggèrent que TroR est un senseur de Mn^{2+} (Posey *et al.*, 1999), mais il n'a pas encore été possible d'en tester le rôle *in vivo*. Chez *S. epidermidis*, SirR régule l'expression d'un ABC-transporteur en réponse à la fois au Fe^{2+} et au Mn^{2+} et pourrait représenter un intermédiaire entre les régulateurs DtxR (senseur de Fe^{2+}) et MntR/TroR (senseur de Mn^{2+}).

Généralement, quand le taux intracellulaire de Mn^{2+} augmente, le métallorépresseur (ScaR/MntR/TroR) lie avec une forte affinité la région promoteur de l'opéron qui code pour la perméase de sorte à en inhiber la transcription ; par contre, dans des conditions limitantes en Mn^{2+} , l'apoprotéine se dissocie de la région du promoteur de sorte que la répression est rapidement levée avec une régulation positive de la

transcription et une augmentation du taux de perméases. Chez *B. subtilis* (et possiblement *S. aureus*), on note une particularité : MntR est un régulateur bifonctionnel (Que and Helmann, 2000). Les transporteurs MntH et MntABCD sont tous les deux sélectivement réprimés par Mn^{2+} et cette régulation requiert MntR. Dans des conditions optimales en Mn^{2+} , MntR réprime la transcription de *mntH*. Alors que dans des conditions limitantes en Mn^{2+} , MntR active la transcription de l'opéron *mntABCD*. On ne comprend pas encore pourquoi *B. subtilis* posséderait au moins deux systèmes distincts d'acquisition de Mn^{2+} , mais on peut spéculer que MntH et MntABCD correspondent à des systèmes d'acquisition de haute et faible affinité ; ou encore qu'ils sont exprimés préférentiellement à différentes phases de croissance. L'expression et l'activité des transporteurs doivent donc impérativement être coordonnées pour que la cellule puisse répondre aux fluctuations externes de Mn^{2+} .

Les cations métalliques, tels Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} , sont activement expulsés des cellules bactériennes et la régulation des systèmes d'exportation contribue de façon significative au contrôle homéostatique de ces ions dans la cellule. On peut penser qu'un tel système d'exportation pour Mn^{2+} existe aussi, mais aucune étude ne l'a encore démontré.

3.2.2.1. Importance de l'acquisition du manganèse

3.2.2.1.1 La croissance et l'expression protéique

Jakubovics et coll. (2000) ont montré que Mn^{2+} pouvait supporter la croissance de *S. gordonii*, *S. mutans* et *S. suis* (Niven et al., 1999) en absence de Fe^{2+}/Fe^{3+} . De la même manière, Spatafora et Moore (1998) suggèrent que Mn^{2+} peut supporter la croissance de *S. mutans* dans un milieu traité au chelex et appauvri en fer (FMC cx') (Spatafora and Moore, 1998). Puisque *S. mutans* peut pousser en présence de fer ou de manganèse, il semble que ces deux métaux puissent en satisfaire les besoins

nutritionnels. De plus, les profils des protéines de surface de *S. mutans* cultivé dans un milieu traité au chelex et supplémenté de manganèse sont très différents de ceux provenant du même milieu supplémenté de fer. Ceci indique que le Mn^{2+} a un effet unique sur l'expression protéique chez *S. mutans*. De la même façon, l'addition de Mn^{2+} au milieu de culture est requise pour une croissance optimale de *S. cricetus* (Drake *et al.*, 1988) et *S. pneumoniae* (Dintilhac *et al.*, 1997). L'opéron *psaABC* code pour les composantes du système de transport de Mn^{2+} chez *S. pneumoniae* ; des mutations *psaB*, *psaC* ou *psaA* entraînent un déficit de croissance dans des conditions pauvres en Mn^{2+} et une exigence absolue de Mn^{2+} pour la croissance (Dintilhac *et al.*, 1997). De façon similaire, une inactivation de *scaC* ou *scaA* entraîne des problèmes de croissance cellulaire et plus de 70% d'inhibition de l'acquisition de $^{54}Mn^{2+}$ chez *S. gordonii* dans un milieu contenant moins de $0.5 \mu M Mn^{2+}$.

Chez *Synechococcus* sp. PCC 6301 et PCC 7942, une protéine d'environ 34 kDa, appelée IdiA (*Iron-deficiency-induced protein A*) s'accumule dans des conditions limitantes en Fe et en Mn (Michel *et al.*, 1996). Une comparaison de sa séquence en acides aminés avec des séquences protéiques des banques de données révèle que IdiA partage des similarités avec des protéines bactériennes basiques liant le fer : SfuA de *S. marcescens* et Fbp de *N. gonorrhoeae*. Une inactivation du gène *idiA* chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 donne un mutant incapable de pousser dans des conditions réduites en Fe ou Mn ou autres conditions endommageant le photosystème II.

3.2.2.1.2 La protection contre les ROS

La cellule doit coordonner sa demande en fer et l'accumulation de Mn avec le taux de ROS cellulaire. Pour des mutants *scaA* ou *scaC* de *S. gordonii* chez qui un ABC-transporteur (Mn^{2+}) fonctionnel fait défaut, l'activité MnSOD est réduite de 50% (Jakubovics and Jenkinson, 2001). Un mutant

psaA de *S. pneumoniae* est sensible à la fois au H_2O_2 et O_2^- . Une interruption de l'opéron *mntABC* de *N. gonorrhoeae* réduit la concentration intracellulaire de Mn^{2+} et sensibilise la cellule aux radicaux O_2^- endogènes et exogènes comparativement à la souche parentale. Un mutant *mntH* de *B. subtilis* est plus susceptible au H_2O_2 , c'est aussi le cas pour *E. coli* et *S. typhimurium* (Kehres *et al.*, 2000; Que and Helmann, 2000). De la même manière, une perturbation des mécanismes de régulation sensibiliserait les cellules à l'action toxique du Mn^{2+} . Par exemple, une surexpression de *mntH* chez *E. coli* ou *S. typhimurium* diminue les taux de croissance des bactéries dans des milieux contenant plus de $10 \mu M Mn^{2+}$ (Kehres *et al.*, 2000). Aussi, chez *B. subtilis*, une inactivation du gène *mntR*, en levant l'inhibition sur l'expression de *mntH*, sensibilise les cellules au Mn^{2+} (Que and Helmann, 2000). Ceci souligne le fait que les transporteurs (Mn^{2+}) puissent jouer un rôle majeur dans la protection des cellules bactériennes contre le stress oxydatif en plus d'être impliquées dans l'acquisition du métal.

Chez *S. aureus*, le métallorépresseur PerR (*Peroxide resistance regulon*) (Bsat *et al.*, 1998), en répondant à Mn^{2+} et Fe^{2+} , contrôle la transcription des gènes codant pour des protéines intervenant dans la résistance au stress oxydatif (catalase KatA) mais aussi pour des protéines de stockage du fer (ferritine, MrgA) (Horsburgh, Clements *et al.*, 2001). Les protéines MrgA fonctionnent comme des protéines Dps, elles séquestrent le fer et protègent l'ADN des dommages oxydatifs. Il est très intéressant de mentionner la présence d'une boîte PerR en amont de *dpr* chez *S. suis*. PerR serait sensible au H_2O_2 . Il régule sa propre expression vraisemblablement pour maintenir un taux adéquat de protéines de sorte à « flairer » les taux de H_2O_2 . Il régule négativement la protéine Fur, ceci permet de contrôler le transport du fer selon les ROS. Le contrôle indirect de l'homéostasie du fer via la régulation de Fur par PerR et le contrôle direct des protéines de stockage du fer permettent à *S. aureus* de coordonner la disponibilité intracellulaire de fer libre avec le taux de protéines antioxydantes présentes dans la cellule. On rapporte que chez *S. aureus*, Fur et PerR régulent de

façon coordonnée la transcription de la catalase, Fur se comportant comme un activateur transcriptionnel en réponse au Fe^{2+} ; tandis que PerR agit comme un répresseur transcriptionnel dépendant du Mn^{2+} (Horsburgh, Ingham *et al.*, 2001). Le régulon PerR est induit en présence de quantités élevées de Fe. En effet, pour réduire la réaction de Fenton, il y a augmentation du taux de catalase via d'une part la régulation négative de *katA* médiée par PerR en réponse au H_2O_2 et d'autre part via l'induction de *katA* par Fur en réponse au Fe^{2+} . Il y a aussi dépression des protéines de stockage du fer régulées par PerR pour stocker l'excès de fer de façon sécuritaire. L'expression de PerR est réprimée par l'accumulation de quantités astronomiques de Mn^{2+} . Ceci serait attribuable aux propriétés antioxydantes du Mn *in vivo*. L'habileté des complexes-Mn²⁺ à éliminer à la fois H_2O_2 et O_2^- par un mécanisme encore peu compris, réduisent ainsi l'expression du régulon PerR.

3.3. Le rôle du manganèse dans l'infection et la virulence bactérienne

Lors de la colonisation de l'hôte, les bactéries doivent rivaliser pour l'acquisition d'ions métalliques essentiels aux processus métaboliques. On en sait très peu quant à l'implication du Mn^{2+} dans les infections streptococciques. Parmi les facteurs de virulence figurent souvent les transporteurs de métaux.

Une inactivation des gènes codant pour les transporteurs de Mn^{2+} a fourni un aperçu de son rôle chez les bactéries. Des mutations dans les gènes *sca* chez *S. gordonii* et *psa* chez *S. pneumoniae* (les opérons *scaABC* et *psaABC* codent pour les composantes du système de transport de Mn^{2+}) affectent l'acquisition de Mn^{2+} , l'adhésion aux cellules épithéliales (Berry and Paton, 1996) et réduisent la compétence des cellules (Kolenbrander *et al.*, 1998; Dintilhac *et al.*, 1997). La technologie DFI (*Differential Fluorescence Induction*) a permis d'identifier des promoteurs de *S. pneumoniae* induits durant une infection respiratoire de souris (Marra *et al.*, 2002). Cette

technologie s'appuie sur le gène rapporteur de la GFP (*Green Fluorescent Protein*) qui rapporte l'expression d'un promoteur donné sous une condition expérimentale définie. Parmi les clones identifiés, on note le promoteur *psa*. Dans une autre étude, les taux d'ARNm du gène *psaA* produits par *S. pneumoniae* type 2 *in vivo* (infection intrapéritonéale de souris) versus *in vitro* ont été comparés par RT-PCR quantitatif en analysant l'ARN bactérien total isolé du sang des souris 12 h après l'infection. Il en ressort que l'expression de *psaA* est cinq fois plus importante 12 heures après l'infection (Ogunniyi *et al.*, 2002). Une autre étude examine aussi l'expression de l'opéron *psa in vivo* et la virulence des mutants par délétion *psaB*, *psaC*, *psaA* et *psaBCA* de *S. pneumoniae* dans quatre différents modèles d'infection animaux, chacun représentant un environnement et un défi différents pour la bactérie (Marra *et al.*, 2002). Le promoteur *psa* est induit environ dix fois plus *in vivo* dans un modèle de chambre intrapéritonéale. Les mutants *psaB*, *psaC* et *psaA* sont complètement atténués dans des infections systémiques, du tractus respiratoire et otites, ce qui confirme que le système *psa* est essentiel pour la survie de cet organisme *in vivo*. De plus, ces mutants sont aussi incapables de pousser dans l'environnement relativement sécuritaire des implants de chambres intrapéritonéales ; mais la croissance est restaurée par l'addition de Mn^{2+} dans les chambres avant implantation. Ceci suggère que les mutations dans *psa* sont létales en absence de Mn accessible, puisque ces mutants semblent perdre la viabilité en 24 h même s'ils sont à l'abri des cellules hôtes. Enfin, des mutants de *S. pneumoniae* et *S. parasanguis* chez qui les gènes codant pour les polypeptides Lral ont été inactivés, sont avirulents dans des modèles animaux d'endocardite (Burnette-Curley *et al.*, 1995) et de septicémie (Berry and Paton, 1996). L'une des explications les plus plausibles à l'atténuation de la virulence des bactéries incapables d'acquérir le Mn^{2+} est leur incapacité à faire face au stress oxydatif (Jakubovics and Jenkinson, 2001). Des mutants *psaA* et *psaD* de *S. pneumoniae* sont extrêmement sensibles au H_2O_2 et O_2^- , ce qui expliquerait pourquoi ils sont moins virulents que la souche mère (Tseng *et al.*, 2002)

puisqu'ils seraient moins aptes à survivre aux attaques des systèmes de défense innés de l'hôte. À l'appui de cette hypothèse, Tseng et coll. (2002) rapportent une modification de l'expression des enzymes clés de la réponse au stress oxydatif, c'est-à-dire de la SOD et la NADH oxydase (Nox) chez les mutants *psaA* et *psaD*. On mesure une activité Nox six fois plus élevée chez le mutant *psaA* que chez la souche mère lorsqu'ils sont cultivés en absence de Mn. Pour le mutant *psaD*, l'activité Nox est quatre fois plus élevée. Les auteurs spéculent donc que PsaA et PsaD seraient des composantes participant à la transduction du signal en réponse au stress oxydatif.

L'expression des GBL (*Glucan Binding Lectin*) chez les streptocoques du groupe mutans dépend de la présence de Mn^{2+} dans le milieu de culture (Bauer *et al.*, 1993; Drake *et al.*, 1988). Les GBL pourraient favoriser l'adhésion sucrose-dépendante de ces bactéries et leur accumulation à la surface des dents, étape initiale dans la formation de la carie dentaire. Plusieurs évidences laissent penser que le Mn^{2+} joue un rôle capital dans les caries dentaires, même si ce rôle reste à déterminer.

De récentes études avec *L. plantarum* ont fourni d'autres évidences sur l'importance du Mn^{2+} comme signal chez les bactéries. Non seulement l'expression de MntA (P-type ATPase), mais aussi celle de deux enzymes glycolytiques, l'énolase et la GAPDH, sont réprimées dans un milieu riche en Mn^{2+} . Ces deux dernières protéines de surface ont été décrites comme liant des protéines de tissus humains chez une variété d'organismes et chez les streptocoques du groupe A, elles interviennent aussi dans l'habilité des bactéries à moduler les fonctions cellulaires de l'hôte ; elles possèderaient aussi des activités reliées à la plasmine et à la transferrine (Pancholi and Fischetti, 1998; Modun and Williams, 1999).

L'adhésion des streptocoques aux cellules épithéliales de l'hôte, à la matrice extracellulaire, aux protéines sériques, aux composantes salivaires est rendue possible la plupart du temps par des protéines de surface cellulaire. Les bactéries font face à des taux variables de Mn^{2+} au fur et à

mesure qu'elles se disséminent dans l'organisme. Les concentrations de Mn pourraient donc influencer l'expression de protéines de surface pertinentes pour la colonisation bactérienne et la virulence. Une fonction plausible des métallorégulateurs serait de prévenir l'accumulation de taux létaux de Mn^{2+} intracellulaire lorsque les pathogènes rencontrent des quantités croissantes de Mn^{2+} dans le sang et le SNC (Horsburgh, Clements *et al.*, 2001; Posey *et al.*, 1999).

3.4. Homéostasie du manganèse et pathogénie des infections streptococciques

Jakubovics et Jenkinson (2001) proposent le modèle décrit dans la figure ci-dessous pour établir un lien entre l'homéostasie du Mn et la détoxification des ROS.

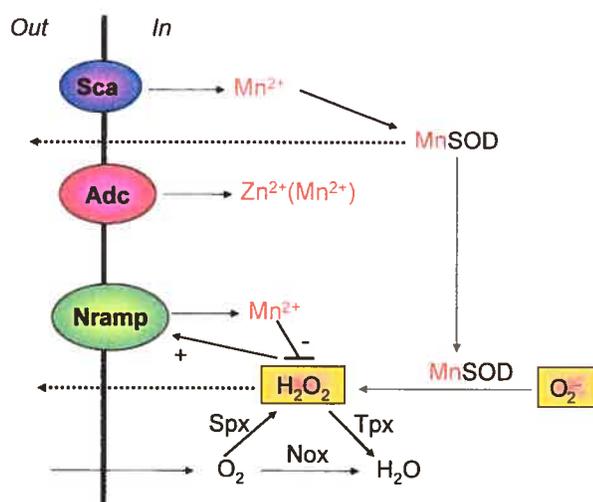


Figure 1: Model linking Mn²⁺ homeostasis and ROS-detoxification pathways in streptococci (Jakubovics and Jenkinson, 2001).

Deux transporteurs de type ABC, la perméase Sca (*S. gordonii*) ayant une forte spécificité pour le Mn^{2+} (Kolenbrander *et al.*, 1998) et la perméase Adc inhibé par Zn^{2+} (*S. pneumoniae*) (Dintilhac *et al.*, 1997) ainsi qu'un

transporteur de type NRAMP, s'occuperaient de l'acquisition du Mn^{2+} . L'ABC-transporteur de haute affinité pour Mn^{2+} fournirait le métal à la SOD lorsque le Mn^{2+} environnemental se fait rare. À la surface de la cellule, MnSOD (Gerlach *et al.*, 1998) protégerait du O_2^- exogène et détoxifierait aussi le O_2^- découlant du métabolisme aérobie. L'expression des NRAMPs serait régulée positivement par H_2O_2 produit à l'intérieur de la cellule (action de la pyruvate oxydase Spx et MnSOD). Il en résulte une accumulation de Mn^{2+} qui protège directement contre les dommages liés à H_2O_2 par un mécanisme encore peu compris (Kehres *et al.*, 2000). H_2O_2 peut aussi être dégradé par des peroxydases (thiol peroxydase Tpx, glutathione peroxydase Gpo, alkyl hydroperoxyde réductase AhpC) ou encore expulsé de la cellule.

3.5. Rôle du manganèse dans la pathogénie des microorganismes intracellulaires

Le rôle des transporteurs NRAMP bactériens dans la virulence est moins bien établi. Ils pourraient être nécessaires pour l'acquisition de cations divalents par les bactéries dans les phagosomes durant les infections chroniques. La pathogénicité de *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae*, deux pathogènes très menaçants pour l'homme, dépend en partie de leur habilité à se multiplier dans les macrophages de l'hôte. Les transporteurs de métaux NRAMP1 localisés dans les phagosomes des macrophages privent *Mycobacterium* de Fe et Mn en les pompant à l'extérieur de l'organelle (Jabado *et al.*, 2000). Cependant il a été proposé récemment que *Mycobacterium* pourrait contrecarrer ce processus via l'action de transporteurs NRAMP bactériens qui pomperaient quant à eux Mn et Fe du phagosome vers la mycobactérie. La pathogénicité de ces parasites serait donc fortement influencée par l'équilibre entre les deux transporteurs de métaux. Des mutations dans le gène *Nramp1* réduisent sensiblement l'habileté des macrophages à contrôler l'infection par divers pathogènes intracellulaires. En effet, NRAMP1 a plusieurs effets pléiotropiques sur la

fonction des macrophages, incluant la régulation d'IL-1 β , de TNF- α , des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et la production d'oxyde nitrique (NO) (Blackwell *et al.*, 2000). Il a été démontré que NRAMP1 affecte les propriétés biochimiques (maturation, acidification) et fusogéniques des phagosomes (Govoni *et al.*, 1999). L'hypothèse selon laquelle NRAMP1 serait aussi (comme NRAMP2, son homologue dans les tissus) un système de transport pour le fer (Atkinson and Barton, 1998; Zwilling *et al.*, 1999) est réfutée par Gunshin et coll. qui évaluent à 100 μ M l'affinité pour Fe²⁺ de cette molécule, une concentration beaucoup trop élevée pour être physiologiquement applicable (toxicité aiguë) (Gunshin *et al.*, 1997). NRAMP1 fournirait aux macrophages Mn²⁺ (et possiblement Fe²⁺ et Zn²⁺) pour combler les besoins en métaux de la SOD et de la catalase afin de protéger les cellules des ROS générés en réponse à l'infection. Dans le même temps, ce processus séquestre les mêmes métaux, les rendant inaccessibles aux pathogènes intracellulaires, de façon à ralentir leur croissance et la mise en place d'une protection, les rendant ainsi plus susceptibles au stress oxydatif (Govoni and Gros, 1998). En effet, en réaction au stress oxydatif, les pathogènes intracellulaires comme *S. typhimurium*, *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* et *Leishmania donovani* synthétisent entre autres, la SOD, une composante nécessaire pour la survie intracellulaire de ces pathogènes. Mn²⁺ est un cofacteur essentiel pour SOD ; l'élimination du cation de l'espace phagosomal amène l'inactivation de cette activité enzymatique protectrice et une activité bactéricide accrue du phagocyte, ce qui pourrait expliquer la susceptibilité conséquente des pathogènes intracellulaires aux infections. SodA (MnSOD) joue un rôle essentiel dans la protection de *S. agalactiae* contre le stress oxydatif. Dans des macrophages murins, le mutant *SodA* montre une susceptibilité accrue à la mort bactérienne. Dans un modèle d'infection murin, après injection intraveineuse, la survie du mutant *SodA* dans le sang et le cerveau est remarquablement réduite comparativement à celle de la souche mère et de la souche

complémentée (Poyart *et al.*, 2001). SodA est donc un acteur important dans la pathogénie des GBS.

Aussi, il est possible que NRAMP1 transporte en plus du Mn^{2+} , d'autres cations divalents tels Fe^{2+} ou Zn^{2+} , lesquels seraient importants pour le métabolisme général de ces parasites, incluant l'expression de facteurs de virulence responsables de l'arrêt prématuré de la maturation du phagolysosome (Jabado *et al.*, 2000). Un mutant *mntH* de *S. typhimurium* ne démontre qu'une faible atténuation de virulence chez la souris ; il est toujours invasif et survit dans des cellules HeLa ou des macrophages RAW264.7 en culture. Par contre, l'expression de *mntH :: lac Z* (constructions) est induite plusieurs fois trois heures après l'invasion des macrophages (Kehres *et al.*, 2000). Le transporteur NRAMP et Mn^{2+} pourraient donc jouer un rôle dans la pathogénie des entérobactéries. Le rôle des gènes *feoB* (perméase Fe^{2+}), *mntH* (perméase Mn^{2+}) et *sitABCD* (ABC-transporteur Fe^{2+}/Mn^{2+}) dans la pathogénicité de *Salmonella* a été étudié avec des souches mutées déficientes pour un, deux ou les trois transporteurs (Boyer *et al.*, 2002). Les résultats indiquent que l'acquisition de Mn^{2+} , en plus du Fe^{2+} , est requise pour une survie intracellulaire et une réplication de *S. enterica* sérovar Typhimurium dans les macrophages *in vitro* et pour la virulence *in vivo*.

Dans leur ensemble, ces données indiquent que des systèmes bactériens pour acquérir Mn^{2+} sont capitaux pour la protection contre les ROS. Nous ne savons pas encore les mécanismes exactes qui font que des mutants dans les systèmes de perméases (Mn^{2+}) sont moins virulents, mais pour quelques bactéries au moins, les évidences pointent vers les difficultés à tolérer les ROS. Comme ces dernières jouent un rôle non négligeable dans la défense de l'hôte contre les infections microbiennes, il est logique de supposer qu'une fonction essentielle de la séquestration du Mn^{2+} par les bactéries pathogènes est d'activer des systèmes de défense contre à la fois les ROS dérivés de l'intérieur et de l'extérieur. Les recherches sur l'homéostasie du Mn^{2+} chez les bactéries vont continuer à s'intensifier dans le futur ; dans l'immédiat il serait intéressant d'identifier d'autres transporteurs

du registre P-type ATPase de *L. plantarum* qui présente une remarquable spécificité pour le Mn^{2+} . Aussi, la découverte des transporteurs Nramps bactériens souligne les similarités entre les systèmes procaryotes et eucaryotes pour l'acquisition de cations. Toutes ces études illustrent le rôle joué par les transporteurs dans l'accumulation de manganèse pendant l'infection et souligne l'importance d'obtenir avec succès les ions métalliques présents à l'état de traces *in vivo*. De façon significative, l'observation d'un lien entre l'acquisition de Mn^{2+} et la virulence suggère que le transport du Mn^{2+} serait une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour le contrôle des infections microbiennes. On peut dire que des vaccins à base de Lral ou des produits pharmaceutiques capables de cibler spécifiquement les ABC-transporteurs de Mn^{2+} représenteraient des avenues prometteuses pour la prévention et le traitement des infections à streptocoques et entérocoques.

Article

En préparation

Younes, F., Lacouture, S., Niven, D. F., Gottschalk, M. Effect of iron and manganese availability on growth and expression of surface-associated proteins by *Streptococcus suis* serotype 2.

Effect of iron and manganese availability on growth and expression of surface-associated proteins by *Streptococcus suis* serotype 2

FATME YOUNES^{1,2}, SONIA LACOUTURE¹, DONALD F. NIVEN^{2,3}, AND
MARCELO GOTTSCHALK^{1,2*}

¹Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP),
Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine
vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

²Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine

³Microbiology Unit, Department of Natural Resource Sciences, Macdonald
Campus, McGill University, Ste-Anne de Bellevue, Québec, Canada

*Corresponding author.

Mailing address: GREMIP, Faculté de médecine vétérinaire, Université de
Montréal, 3200 rue Sicotte, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2,
Canada.

Phone: 450-773-8521, ext. 8374.

Fax: 450-778-8108.

E-mail: [REDACTED]

**Keywords: *Streptococcus suis*; Differential protein expression; virulence
factors; Iron; Manganese**

ABSTRACT

Streptococcus suis is one of the most important swine pathogens world-wide. In pigs, the most important clinical feature associated with *S. suis* is meningitis. Despite increasing research in recent years, knowledge of the pathogenesis of the infection remains limited. To induce meningitis, bacteria should travel throughout the bloodstream and reach the central nervous system (CNS). Virulent *S. suis* can stay in relatively high numbers in the blood for more than 5 days, whereas an avirulent strain is eliminated from the circulation within 48 h. So far, the attributes responsible for *S. suis* bloodstream survival and dissemination leading to meningeal invasion are still not clear. In this study, we investigated the ability of *S. suis* to grow in iron restricted and manganese deficient conditions. Cell-envelope protein profiles of *S. suis* grown under these conditions were also analyzed. Pathogenic and non-pathogenic isolates from North America and Europe were tested. All strains were able to grow in the absence of available Fe and in Mn-deficient media; however, both growth rate and final yield of virulent strains were greatly reduced in Mn-deficient conditions compared to avirulent strains. However, there did not appear to be any correlation between the capacities of the *S. suis* strains for growth under the conditions tested and their geographic origin or abilities to produce muramidase-released protein, extracellular factor or suilysin. One- and two-dimensional (1-D and 2-D) gel electrophoresis of cell envelope fractions from a virulent North American strain of *S. suis* (strain

89-999) grown in Mn-replete and Mn-deficient media revealed that Mn levels affected the expression of several highly acidic polypeptides including a 38-kDa polypeptide that was up-regulated by low Mn. Immunoblot analysis using sera from convalescent pigs experimentally infected with *S. suis* suggested the *in vivo* expression of this Mn-regulated protein. Mass spectrometric analysis revealed that the 38-kDa polypeptide is a homologue of PstC, a phosphate ABC-transporter, which may help *S. suis* to cope with oxidative stress. These data suggest that physiological adaptations are required for efficient bacterial growth under low-Mn conditions and demonstrate that Mn concentrations in the blood may regulate the surface expression of several proteins that may be involved in the survival of *S. suis* in the host.

INTRODUCTION

Streptococcus suis is a major cause of meningitis, septicaemia, arthritis, and bronchopneumonia in young pigs and can also cause meningitis in humans [1]. *S. suis* infection has a substantial economical impact on the swine industry since there are no effective means to control the infection. This is due largely to a lack of understanding of pathogenic mechanism(s), unknown protective antigen(s), and limited information on the genetics of the organism. To date, 35 capsular types have been described, of which serotype 2 is considered the most virulent and most frequently isolated from diseased animals and humans [2]. So far, the only proven critical virulence factor is the polysaccharidic capsule (CPS) [3]. Putative virulence factors identified so far include the muramidase-released protein (MRP), the extracellular protein factor (EF), a haemolysin (named suilysin), and adhesins such as the fibronectin-binding protein [4]. Most of these factors, such as the MRP, EF and suilysin, have been shown to be associated with virulence depending on the serotype and geographic origin of the strains [4-7]. However, their absence cannot be associated necessarily with non-virulence, and vice versa, virulent strains lacking some of these factors have already been reported. In fact, it has been reported that most European virulent *S. suis* capsular type 2 strains are MRP+, EF+ and suilysin+, whereas North American strains are, in general, negative for these factors. It has also been proposed that the

pathogenesis of the infection caused by these two phenotypes may be different [8].

The pathogenesis of meningitis caused by *S. suis* serotype 2 is largely unknown; however, several mechanisms have been recently proposed [8]. *S. suis* may be transmitted via the respiratory route, breaching the mucosal epithelia in the upper respiratory tract by as yet unknown mechanisms [8]. Once in the blood, bacteria would come into contact with phagocytes. Recent studies using isogenic mutants defective in capsule production demonstrated the antiphagocytic properties of the CPS, since non-capsulated mutants were readily phagocytosed and destroyed [3, 8, 9]. Survival of *S. suis* in the bloodstream as free bacteria would lead to septicemia and invasion of the meninges and other tissues. It is not clear how *S. suis* survives in infected pigs, where growth conditions are far from optimal, especially in the supply of metal ions, including iron (Fe^{2+} / Fe^{3+}) and manganese (Mn^{2+}). In fact, resistance to clearance from the bloodstream does not rely only on the presence of the CPS since a well encapsulated avirulent strain was eliminated from the circulation within 48 h but a virulent strain was shown to stay in relatively high numbers in the blood for more than 5 days [10]. Pathogenic bacteria may have virulence genes that are absent in non-pathogenic bacteria, making them virulent. Virulence genes may also be present in both pathogenic and non-pathogenic bacteria but may be functional only in pathogenic ones.

Upon colonizing the host, bacteria must compete for acquisition of metal ions essential for metabolic processes. Fe is an essential nutrient *in vivo* and

together with Mn is an important cofactor for many proteins, including components of the respiratory chain (cytochromes, cytochrome oxidase), and oxidative defence systems [catalase, peroxidase, superoxide dismutase (SOD)] [11, 12]. Little free iron (10^{-18} M) is present in the host because most is complexed to eukaryotic proteins (transferrin, lactoferrin) which represent the primary reservoir of iron for pathogenic bacteria [13]. Also, most available Mn^{2+} is complexed with albumin and transferrin *in vivo* [14]. Although there are many examples of Mn^{2+} participating in enzyme functions (lactate dehydrogenase, RNA polymerase), Mn^{2+} is also essential for the detoxification of reactive oxygen species (ROS) in most bacteria [12, 15], principally as a cofactor for the SOD (*sodA*). However, several groups of lactic acid bacteria incorporate high levels of intracellular Mn^{2+} as a protectant in place of enzymic SOD [15]. In addition, it appears that Mn has an important role to play in bacterial signal transduction [16, 17].

While an essential role for Fe^{2+}/Fe^{3+} is well established in promoting growth of Gram-negative pathogens, little is known about the involvement of Fe^{2+} and other redox-active ions such as Mn^{2+} in streptococcal infections. Interestingly, new experimental and genomic sequence data suggest that some microorganisms (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*) may have no requirement for Fe, having evolved metabolic and survival strategies that can be accommodated by Mn [18-20]. Several lines of evidence suggest that Mn^{2+} can support the growth of streptococci under Fe^{2+} -limited conditions [21, 22].

The addition of Mn^{2+} to the growth medium was required for optimal growth of *Streptococcus cricetus* [23], *S. suis* [22] and *Streptococcus pneumoniae* [24]; Mn^{2+} was shown to be essential for the glucan-associated adhesion of some mutans group streptococcal species [25] and for pneumococcal transformation [24]. Moreover, the major SOD activity, which protects against oxidative stress, is Mn^{2+} co-factored in streptococci [26-29]. The observation that Mn acquisition by bacteria is linked to virulence in the host [12] suggests that manganese transport is a potential new therapeutic target for control of bacterial infection.

As a successful pathogen, *S. suis* has to display rapid responses when encountering an array of adverse environmental conditions such as changes of temperature, oxygen pressure, and pH, as well as limitations in nutrients or metal ions. Presumably, these responses involve the expression of proteins induced upon sensing of respective signals. It is known that many important virulence factors are environmentally-regulated and are induced at specific stages of the infection process [30]. Iron depletion is known to have a profound effect on expression of virulence factors [31, 32], many of which are found on the cell surface or secreted into the culture supernatant, e.g. toxins (shiga toxin, diphtheria toxin, exotoxin A) and to affect the composition and surface structure of microorganisms. Smith et al. [33] identified environmentally-regulated genes of *S. suis* induced under iron-restricted conditions *in vitro* (*iri*) and by experimental infection of piglets. Four *iri* genes involved in the regulation of capsule expression and oxidative stress response as well as transport systems were identical to four clones (*ivs*)

selected *in vivo*, suggesting that the expression of some *ivs* genes is regulated by iron. Two *ivs* genes were similar to genes for putative virulence factors. One of these *ivs* genes showed similarity to genes encoding fibronectin/fibrinogen-binding proteins of *Streptococcus gordonii* and group A streptococci (GAS). Similarly, de Greeff et al. (2002) [4] described a fibronectin/fibrinogen-binding protein expressed under *in vivo* conditions that contributes to pathogenesis of *S. suis* serotype 2 in piglets. Fibronectin is found on the surface of epithelial and endothelial cells and may be a factor in promoting bacterial colonisation.

In this report, we attempted to identify components at the cell surface of a virulent strain of *S. suis* serotype 2, which are newly-expressed or up-regulated in response to Fe-restriction and Mn-limitation, stress signals to which the pathogen is exposed when entering deeper tissues and the bloodstream. We also investigated the capability of pathogenic and non-pathogenic strains of *S. suis* serotype 2 of European and North American origins to grow under the same stress conditions.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The *S. suis* serotype 2 type strain S735 was used as the reference strain in this study and *Actinobacillus suis* was used as a control. Four other *S. suis* serotype 2 strains were also included in this study: two avirulent strains (94-623 and 90-1330, of European and North American origin, respectively) and two virulent strains (European strain 31533 and North American strain 89-999). Strains 94-623 and 89-999 do not produce MRP, EF and suilysin; strain 90-1330 possesses the MRP only and strain 31533 is positive for the three factors. Storage cultures and inocula were stored frozen (-80°C) as 1 ml volumes of late exponential phase cultures supplemented with 15% (vol/vol) glycerol; the basic medium was *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethane-sulfonic acid (HEPES) (ICN Biomedical Inc., Aurora, OH, USA) -buffered tryptone-yeast extract (TYE-H) supplemented, just prior to inoculation, with NaHCO₃ (to 10 mM) and is referred to as supplemented TYE-H (sTYE-H) [22]. sTYE-H (complex medium = CM, control) was used for growth of organisms under iron-replete conditions. The tryptone and yeast extract used in these experiments were each from a single batch. For growth under iron-restricted conditions (EDDA), the basic medium received, prior to autoclaving, an appropriate volume of a solution containing 75 mM of ethylenediamine di-*o*-hydroxyphenylacetic acid (EDDA) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), 150 mM NaOH and the

NaCl concentration was adjusted to 61 mM. To prepare TYE-H with a reduced iron and manganese content (Chelex-treated medium = CTM), the medium was treated with Chelex-100 resin (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as described previously by Niven et al. (1999). The iron contents of TYE-H, TYE-H + 1mM EDDA and Chelex-treated TYE-H were determined using a ferrozine-based assay (Sigma); the ferrozine-detectable iron contents were found to be 16, 0 and 1 μM , respectively. Unless otherwise stated, plasticware was used to contain and manipulate all media and all solutions were prepared with glass-distilled, deionized water. For growth studies, media (25-ml volumes) were contained in 125-ml screw-capped flasks; for all other studies, media (200-ml volumes) were contained in 1-L screw-capped Nalgene flasks (Fisher Scientific Co, Montreal, QC, Canada). Immediately prior to inoculation, supplements were added to the above media as previously described by Niven et al. (1999). Where appropriate, media were further supplemented with freshly prepared MnSO_4 (to 10 μM) (Sigma) and (or) FeSO_4 (to 10 μM) (Fisher). All cultures (0.1% (v/v) inoculum) were incubated at 37°C, with the caps loose and with agitation on a gyratory shaker (200 rpm), in an atmosphere not enriched with CO_2 . Growth was monitored turbidimetrically at 660 nm (Gilford Stasar II spectrophotometer) using 0.75-ml samples. Determination of the CFU per milliliter in the early stationary phase culture was made by plating onto TYE-H agar.

Statistical analysis. Differences were analyzed for significance by using the Student's *t*-test (two-tailed *P* value). A *P* value < 0.05 was considered significant. Differences between strains of each group (virulent vs avirulent)

were analyzed for significance using the mixed linear model, with treatment and type of strain as fixed factors and strain as a random factor, followed by Tukey-Kramer post-hoc tests for differences between each treatment. The SAS software (SAS, Cary, NC, USA) was used for these analyses.

Preparation of cell-envelope extracts. Cultures to be used for the preparation of cellular extracts were grown to early stationary phase. The organisms from each 400-ml volume of culture were harvested by centrifugation ($12\ 000 \times g$; 15 min; 4°C), washed with 360 ml of cold (4°C) 10 mM HEPES buffer, pH 7.4 (KOH) (centrifugation as above) and washed again with 30 ml HEPES buffer ($27\ 000 \times g$; 15 min; 4°C). Bacteria were then suspended in 10 ml HEPES buffer and lysed by sonication on ice (80 W, 20×10 -sec bursts, Sonifier Cell Disruptor, Model W185D Heat Systems-Ultrasonics Inc., Plainview, N Y) with 1 min cooling in an ice bath between bursts. Unbroken bacteria and large debris were removed by centrifugation ($12\ 000 \times g$; 15 min; 4°C). Total membranes were separated from the soluble protein fraction by high-speed centrifugation ($180\ 000 \times g$; 1 h; 4°C). The membranes (cell-envelope fraction) were rinsed once in 50 mM Tris-HCl, pH 7.3, to remove residual soluble proteins, pelleted again by ultracentrifugation and resuspended in a small volume of HEPES buffer. Aliquots of cell lysates and rinsed membranes were stored at -20°C . Alternatively, samples to be used for two-dimensional (2-D) SDS-PAGE were resuspended in a rehydration buffer containing 9.8 M urea, 4% (w/v) CHAPS, 40 mM dithiothreitol (DTT), 20 mM Tris base. Proteins were then purified by acetone

precipitation (-20°C, overnight), washed twice with acetone and finally resuspended in a small volume of rehydration buffer and kept at 4°C.

1-D and 2-D gel electrophoresis. Total protein concentrations of cell-envelope extracts were estimated by the cuprum-binding method (2-D Electrophoresis Kit, Amersham) using bovine serum albumin as standard. The same amounts of proteins from different samples were loaded on the gels. For 1-D SDS-PAGE, samples were diluted in 1 X Laemmli loading buffer containing 4% SDS, 20% glycerol, 10% (v/v) 2-mercaptoethanol and 0.02% bromophenol blue in 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, immersed in boiling water (5 min), cooled on ice and subjected to SDS-PAGE (12 % polyacrylamide) using a Protean II xi electrophoresis system (Bio-Rad) (40 µg protein per lane); the electrode buffer was 25 mM Tris, 250 mM glycine, 0.1% (w/v) SDS. Broad Range Molecular Weight Protein Standards (Amersham Pharmacia, Baie d'Urfé, QC, Canada) were treated similarly. Electrophoresis was conducted at 300 V per gel during 4 h. Protein bands were visualized by coomassie brilliant blue staining [34]. Molecular masses of proteins were estimated from their migration distances by reference to a standard plot built on relative migration distances and on molecular masses of 9 standard proteins. Two-Dimensional SDS-PAGE was carried out with the IPGphor system (Amersham Pharmacia). Isoelectric focusing was carried out on Immobiline DryStrips (18 cm, Amersham Pharmacia) providing a linear pH 4-7 gradient. One hundred micrograms of protein in 350 µl of rehydration buffer supplemented with 2% IPG buffer were loaded per strip holder. Active rehydration of the strips (protein absorption) was carried out for 16 h at 18°C and 30V. After gradual

increase of the voltage up to 3000V, IPGphor was run for the total of about 72000 V h⁻¹. After electrophoresis, the strips were equilibrated with SDS-equilibration buffers (2% SDS) containing 2% DTE or 2.5% iodacetamide. In the second dimension, electrophoresis was carried out at 10 W/gel for approximately 4 h using a Protean II Electrophoresis System (BioRad) and 12% polyacrylamide gel (18 cm × 20 cm × 1 mm). Proteins separated in two dimensions were visualized by silver staining [35]. Computerized analysis of protein spot patterns was done using ImageMaster 4.01 (Genome Québec). The control gel (CM, Complex medium) was used for determination of existence and difference of protein expression with the experimental gel (CTM, Chelex-treated medium). Intensity less than 0.5-fold or greater than 2-fold of the control was considered significantly changed. The differentially expressed polypeptides of 38-kDa were excised with a clean razor and subjected to in-gel trypsin digestion on the robotic station MassPrep (Packard, UK) followed by Mass Spectrometry of the extracted digests using either LC-QToF or MALDI-QToF (Génome Québec). Identification was performed by using the MASCOT search engine (www.matrixscience.com). Electrophoretically separated proteins (1D-SDS PAGE) were transferred to a nitrocellulose membrane (pore size 0.2 μm; Bio-Rad) by electroblotting (50 V; 24 h; 4°C) (Trans-Blot[®] cell, Bio-Rad, Richmond, CA, USA). After transfer, the proteins were visualized with Ponceau red and the standards were marked. Non-specific binding was blocked by incubation overnight in Tris-NaCl solution (10 mM Tris-HCl, pH 7 and 154 mM NaCl) containing 2% milk casein

at 4°C. All washing steps were done with Tris-NaCl buffer. After three washings, blots were incubated for 2 h at room temperature with serum from convalescent pigs diluted 200-fold in blocking buffer. After three 5-min washes, blots were incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-pig antibodies (1:3000 in blocking buffer) (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA, USA). Bound immunoglobulins were visualized using 4-chloro-1-naphthol solution (Sigma) [34]. The staining reaction was stopped with distilled water.

RESULTS AND DISCUSSION

Virulent and avirulent S. suis strains, of North American or European origin, do not need iron for growth. In order for *S. suis* to invade the blood brain barrier (BBB) and cause meningitis, a bacteremic state must occur. Given this evidence, it was of interest to investigate whether environmental conditions encountered within the blood, such as iron and manganese limitation, could influence growth and expression of particular membrane proteins that might help *S. suis* to survive in blood and to cross the BBB *in vivo*. In fact, the study of virulence factors of *S. suis* are often done in optimal conditions of growth that do not reflect *in vivo* conditions. In this study, the ability of various strains of *S. suis* to grow under conditions which potentially mimic the *in vivo* blood environment, particularly low Fe and Mn concentrations, was investigated. Niven et al. (1999) suggested that iron was not required for the growth of the reference strain of *S. suis* serotype 2. This was confirmed by results obtained in this study. In addition, statistical analysis between virulent and avirulent strains, revealed no significant differences ($P > 0.05$) in the growth yield reached after 5-6 hours of incubation, where bacteria are at the early stationary phase, in the absence of available iron, as compared to growth in the absence of EDDA (Fig. 1). In contrast, the growth of *A. suis* was inhibited completely when the growth medium contained 1 mM EDDA (Fig.1, Annexe).

The growth observed was not due to the carry over of iron from the inoculum, as 0.1% (v/v) inoculum brings only a tiny amount of iron in the broth if iron concentration in TYE-H is considered to be around 16 μM . Interestingly, while the final net growth of organisms was nearly the same, differences in the growth kinetics were observed in the presence of EDDA (data not shown). Very little is known about the involvement of iron in streptococcal infections and data on the iron requirements and uptake systems of the different species of streptococci are not conclusive. No species of streptococcus has been reported to produce iron-chelating compounds, called siderophores [36, 37]. While there have been contradictory reports regarding a possible iron requirement for *Streptococcus mutans* [38, 39], Group A streptococci (GAS) and *S. pneumoniae* exhibit a growth requirement for iron [36, 37, 40], whereas some streptococci appear to require little, if any, iron [21, 22, 39, 41]. *S. suis* seems to belong to this last group. The capacity to survive and grow in an iron-restricted environment can provide an effective advantage to pathogenic bacteria, making them capable of colonizing mucosal surfaces and invading host tissues and blood-stream.

The geographical origin of strains, as well as virulence, had no significant effect on the growth of *S. suis* in iron-restricted media. Both European (including the reference strain S-735) and North American strains were able to grow well in Fe-restricted conditions (Fig.1). Thus, the ability of the strains investigated to grow in the iron-restricted medium does not seem to be linked to the virulence or phenotype, suggesting that the advantage of producing a haemolysin observed for some virulent strains of *S. suis* (31533 in this study)

does not seem to be linked to iron acquisition. However, other streptococci, like GAS, profit from their ability to lyse cells during infection in order to provide for a strategy other than siderophore production for acquiring iron from its human host [36].

Virulent and avirulent S. suis strains, of North American or European origin, do not express iron-responsive cell-surface proteins. In addition to studying the growth of *S. suis* strains under iron-replete and iron-restricted conditions, the effects of these growth conditions on the expression of surface-associated proteins were also investigated. In other bacteria, production of virulence factors, like streptolysin S of GAS, is influenced by medium iron concentration *in vitro* [40]. Furthermore, the addition of the iron chelator nitrilotriacetic acid (NTA) to log-phase cultures of GAS results in the appearance of several new proteins in the culture supernatant [42], including glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), which may be important for the virulence of GAS and the manifestations of disease.

Although in many bacterial pathogens, low iron concentrations can induce the production of new proteins and/or up-regulation of existing ones [31, 32], this was not the case for *S. suis*. Cell-wall protein profiles obtained by one-dimensional gel electrophoresis of pathogenic and non-pathogenic *S. suis* strains, were very similar in Fe-restricted and non-restricted media (Fig. 2, Panel A, Lane 2).

Even though our results showed no differential protein expression in Fe-restricted conditions, recent work by Smith et al. (2001) [33] described 18

unique iron-restriction-induced (*iri*) genes and 22 unique *in-vivo*-selected (*ivs*) genes of *S. suis*. Interestingly, four *iri* genes were identical to four *ivs* genes. Based on these data, changes in protein profiles might be expected. However, Smith et al. did not show that these genes were capable of expressing functional proteins. Nevertheless, it would be interesting to look for differential protein expression using two-dimensional separation gel electrophoresis.

Manganese seems to be important for the growth of virulent, but not for avirulent, strains. One of the major challenges facing bacteria growing in oxygenated environments is to efficiently resist or repair damage caused by reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide (O₂⁻) and hydroxyl radicals (·OH). Internal ROS are produced following diffusion of molecular oxygen into bacterial cells from the blood-stream and activities of oxidases. Iron is inextricably linked to oxidative damage, primarily through the ability of Fe²⁺ to reduce H₂O₂ (Fenton reaction) [27]. In fact, although it requires little, if any, iron for growth, *S. suis* S-735 cannot exclude it [22, 43]. One strategy for minimizing oxidative damage therefore involves limiting intracellular Fe content. In fact, there is good evidence that lactic acid bacteria including several species of streptococci have dispensed with iron requirements [21, 22, 27, 44]. Where bacteria grow in the absence of Fe, they appear to have an absolute requirement for Mn²⁺. Mn²⁺ can support the growth of *S. gordonii* in the absence of Fe²⁺/Fe³⁺ [44]. Similar observations have been made for *S. mutans* [21] and for the *S. suis*

type strain [22]. In this study, we investigated the effect of optimal or reduced concentrations of Mn on the growth of several *S. suis* strains, comparing virulent with avirulent ones, and European versus North American ones. As previously shown, virulent strains required Mn for optimal growth and showed the same pattern of growth (data not shown) observed by Niven et al. (1999) using the type strain S-735. However, manganese deprivation had no significant effect ($P > 0.05$) on avirulent *S. suis* strains investigated with respect to the control condition. In addition, when *A. suis* was grown in CTM, no decrease in growth was observed compared to growth in the control medium (Fig.1, Annexe).

Low Mn exposure may directly affect cell viability of *S. suis*. Bacterial concentrations of the virulent strain (89-999) in the control culture and in CTM supplemented with Mn, were 8.3×10^8 CFU ml⁻¹ and 3.7×10^8 CFU ml⁻¹, respectively, after 5.5 hours of incubation whereas a bacterial concentration of 2.4×10^7 CFU ml⁻¹ (10 times less) was obtained in CTM (Mn-limited). Thus we were able to show that the effect of treatment was not the same in virulent and avirulent strains. While growth of avirulent strains was not significantly affected in Chelex-treated TYE-H, virulent strains grew slowly in this treated medium, with yields of about one-half of those for bacteria grown in regular TYE-H (Fig. 1). Presumably, the content of trace metals was reduced to a level which greatly slowed growth but did not completely prevent it. Since chelex treatment removed not only manganese but also other cations, these cations were replaced to concentrations present in the original untreated

medium in order to ensure that observed effects would be related to manganese depletion rather than to other elements [22]. There were significant differences between growth in the control condition and in CTM ($P < 0.0001$). Optimal growth was only recovered when CTM was supplemented with MnSO_4 , differences in the growth yields were significant ($P < 0.0001$) between CTM and CTM supplemented with MnSO_4 (Fig. 1). Here again, iron does not seem to make a difference since growth yields and growth rates were not changed by the addition of FeSO_4 to CTM supplemented with Mn (Fig.1). Also, supplementing CTM with iron alone makes little difference to the growth kinetics of the strains (data not shown). Data obtained with European strains, including *S. suis* S-735, revealed similar results in comparison to North American strains (Fig.1).

Our results indicate that the ability of *S. suis* to grow under manganese-limited conditions is independent of the phenotype but could be a determinant of virulence. Mn is reported to be essential for the detoxification of ROS in most bacteria, principally as a cofactor for Mn-SOD. Also several groups of lactic acid bacteria incorporate high levels of intracellular Mn as a protectant in place of enzymic SOD. Inactivation of the *sodA* gene in *S. pyogenes* sensitizes these cells to O_2^- [45] and in *S. pneumoniae* [46], reduces virulence in intranasal infection of mice. So there is a direct correlation between Mn homeostasis, sensitivity of bacteria to oxidative stress and virulence in the host. No consistent quantitative differences in the level of Mn-SOD activity of pathogenic and non-pathogenic isolates of *S. suis* type 2 was observed [47].

A possible explanation for avirulent strains being able to grow well in low-Mn²⁺ medium compared to virulent strains might be related to the fact that they do not have the essential components to cause an infection, so that they are eliminated even before being exposed to low-Mn concentrations. They had never been exposed to this pressure or stimulus whereas virulent strains have been exposed, and have adapted. It is unknown which factors of virulent *S. suis* strains contribute to the invasion of mucosa and the successful spreading within the organism. Some potential virulence factors have been identified so far; however, they are either serotype specific or not solely responsible for virulence.

Manganese seems to affect cell-envelope protein expression of S. suis strain 89-999. The ability to utilize Mn²⁺ for growth, whether in place of or in addition to Fe, would provide a selective advantage for *S. suis* and other pathogenic organisms under conditions of severe iron restriction, which occurs within human tissues, provided the bacteria possessed mechanisms to successfully compete for available Mn²⁺. Thus the activity of the Sca (Mn²⁺) permease in *S. gordonii* [44], and of related transporters in other streptococci (*S. pneumoniae*, *Streptococcus parasanguis*) must be crucial for the acquisition of Mn²⁺ during infection of host tissues, in which concentrations of available Mn²⁺ might be typically below 20 nM [48]. Recent studies with *Lactobacillus plantarum* have provided further evidence for an important role of Mn sensing and signaling in bacteria. Expression not only of the Mn transporter (MntA), but also of two glycolytic enzymes, enolase and GAPDH,

is repressed in Mn^{2+} -rich medium [49]. Surface-bound enolase and GAPDH have been shown to bind human tissue proteins in a variety of organisms, and in GAS they are implicated in the ability of the bacteria to modulate host cell functions [50]. It is tempting to speculate, therefore, that Mn^{2+} concentrations might influence expression of surface proteins that are relevant for the virulence of *S. suis*.

Hence we were interested in the cell-surface protein expression pattern of pathogenic *S. suis* 89-999 serotype 2 originally isolated from a diseased animal [51] in response to Mn limitation. The ability to survive in different host environments is the result of molecular adaptation, e.g., changes in the expression of specific cell surface components. Surface proteins constitute a diverse group of molecules with important functions in Gram-positive bacteria, such as adhesion, signalling, and defence mechanisms.

Cell-envelope proteins of *S. suis* 89-999 grown in Mn-depleted condition were analyzed by 1-D gel electrophoresis. A protein of 38 kDa was clearly up-regulated compared to the control fraction (Fig. 2, Panel A, Lane 1). This protein is under Mn control since supplementation of the growth medium with $MnSO_4$ brings its expression back to normal (not shown). Some other proteins seemed up- and down-regulated but the difference was not as evident as that of the 38 kDa band. Spatafora and Moore used a metal-depleted chemically-defined medium treated with Chelex-100 (mdFMC_{cx}) to identify the differential expression of Mn and Fe-responsive proteins of *S. mutans* on SDS-PAGE gels. They found out that Mn has a unique effect on *S. mutans* protein expression.

One-dimensional immunoblot was performed to determine whether any of the surface-associated proteins expressed in low-Mn medium were recognized by convalescent pig sera that were exposed to whole *S. suis* 89-999 cells. The proteins were electrolytically transferred to nitrocellulose. Sera from convalescent pigs reacted with the fixed antigens from the Mn-deficient extract that were not present in extract from control condition (Fig. 2, panel B). Reaction between the Mn-regulated 38 kDa protein with pig antibodies raised to whole *S. suis* 89-999 cells underlines the fact that it is a surface component likely expressed *in vivo* and may be accessible at the cell surface. There was no reaction of any of the antigens on the blots with pig pre-immune serum (1:200 dilution) under the same conditions (data not shown).

We tried using several techniques to identify this manganese-regulated 38 kDa band but were unable to do so. Hence, cell-wall proteins were resolved by 2-D polyacrylamide gel electrophoresis in order to better isolate this 38 kDa protein (Fig. 3). The best expressed protein species were situated in the pH range 4-7, mostly in the form of spot clusters which is quite characteristic for bacterial membrane fractions. The most interesting zone (pH 4-6; MW 20-kDa to 95-kDa) was taken for computerized analysis. 2-D separation revealed an increased number of silver-stained spots from the Mn-depleted culture (143 spots on average) compared with proteins extracted from the control culture (119 spots on average). Expression of 20 protein forms was decreased after exposure to Mn-depletion (Fig. 3, squares) and 13 protein forms had increased expression after low Mn exposure (Fig. 3, circles) compared to the untreated medium. Several proteins were not matchable,

raising the possibility of newly expressed proteins under low Mn condition. Thus, in this study we showed that low Mn exposure markedly altered cell-wall protein expression.

We focused our initial efforts on the highly induced proteins in Mn-limited conditions that migrated with an apparent molecular mass of about 38 kDa. In fact, the 38 kDa band previously observed on 1-D separation seems to contain a complex mixture of proteins revealed after 2-D separation, which explains the difficulty we had in identifying it. We observed at least a 2-fold increase in a 38 kDa protein (Fig. 3A, spot # 5) with significant sequence homology (amino acid) to PstC (P_i-specific transporter). The identified protein was in the expected size range based on its position on the gel. Theoretical M_r was calculated by the "Compute pI/M_w" tool available from the ExPASy internet server at (<http://www.expasy.ch>).

Pst is a tightly regulated high affinity system structurally similar to ATP-binding cassette (ABC) transporters and is known to be operative in several bacteria like *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, *S. pneumoniae* [52, 53], etc., in phosphate (P_i)-limiting conditions. In *E. coli*, it is encoded by the *pst-phoU* operon, a member of the Pho regulon. This operon of five genes (*pstSCABU*) codes for the PstSCAB transporter and a protein called PhoU, whose function is still unclear. *pstS* encodes a phosphate-binding protein, while the two following open-reading frames (ORFs), *pstC* and *pstA*, encode transmembrane proteins and *pstB* encodes an ATP-binding protein [54]. Daigle et al. [55] reported that a mutation in *pstC* gene of an *E. coli* strain reduced the serum

resistance and also the pathogenicity, making it unable to cause septicaemia in pigs. The authors suggest that this mutation may have a direct effect on the virulence by an unknown function of the phosphate transporter, or it may affect virulence indirectly by regulation of other gene(s) unrelated to the *pho* regulon. Thus, it is possible that the phosphate transport system coded by *pst-phoU* operon is involved either directly or indirectly in the pathogenicity of the septicaemia-inducing *E. coli* strain [55]. In addition, recent work [56] reported the identification of virulence genes of pathogenic *Edwardsiella tarda*, an important cause of gastro- and extra-intestinal infections in humans. Highly attenuated mutants of *E. tarda* had mutations in the *pst* operon, which may either directly affect the uptake of phosphate or indirectly affect the expression of virulence-related genes. Hence, the Pst system seems to play an important role in the virulence of bacteria.

In the case of *S. suis*, PstC expression is increased under Mn-depleted conditions, which is a form of stress on the bacteria. Under stressful conditions, like UV radiation, oxidative damage, osmotic stress, (p)ppGpp (guanine nucleotide derivative of GTP/GDP that possesses a pyrophosphate group on the ribose 3' hydroxyl) is produced. The production of this molecule results in increased levels of σ^S , the sigma factor responsible for activation of more than 50 genes required for adaptive responses to stress. An important enzyme involved in (p)ppGpp metabolism is SpoT, which liberates pyrophosphate. Phosphate is then fed back into the cycle to replenish (p)ppGpp levels. Mutations in *spoT* cause several characteristic defects in (p)ppGpp metabolism during the stringent response as well as during steady-

state growth. This enzyme requires Mn^{2+} and is further stimulated by magnesium (Mg^{2+}). Therefore, since Mn^{2+} availability may have an effect on the levels of active SpoT, it is possible that low Mn concentrations in the Chelex-treated medium would provoke defects in the ability of *S. suis* to accumulate (p)ppGpp during the stringent response. Consequently, *S. suis* could by-pass the need for SpoT to replenish phosphate levels by increasing the expression of a phosphate-transporter (PstC) thus maintaining (p)ppGpp synthesis. This could explain the reason why we found increased expression of a 38 kDa protein with homology to a phosphate-transporter under Mn-limiting conditions.

Finally, although there are many examples of Mn participating in enzyme functions, there are also descriptions of this metal acting catalytically as an antioxidant by associating with anions, including phosphate, and metabolic intermediates such as malate or lactate, for the scavenging of ROS [15]. Initially, it was believed that this activity would be confined to bacteria devoid of SOD proteins and would not be present in the majority of aerobic bacteria, which possess enzymic SOD activity. However, bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *E. coli* possess this elemental ROS detoxification system using low molecular weight Mn^{2+} -complexes even if they synthesize highly efficient SOD enzymes. Horsburgh et al. (2002) [15] proposed that the use of such complexes by bacteria, to provide a basal level of protection against ROS, might increase the “fitness” of the cell by minimizing energy expenditure on the synthesis of a defence regulon. This overlooked defence mechanism is likely to be widespread among bacteria and might also

significantly contribute to virulence. It is tempting to speculate that reduced ROS defence is the reason for the observed decrease in viability and growth of *S. suis* in low Mn environment since Mn accumulation seems so important for peroxide and/or superoxide defence in different species of bacteria and since *S. suis* produces a SOD which is Mn-cofactored. Assuming that Mn limitation constitutes a source of stress for *S. suis*, overexpression of PstC, by permitting assimilation of phosphate from the environment and catalysis of ROS detoxification with minimal energy consumption, would help the cell to cope with stress and to survive.

Virulence factors can be modulated by various environmental stimuli. This can result in the coordinate expression of sets of genes, including virulence genes, whose products bear little or no apparent functional relationship. Thus it is possible that phosphate transport is involved either directly or indirectly in the pathogenicity of *S. suis* or in its ability to grow in Mn-deficient environment. Mn-limitation seems to be a source of stress for virulent *S. suis in vivo* since both growth and protein expression are affected when the organism is grown in the Chelex-treated medium. We hypothesize that increased presence of PstC in low Mn medium represents an attempt by *S. suis* to overcome oxidative damage. The identification and cloning of proteins expressed in media short of essential nutrients, mimicking *in vivo* conditions, may contribute to our understanding of the capacity of *S. suis* to survive in the blood-stream, and may lead to the development of diagnostic and preventive tools.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine. We gratefully acknowledge Dr. L. Kriazhev (Genome Quebec, QC, Canada) for kindly providing us with excellent technical assistance during the course of this investigation.

REFERENCES

1. **Higgins, R. and M. Gottschalk.** (1999) Streptococcal diseases. In: *Diseases of swine*, B.E. Straw, S. D'Allaire, W.L. Mengeling, and D.J. Taylor. Ames, Iowa State University: 563-570.
2. **Higgins, R. and M. Gottschalk.** (1998) Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1997. *Can Vet J.* 39, 299-300.
3. **Charland, N., J. Harel, M. Kobish, S. Lacasse, and M. Gottschalk.** (1998) *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology.* 144, 325-332.
4. **de Greeff, A., H. Buys, R. Verhaar, J. Dijkstra, L. van Alphen, and H.E. Smith.** (2002) Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun.* 70, 1319-1325.
5. **Gottschalk, M., A. Lebrun, H. Wisselink, J.D. Dubreuil, H. Smith, and U. Vecht.** (1998) Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res.* 62, 75-79.

6. **Segers, R.P., T. Kenter, L.A. de Haan, and A.A. Jacobs.** (1998) Characterisation of the gene encoding suilysin from *Streptococcus suis* and expression in field strains. *FEMS Microbiol Lett.* 167, 255-261.
7. **Smith, H.E., H.J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, U. Vecht, and M.M. Smits.** (1997) Virulence markers of *Streptococcus suis* type 1 and 2. *Adv Exp Med Biol.* 418, 651-655.
8. **Gottschalk, M. and M. Segura.** (2000) The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol.* 76, 259-272.
9. **Smith, H.E., M. Damman, J. Van der Velde, F. Wagenaar, H.J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, and M.A. Smits.** (1999) Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun.* 67, 1750-1756.
10. **Berthelot-Herault, F., R. Cariolet, A. Labbe, M. Gottschalk, J.Y. Cardinal, and M. Kobisch.** (2001) Experimental infection of specific pathogen free piglets with French strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res.* 65, 196-200.
11. **Culotta, V.C.** (2000) Manganese transport in microorganisms. *Met Ions Biol Syst.* 37, 35-56.

12. **Jakubovics, N.S. and H.F. Jenkinson.** (2001) Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria. *Microbiology*. 147, 1709-1718.
13. **Bullen, J.J.** (1981) The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis*. 3, 1127-1138.
14. **Harris, W.R. and Y. Chen.** (1994) Electron paramagnetic resonance and difference ultraviolet studies of Mn²⁺ binding to serum transferrin. *J Inorg Biochem*. 54, 1-19.
15. **Horsburgh, M.J., S.J. Wharton, M. Karavolos, and S.J. Foster.** (2002) Manganese: elemental defence for a life with oxygen. *Trends Microbiol*. 10, 496-501.
16. **Barford, D.** (1996) Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci*. 21, 407-412.
17. **Schroeter, R., S. Schlisio, I. Lucet, M. Yudkin, and R. Borriss.** (1999) The *Bacillus subtilis* regulator protein SpoIIIE shares functional and structural similarities with eukaryotic protein phosphatases 2C. *FEMS Microbiol Lett*. 174, 117-123.
18. **Weinberg, E.D.** (1997) The Lactobacillus anomaly: total iron abstinence. *Perspect Biol Med*. 40, 578-583.

19. **Pandey, A., G. Bringel, and J.-M. Meyer.** (1994) Iron requirement and search for siderophores in lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 40, 735-739.
20. **Posey, J.E., J.M. Hardham, S.J. Norris, and F.C. Gherardini.** (1999) Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 10887-10892.
21. **Spatafora, G. and M. Moore.** (1998) Growth of *Streptococcus mutans* in an iron-limiting medium. *Methods Cell Sci.* 20, 217-221.
22. **Niven, D.F., A. Ekins, and A.A.-W. Al-Samaurai.** (1999) Effects of iron and manganese availability on growth and production of superoxide dismutase by *Streptococcus suis*. *Can J Microbiol.* 45, 1027-1032.
23. **Drake, D., K.G. Taylor, and R.J. Doyle.** (1988) Expression of the glucan-binding lectin of *Streptococcus cricetus* requires manganous ion. *Infect Immun.* 56, 2205-2207.
24. **Dintilhac, A., G. Alloing, C. Granadel, and J.P. Claverys.** (1997) Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: *Adc* and *PsaA* mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from

- inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol.* 25, 727-739.
25. **Bauer, P.D., C. Trapp, D. Drake, K.G. Taylor, and R.J. Doyle.** (1993) Acquisition of manganous ions by mutans group streptococci. *J Bacteriol.* 175, 819-825.
 26. **Archibald, F.S. and I. Fridovich.** (1981) Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J Bacteriol.* 146, 928-936.
 27. **Archibald, F.** (1986) Manganese: its acquisition by and function in the lactic acid bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 13, 63-109.
 28. **Zitzelsberger, W., F. Gotz, and K.H. Schleifer.** (1984) Distribution of superoxide dismutases, oxidases, and NADH peroxidases in various streptococci. *FEMS Microbiol Lett.* 21, 243-246.
 29. **Poyart, C., G. Quesne, S. Coulon, P. Berche, and P. Trieu-Cuot.** (1998) Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J Clin Microbiol.* 36, 41-47.
 30. **Mahan, M.J., J.M. Slauch, and J.J. Mekalanos.** (1993) Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science.* 259, 686-688.

31. **Litwin, C.M. and S.B. Calderwood.** (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev.* 6, 137-149.
32. **Mekalanos, J.J.** (1992) Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol.* 174, 1-7.
33. **Smith, H.E., H. Buijs, R.R. de Vries, H.J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, and M.A. Smits.** (2001) Environmentally regulated genes of *Streptococcus suis*: identification by the use of iron-restricted conditions *in vitro* and by experimental infection of piglets. *Microbiology.* 147, 271-280.
34. **Sambrook, J. and M.J. Gething.** (1989) Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature.* 342, 224-225.
35. **Blum, H., H. Beier, and H.J. Gross.** (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 8, 93-99.
36. **Eichenbaum, Z., E. Muller, S.A. Morse, and J.R. Scott.** (1996) Acquisition of iron from host proteins by the group A streptococcus. *Infect Immun.* 64, 5428-5429.
37. **Tai, S.S., C.J. Lee, and R.E. Winter.** (1993) Hemin utilization is related to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 61, 5401-5405.

38. **Arnold, R.R., J.E. Russell, W.J. Champion, M. Brewer, and J.J. Gauthier.** (1982) Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infect Immun.* 35, 792-799.
39. **Martin, M.E., R.C. Strachan, H. Aranha, S.L. Evans, M.L. Salin, B. Welch, J.E. Arceneaux, and B.R. Byers.** (1984) Oxygen toxicity in *Streptococcus mutans*: manganese, iron, and superoxide dismutase. *J Bacteriol.* 159, 745-749.
40. **Griffiths, B.B. and O. McClain.** (1988) The role of iron in the growth and hemolysin (streptolysin S) production in *Streptococcus pyogenes*. *J Basic Microbiol.* 28, 427-436.
41. **von Hunolstein, C., M.L. Ricci, P. Valenti, and G. Orefici.** (1992) Lack of activity of transferrins towards *Streptococcus* spp. *Med Microbiol Immunol.* 181, 351-357.
42. **Eichenbaum, Z., B.D. Green, and J.R. Scott.** (1996) Iron starvation causes release from the group A streptococcus of the ADP-ribosylating protein called plasmin receptor or surface glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase. *Infect Immun.* 64, 1956-1960.
43. **Niven, D.F. and A. Ekins.** (2001) Iron content of *Streptococcus suis* and evidence for a *dpr* homologue. *Can J Microbiol.* 47, 412-416.

44. **Jakubovics, N.S., A.W. Smith, and H.F. Jenkinson.** (2000) Expression of the virulence-related *Sca* (Mn²⁺) permease in *Streptococcus gordonii* is regulated by a diphtheria toxin metallopressor-like protein ScaR. *Mol Microbiol.* 38, 140-153.
45. **Gibson, C.M. and M.G. Caparon.** (1996) Insertional inactivation of *Streptococcus pyogenes sod* suggests that *prtF* is regulated in response to a superoxide signal. *J Bacteriol.* 178, 4688-4695.
46. **Yesilkaya, H., A. Kadioglu, N. Gingles, J.E. Alexander, T.J. Mitchell, and P.W. Andrew.** (2000) Role of manganese-containing superoxide dismutase in oxidative stress and virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 68, 2819-2826.
47. **Langford, P., A.E. Williams, and J.S. Kroll.** (1991) Superoxide dismutases of pathogenic and non-pathogenic *Streptococcus suis* type 2 isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 61, 347-350.
48. **Krachler, M., E. Rossipal, and D. Micetic-Turk.** (1999) Concentrations of trace elements in sera of newborns, young infants, and adults. *Biol Trace Elem Res.* 68, 121-135.
49. **Hao, Z., S. Chen, and D.B. Wilson.** (1999) Cloning, expression, and characterization of cadmium and manganese uptake genes from *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol.* 65, 4746-4752.

50. **Pancholi, V. and V.A. Fischetti.** (1998) alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J Biol Chem.* 273, 14503-14515.
51. **Quessy, S., J.D. Dubreuil, M. Caya, and R. Higgins.** (1995) Discrimination of virulent and avirulent *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates from different geographical origins. *Infect Immun.* 63, 1975-1979.
52. **Novak, R., A. Cauwels, E. Charpentier, and E. Tuomanen.** (1999) Identification of a *Streptococcus pneumoniae* gene locus encoding proteins of an ABC phosphate transporter and a two-component regulatory system. *J Bacteriol.* 181, 1126-1133.
53. **Novak, R., J.S. Braun, E. Charpentier, and E. Tuomanen.** (1998) Penicillin tolerance genes of *Streptococcus pneumoniae*: the ABC-type manganese permease complex Psa. *Mol Microbiol.* 29, 1285-1296.
54. **Torriani-Gorini, M., E. Yagil, and S. Silver.** (1994) *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*, A. PRESS, American Society for Microbiology.
55. **Daigle, F., J.M. Fairbrother, and J. Harel.** (1995) Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an

Escherichia coli strain causing septicemia in pigs. Infect Immun. 63, 4924-4927.

56. **Srinivasa Rao, P.S., T.M. Lim, and K.Y. Leung.** (2003) Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis. Infect Immun. 71, 1343-1351.

LEGENDS

FIG. 1. Growth of virulent versus avirulent *S. suis* serotype 2 strains from North-America and Europe in different environmental conditions. Bacteria were grown to early stationary phase ($t = 5-6$ h) in the media described in the text. The 5 conditions tested are indicated below. CM, control medium; EDDA, iron-restricted; CTM, Mn-depleted; CTM+Mn, Mn-depleted supplemented with Mn; CTM+Fe+Mn, Mn-depleted supplemented with Fe and Mn. Cell growth was monitored by measuring OD₆₆₀. Data represent the means and standard errors obtained from at least two independent experiments.

FIG. 2. Comparison of cell-envelope protein profiles and immunoblotting of *S. suis* 89-999 grown in various environmental conditions. (A) Coomassie brilliant blue-stained 12% polyacrylamide gel. Lane 1, *S. suis* cell-envelope extract from culture in Mn-limited condition; lane 2, *S. suis* cell-envelope extract from culture in Fe-restricted condition; lane 3, *S. suis* cell-envelope extract from control culture. (B) Western blot analysis of the equivalent protein samples described for panel A using serum from a convalescent pig experimentally infected with *S. suis* 89-999. Positions of molecular mass markers are shown (in kilodaltons) on the left of panel A. The 38-kDa Mn-regulated protein is indicated with a large arrow.

FIG. 3. Two-dimensional (2D) separation of *S. suis* 89-999 cell-envelope extracts from Mn-deplete (A) or Mn-replete (B) cultures. The proteins were resolved by isoelectric focusing (pI 4 to 7) for the first dimension and by differential M_w for the second dimension of 2D-PAGE. Circles and squares mark silver-stained spots with increased and decreased expression in the Mn-limited condition, respectively, compared to the control condition. The pH scales are given at the top, and the molecular sizes (kDa) are indicated on the right of each panel.

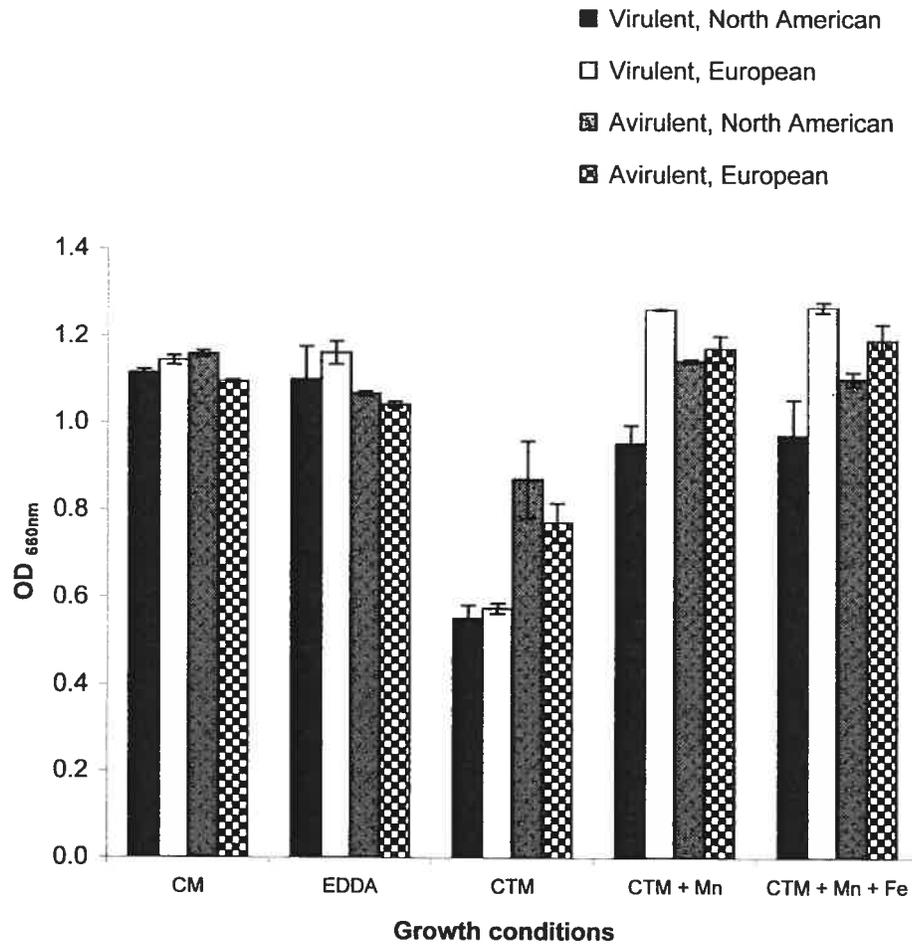


Figure 1

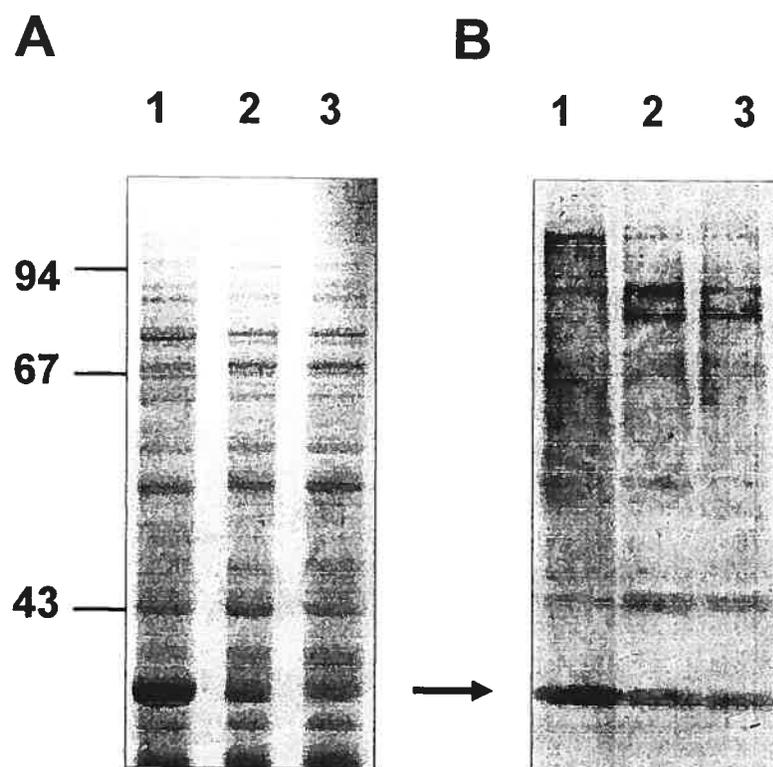


Figure 2

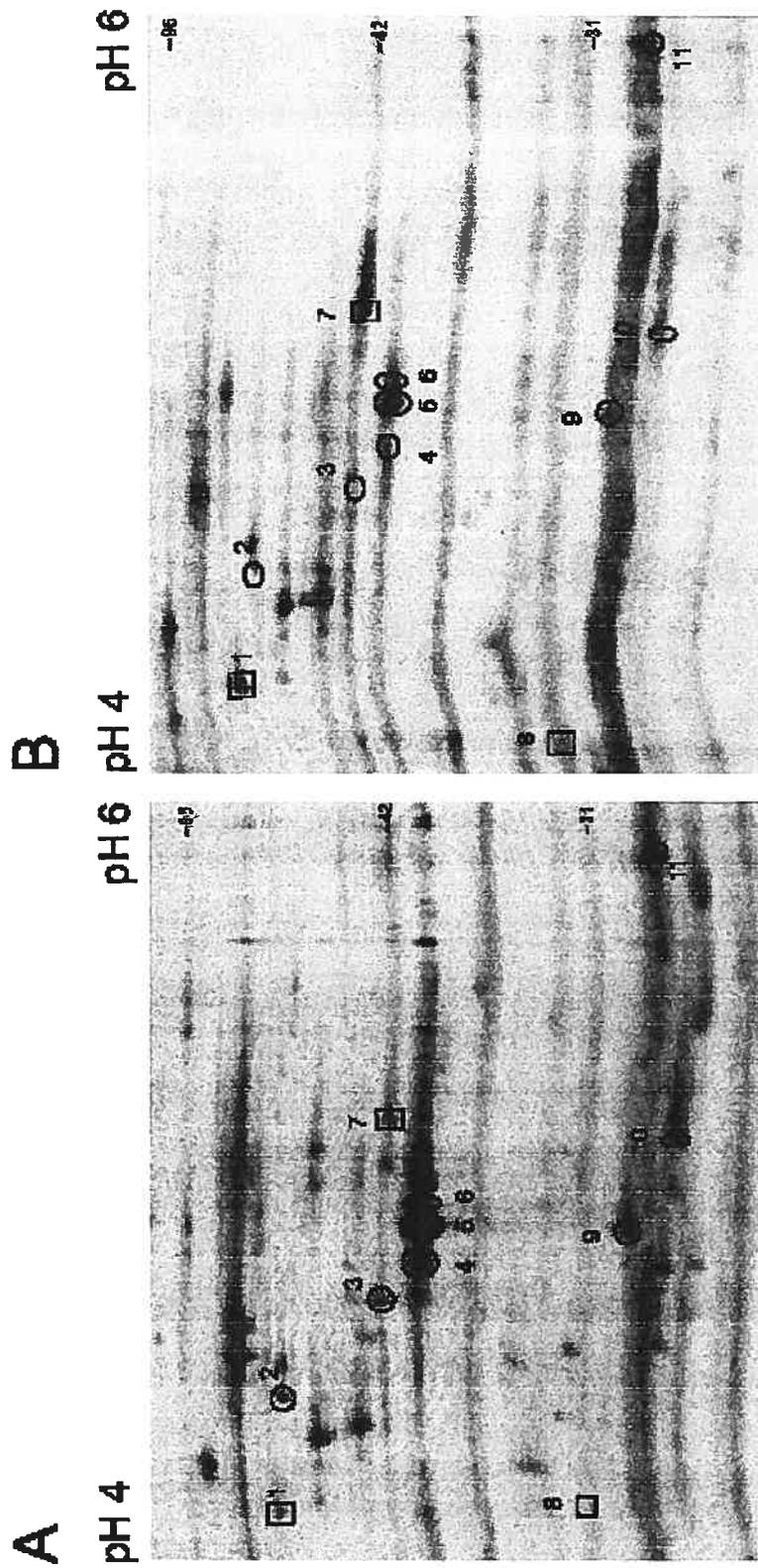


Figure 3

DISCUSSION

La méningite est l'une des pathologies les plus communes causées par *S. suis*. Les connaissances sur les facteurs de virulence ainsi que sur la pathogénie de l'infection restent limitées. Cependant, une étude a montré que *S. suis* sérotype 2 était capable de survivre plusieurs jours dans la circulation sanguine des animaux malades, environnement habituellement peu propice à la prolifération bactérienne, avant de se rendre au système nerveux central du porc (Berthelot-Herault *et al.*, 2001). Pour supporter leur croissance et leur multiplication, les germes virulents doivent être capables, entre autres, de satisfaire leurs besoins nutritionnels spécifiques. Parmi ceux-ci, on compte les besoins en fer (Fe) et en manganèse (Mn), deux métaux qui participent à une panoplie de réactions chimiques vitales pour la cellule. Pourtant, leur concentration (libre) dans le sang semble incompatible avec la croissance de la plupart des microorganismes.

L'étude des facteurs de virulence de *S. suis* est habituellement effectuée dans des conditions optimales de croissance qui ne reflètent pas les conditions *in vivo*. Des résultats préliminaires indiquent que la croissance de la souche de référence de *S. suis* sérotype 2 nécessite du Mn mais pas de Fe (Niven *et al.*, 1999). Le but de cette étude était donc de déterminer si l'habileté de *S. suis* à pousser dans des conditions non-optimales en Fe et Mn est reliée à la virulence, au phénotype (marqueurs de virulence) ou encore à l'origine géographique des souches. Des isolats pathogènes et non-pathogènes de *S. suis* sérotype 2, provenant d'Amérique du Nord et d'Europe ont été sélectionnés pour l'étude. Pour l'étude de la croissance de *S. suis*, *A. suis* a été choisi comme contrôle positif puisqu'il a besoin de fer pour sa croissance et n'est nullement affecté par une faible concentration de manganèse.

Toutes les souches testées, aussi bien virulentes que non-virulentes, ont été capables de pousser relativement bien dans un milieu traité à l'EDDA

dans lequel on ne retrouve aucune trace de fer disponible pour supporter la croissance bactérienne (Niven *et al.*, 1999). Par contre, *A. suis* a été incapable de pousser dans ce même milieu (Annexe, Fig.1), démontrant clairement la non-susceptibilité de *S. suis* à la non-disponibilité de fer. Il faut quand même noter que le taux de croissance des souches testées est affecté par la présence d'EDDA dans le milieu de culture ; la croissance est effectivement ralentie (taux de croissance), mais la croissance finale nette est la même que dans le milieu contrôle. Contrairement à *S. suis*, pour d'autres streptocoques, incluant *Streptococcus pyogenes* et *Streptococcus pneumoniae*, on rapporte un besoin absolu de fer (Eichenbaum *et al.*, 1996). Les besoins faibles voire nulles en fer pourraient représenter un avantage non négligeable pour la bactérie *in vivo* puisque contrairement aux autres microorganismes, elle ne serait pas confrontée aux conditions limitantes en fer imposées par l'hôte, et pourrait coloniser plus facilement les muqueuses, envahir les tissus et la circulation sanguine.

Les souches de *S. suis* sérotype 2 isolées au Canada présentent un profil différent des souches européennes quant à la production de certains facteurs ou marqueurs de virulence, tels que les protéines MRP et EF, ainsi que la suilysine. En effet, la plupart des souches virulentes isolées en Europe sont reconnues comme possédant ces trois facteurs, tandis qu'au Canada une minorité d'entre elles présente ce profil de virulence (Gottschalk *et al.*, 1998; Quessy *et al.*, 1995). Dans notre étude, le phénotype (Annexe, Tableau I) et l'origine géographique des souches n'ont nullement influencé la capacité de *S. suis* à pousser dans le milieu dépourvu de fer. En effet, aussi bien les souches pathogènes et non-pathogènes en provenance d'Europe et d'Amérique du Nord ont été aptes à pousser en présence d'EDDA. Cet avantage que possède *S. suis* à pousser dans des conditions restreintes en fer ne semble donc pas relié à la virulence ni au phénotype. La production d'une hémolysine par certaines bactéries, tels que les streptocoques du Groupe A (GAS), procure un avantage notable aux pathogènes pour capturer le fer de l'hôte (hème, hémoglobine) en lysant les cellules. La souche

européenne 31533 incluse dans notre étude produit la suilysine, mais ne semble pas plus avantageée que les autres souches suilysine négatives pour pousser dans un environnement restreint en fer. Il serait bon d'observer les résultats en présence de globules rouges.

Dans un deuxième temps, il s'agissait d'observer l'effet de cette condition restreinte en fer sur l'expression de protéines membranaires chez *S. suis*. En plus des protéines impliquées dans le métabolisme du fer, d'autres protéines comme des toxines sont régulées par la disponibilité de fer. On pense notamment à l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa*, l'hémolysine de *Serratia marcescens* et à la toxine diphthérique de *Corynebacterium diphtheriae* dont la synthèse est augmentée lorsqu'elles poussent dans des conditions limitantes en fer (Pappenheimer, 1977; Bjorn *et al.*, 1978). La production d'autres substances extracellulaires, comme l'alkaline protéase et l'élastase (enzymes hydrolytiques qui clivent la laminine), est réduite lorsque *P. aeruginosa* pousse dans un milieu enrichi en fer (Bjorn *et al.*, 1978). Dans notre étude, chez les souches virulentes et non-virulentes, les profils des protéines membranaires séparées par gel d'électrophorèse en une dimension sont identiques pour les bactéries cultivées dans le milieu contrôle et dans le milieu fortement restreint en fer. Chez d'autres bactéries par contre, comme *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, le profil protéique pour les composantes de la surface cellulaire est différent lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions très pauvres en fer. Elles expriment des protéines nouvelles, entre autres, un récepteur de 42 kDa spécifique pour la Tf humaine qui possède aussi une activité GAPDH (Modun *et al.*, 1994; Modun and Williams, 1999). Ce récepteur est capable de lier la plasmine humaine, de la même manière que la GAPDH associée à la paroi des GAS. Cette propriété permettrait l'invasion des tissus par les agresseurs puisque la plasmine clive les protéines de la matrice extracellulaire des cellules-hôtes et dissout les caillots sanguins (Lottenberg *et al.*, 1994). Une étude menée par Courcol *et al.* (1997) décrit la production par *S. aureus* de cinq protéines de surface principalement induites

en absence de fer. Parmi ces protéines, deux en particulier semblent immunogènes; elles réagissent fortement avec le sérum de patients convalescents à une infection staphylococcique tandis que le sérum provenant de patients sains ne les reconnaît pas.

Malgré le fait que nos résultats ne mettent pas en évidence une expression différentielle des protéines membranaires lorsque *S. suis* fait face à des conditions limitantes en fer, Smith et al. (2001) ont décrit récemment chez *S. suis* des gènes régulés par l'environnement en utilisant des conditions pauvres en fer (*in vitro*) et l'infection expérimentale de porcelets (Smith et al., 2001). Dix-huit gènes sont induits chez *S. suis in vitro* (« *iri* ») tandis que vingt-deux gènes sont induits *in vivo* (« *ivs* »). Quatre gènes « *ivs* » étaient identiques à 4 gènes « *iri* », suggérant que le fer pourrait réguler des facteurs de virulence *in vivo*. Si l'on tient compte de ces résultats, on devrait s'attendre à observer des différences d'expression protéique lorsque *S. suis* se retrouve dans un environnement restreint en fer. Cependant, Smith et al. n'ont pas démontré la présence des protéines fonctionnelles codées par ces gènes. Il serait tout de même intéressant de vérifier l'expression différentielle des protéines membranaires de *S. suis* en les séparant par gel d'électrophorèse en deux dimensions.

Hormis l'avantage d'être non susceptibles à la restriction de fer imposée par l'hôte, les bactéries capables de se passer du fer minimisent aussi les effets néfastes du stress oxydatif auquel elles sont sujettes en présence d'oxygène. Le fer intracellulaire prend part effectivement à la réaction de Fenton en réduisant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour produire des radicaux hydroxyls fortement réactifs. Lorsque les microorganismes sont capables de se dispenser de Fe, ils affichent la plupart du temps une exigence en Mn. Spatafora et Moore (1998) ont montré que Mn^{2+} pouvait supporter la croissance de *Streptococcus mutans* en absence de Fe^{2+}/Fe^{3+} . Ceci est valable aussi pour *S. suis* (Niven et al., 1999) et *Streptococcus gordonii* (Jakubovics et al., 2000). Une croissance a été observée dans des conditions appauvries en Mn pour toutes les souches

testées dans notre étude, incluant les souches virulentes versus non-virulentes, Européennes versus Nord-Américaines. Par contre, les souches virulentes semblaient plus affectées que les souches non-virulentes dans le milieu limitant en Mn ; tandis que la croissance de *A. suis* dans le milieu traité au chelex était similaire à la croissance dans le milieu non traité. Les tests préliminaires de compte viable suggèrent que la « pénurie » de Mn pourrait affecter directement la viabilité de *S. suis*. Les concentrations bactériennes à la fois dans la culture contrôle et dans le milieu supplémenté de Mn sont semblables après 5.5 h d'incubation tandis que dix fois moins de bactéries sont dénombrées dans le milieu appauvri en Mn. L'effet du traitement ne semble donc pas être le même chez une souche virulente versus une souche non-virulente. Les différences observées entre la croissance dans le milieu contrôle et le milieu traité au chelex sont statistiquement significatives. Une croissance optimale n'est possible dans le milieu traité au chelex que lorsque celui-ci est supplémenté de MnSO_4 avant inoculation. Une fois de plus, le fer ne semble pas faire de différence dans la croissance puisque l'addition de FeSO_4 en plus du MnSO_4 n'améliore pas plus la croissance. Ces résultats s'appliquent aussi bien pour les souches d'origine européenne que Nord-Américaine. L'habileté de *S. suis* à pousser dans des conditions limitantes en Mn est donc indépendante du phénotype mais pourrait être reliée à la virulence. Ceci reste cependant à confirmer en étudiant un nombre plus élevé de souches.

Pour se débarrasser du radical superoxyde (O_2^-) produit par toute cellule en contact avec l'oxygène, tous les streptocoques incluant *S. suis* produisent une SOD ayant pour cofacteur le Mn (Niven *et al.*, 1999; Zitzelsberger *et al.*, 1984). Chez les bactéries lactiques, c'est l'accumulation de quantités importantes de Mn qui joue le « rôle » d'antioxydant. Une inactivation du gène *sodA* (MnSOD) chez *S. pyogenes* par exemple, sensibilise les cellules à l'action toxique de O_2^- alors que chez *S. pneumoniae*, la virulence est réduite dans un modèle murin d'infection intranasale. Il semble donc exister une certaine corrélation entre

l'homéostasie du Mn, le stress oxydatif et la virulence bactérienne. Pour expliquer la croissance des souches non-virulentes dans le milieu traité au chelex, il est possible d'imaginer que ces souches ne possédant pas les éléments essentiels pour initier une infection, soient rapidement éliminées avant même d'être mises en contact avec un environnement déficient en Mn. Les souches virulentes, par contre, ayant été exposées au stimulus se sont probablement adaptées.

L'habileté à utiliser le Mn, pour remplacer ou compléter le fer, peut être un avantage non négligeable pour *S. suis* et d'autres bactéries pathogènes, à la seule condition d'avoir ce qu'il faut pour se le procurer. L'activité des perméases bactériennes qui transportent le Mn, telle que Sca chez *S. gordonii*, doit donc être vitale pour l'acquisition du métal des tissus de l'hôte. La production de ScaA est beaucoup plus importante chez les cellules cultivées dans des conditions pauvres en Mn^{2+} comme celles retrouvées dans le sérum où la majorité du Mn^{2+} disponible est complexé à l'albumine et à la transferrine (Harris and Chen, 1994; Davidsson *et al.*, 1989) et où le taux tourne autour de 20 nM (Krachler *et al.*, 1999). Les mêmes effets sont observés en présence de salive et de sérum (Jakubovics *et al.*, 2000). Ceci suggère que des composantes contenues dans la salive et le sérum séquestrent le Mn^{2+} et par le fait même réduisent la concentration de Mn^{2+} disponible pour les bactéries. Les concentrations de Mn pourraient donc influencer l'expression de protéines de surface pertinentes pour la virulence de *S. suis*.

L'effet du Mn a déjà été étudié chez *Streptococcus mutans* (Spatafora and Moore, 1998). Cette étude rapporte un effet unique du Mn sur l'expression protéique de *S. mutans*. A l'aide de gels d'électrophorèse en une et deux dimensions, l'effet d'une faible concentration de Mn sur les profils protéiques de l'isolat pathogène de *S. suis* d'origine Nord-Américaine (999) a été étudié. Nos résultats indiquent que des concentrations réduites en Mn provoquent la régulation positive et négative de certaines protéines attachées à la paroi. L'analyse de plusieurs spots induits (milieu CTM) situés dans la

région de 38 kDa a permis d'identifier une protéine régulée positivement dans des conditions limitantes en Mn, ayant une homologie de séquence avec PstC, composante transmembranaire d'un transporteur de phosphate de type ABC. La présence de nombreuses protéines difficiles à associer les unes aux autres dans les extraits provenant du milieu contrôle et ceux du milieu appauvri en Mn peut être le signe de la présence de protéines nouvelles induites lorsque les conditions se font limitantes en Mn ; mais elle peut aussi découler d'un défaut de la technique utilisée pour extraire les protéines de surface de *S. suis* (sonication et séparation des fractions solubles et membranaires). Par conséquent, des études supplémentaires seraient nécessaires pour clarifier ce point. Il aurait été intéressant de vérifier si les autres souches retenues pour l'étude présentaient un profil 2-D semblable et d'identifier un plus grand nombre de spots, mais nos efforts n'ont jusque là pas aboutit.

Un test d'immunoblot 1-D avec des sérum de porcs convalescents infectés expérimentalement avec *S. suis* suggèrent que la bande de 38 kDa est exprimée *in vivo* et immunogène. Mais il est impossible de pointer une seule protéine immunogène car comme révélé par 2-D SDS PAGE, plusieurs protéines de 38 kDa semblent former un « amoncellement » indissociable lorsque la séparation se fait en une seule dimension. Il serait donc intéressant, voire important, d'effectuer des immunoblots 2-D pour déterminer laquelle ou lesquelles des protéines de 38 kDa est reconnue par les anticorps de porcs.

Le système Pst, codé par l'opéron *pst-phoU*, est présent chez de nombreuses bactéries, comme *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* et *S. pneumoniae*. Il est habituellement régulé par les conditions limitantes en phosphate. Il se compose des protéines transmembranaires PstC et PstA, d'une protéine liant l'ATP, PstB, d'un récepteur liant le phosphate, PstS et enfin de la protéine PhoU pour laquelle on ne connaît pas de rôle. Daigle et al. rapportent qu'une mutation dans le gène *pstC* chez *E. coli* réduit la pathogénicité et la résistance au sérum de la souche, la rendant incapable de

causer une septicémie chez le porc (Daigle *et al.*, 1995). Les auteurs suggèrent que cette mutation pourrait avoir un effet direct sur la virulence par une fonction encore inconnue du transporteur de phosphate, ou encore qu'elle affecte indirectement la virulence en régulant d'autres gènes non reliés au régulon Pho (ce dernier regroupe l'opéron *pst-phoU*). Il est donc possible que ce système codé par *pst-phoU* soit impliqué directement ou indirectement dans la pathogénicité de cette souche septicémique d'*E. coli* (Daigle *et al.*, 1995). Dans le même ordre d'idée, Srinivasa *et al.* (2003) identifient des mutants très atténués d'une souche pathogène d'*Edwardsiella tarda* possédant une mutation dans l'opéron *pst*. À la lumière de ces données, il semblerait que Pst joue un rôle dans la virulence des bactéries.

En plus de transporter du phosphate, le système Pst chez les bactéries semble impliqué dans le contrôle de gènes groupés sous le régulon *pho* et régulés de façon coordonnée. Le système Pst chez *S. pneumoniae* est comparable à celui de *E. coli* sauf qu'il semble avoir un rôle plus complexe dans la physiologie des pneumocoques (Novak *et al.*, 1999). En fait, il fait partie d'un système de signalisation indépendant de l'assimilation du phosphate, qui affecte indirectement l'adhésion, la transformation et la virulence de *S. pneumoniae* (Novak *et al.*, 1998). Le transport de Mn ne contribuerait que partiellement à cette signalisation. La transduction de signaux par les microorganismes pathogènes interagissant avec les cellules-hôtes, pourrait jouer un rôle majeur dans la pathogenèse des infections streptococciques. Dans le cas de *S. suis*, la production de PstC (composante du système Pst) est accrue dans des conditions limitantes en Mn, qui est vraisemblablement une forme de stress pour la bactérie. Nous pensons qu'en interférant dans la transduction de signaux, PstC aiderait *S. suis* à s'adapter au stress. S'il existe une trace du gène *pstC* dans le génome de *S. suis*, une possibilité intéressante serait d'amplifier et de séquencer un fragment du gène correspondant chez *S. suis* 89-999 puis de réaliser un RT-PCR avec l'ARN isolé de la souche cultivée dans des conditions normales et dans des conditions limitantes en Mn. Aussi, en déterminant la virulence d'un mutant

pstC de *S. suis*, nous pourrions mieux saisir le rôle du système Pst dans la pathogénie de l'infection à *S. suis*.

Un dernier point important fait appel aux rôles du Mn comme antioxydant qui, en s'associant à des anions, incluant le phosphate, et à des intermédiaires métaboliques (malate, lactate) permet de détoxifier l'oxygène réactionnel produit pendant le métabolisme aérobie. Le mécanisme par lequel le Mn protège les bactéries du stress oxydatif est encore peu compris (Jakubovics and Jenkinson, 2001). Horsburgh et al. (2002) proposent que l'utilisation de tels complexes par les bactéries, fournit un taux basal de protection contre les ROS, tout en augmentant la survie ("fitness") de la cellule en économisant l'énergie habituellement dépensée pour la synthèse du régulon de défense. On peut facilement spéculer que la diminution de la viabilité et de la croissance observée chez *S. suis* dans l'environnement appauvri en Mn est due à une protection défaillante contre les ROS. En effet, l'accumulation de Mn semble très importante pour se protéger du peroxyde et/ou du superoxyde chez différentes espèces de bactéries ; sans ignorer le fait que la SOD chez *S. suis* fonctionne avec le Mn pour cofacteur. En assumant que des conditions limitantes en Mn constituent une source de stress pour *S. suis*, une expression accrue de PstC, en permettant l'assimilation du phosphate environnemental accompagnée d'une catalyse de la détoxification des ROS avec une consommation minimale d'énergie, pourrait aider *S. suis* à combattre le stress et à survivre.

CONCLUSION

Nos expériences ont permis de confirmer que *S. suis* est indifférent à la restriction du fer indépendamment de la virulence ou de son origine géographique. Nous avons aussi démontré le besoin en Mn de *S. suis*, quelque soit l'origine géographique ou le phénotype, mais notre étude a permis de mettre en évidence un besoin en Mn plus significatif chez des isolats pathogènes de *S. suis* sérotype 2.

Les résultats obtenus durant ce projet tendent à démontrer que les conditions limitantes en Mn retrouvées dans l'hôte peuvent constituer une source de stress pour *S. suis in vivo* et entraîner l'expression de protéines potentiellement impliquées (directement ou indirectement) dans la pathogénie. Il serait intéressant d'identifier plus de protéines dont l'expression est altérée dans des conditions limitantes en Mn.

Puisque les conditions *in vitro* pourraient ne pas refléter complètement les circonstances retrouvées *in vivo* et que les concentrations de fer et de manganèse ne sont pas les seuls joueurs, il serait utile à l'avenir de faire la comparaison des profils protéiques *in vitro-in vivo* de *S. suis* dans des chambres péritonéales.

Références

Allen, A.G., Bolitho, S., Lindsay, H., Khan, S., Bryant, C., Norton, P.M., Ward, P.A., Leigh, J.A., Morgan, J., Riches, H., Eastty, S. and Maskell, D. (2001). Generation and characterization of a defined mutant of *Streptococcus suis* lacking suilysin. *Infect Immun* 69: 2732-2735.

Al-Maghrebi, M., Fridovich, I. and Benov, L. (2002). Manganese supplementation relieves the phenotypic deficits seen in superoxide-dismutase-null *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 402: 104-109.

Andersen, R.N., Ganeshkumar, N. and Kolenbrander, P.E. (1993). Cloning of the *Streptococcus gordonii* PK488 gene, encoding an adhesin which mediates coaggregation with *Actinomyces naeslundii* PK606. *Infect Immun* 61: 981-987.

Archibald, F. (1983). *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiol Lett* 19: 29-32.

Archibald, F. (1986). Manganese: its acquisition by and function in the lactic acid bacteria. *Crit Rev Microbiol* 13: 63-109.

Arnold, R.R., Russell, J.E., Champion, W.J., Brewer, M. and Gauthier, J.J. (1982). Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infect Immun* 35: 792-799.

Atkinson, P.G. and Barton, C.H. (1998). Ectopic expression of natural resistance-associated macrophage protein-1 in COS-1 cells modulates iron accumulation. *Biochem Soc Trans* 26: S199.

Auling, G., Thaler, M. and Diekmann, H. (1980). Parameters of unbalanced growth and reversible inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 induced by depletion of Mn²⁺.

Inhibitor studies on the reversibility of deoxyribonucleic acid synthesis. *Arch Microbiol* 127: 105-114.

Bartsevich, V.V. and Pakrasi, H.B. (1995). Molecular identification of an ABC transporter complex for manganese: analysis of a cyanobacterial mutant strain impaired in the photosynthetic oxygen evolution process. *Embo J* 14: 1845-1853.

Bauer, P.D., Trapp, C., Drake, D., Taylor, K.G. and Doyle, R.J. (1993). Acquisition of manganous ions by mutans group streptococci. *J Bacteriol* 175: 819-825.

Benkirane, R., Gottschalk, M.G. and Dubreuil, J.D. (1997). Identification of a *Streptococcus suis* 60-kDa heat-shock protein using western blotting. *FEMS Microbiol Lett* 153: 379-385.

Berry, A.M. and Paton, J.C. (1996). Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 64: 5255-5262.

Berthelot-Herault, F., Cariolet, R., Labbe, A., Gottschalk, M., Cardinal, J.Y. and Kobisch, M. (2001). Experimental infection of specific pathogen free piglets with French strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res* 65: 196-200.

Berthelot-Herault, F., Gottschalk, M., Labbe, A., Cariolet, R. and Kobisch, M. (2001). Experimental airborne transmission of *Streptococcus suis* capsular type 2 in pigs. *Vet Microbiol* 82: 69-80.

Berthelot-Hérault, F., Morvan, H., Kéribin, A., Gottschalk, M. and Kobisch, M. (2000). Production of Muramidase-Released Protein (MRP), Extracellular Factor (EF) and Suilysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. *Vet Res* 31: 473-479.

Bjorn, M.J., Iglewski, B.H., Ives, S.K., Sadoff, J.C. and Vasil, M.L. (1978). Effect of iron on yields of exotoxin A in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PA-103. *Infect Immun* 19: 785-791.

Blackwell, J.M., Searle, S., Goswami, T. and Miller, E.N. (2000). Understanding the multiple functions of Nramp1. *Microbes Infect* 2: 317-321.

Boyer, E., Bergevin, I., Malo, D., Gros, P. and Cellier, M.F. (2002). Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 70: 6032-6042.

Brassard, J., Gottschalk, M. and Quessy, S. (2001). Decrease of the adhesion of *Streptococcus suis* serotype 2 mutants to embryonic bovine tracheal cells and porcine tracheal rings. *Can J Vet Res* 65: 156-160.

Brazeau, C., Gottschalk, M., Vincelette, S. and Martineau-Doize, B. (1996). In vitro phagocytosis and survival of *Streptococcus suis* capsular type 2 inside murine macrophages. *Microbiology* 142: 1231-1237.

Brousseau, R., Hill, J.E., Prefontaine, G., Goh, S.H., Harel, J. and Hemmingsen, S.M. (2001). *Streptococcus suis* serotypes characterized by analysis of chaperonin 60 gene sequences. *Appl Environ Microbiol* 67: 4828-4833.

Brown, M.R. and Williams, P. (1985). The influence of environment on envelope properties affecting survival of bacteria in infections. *Annu Rev Microbiol* 39: 527-556.

Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P. and Helmann, J.D. (1998). *Bacillus subtilis* contains multiple *Fur* homologues: identification of the iron uptake (*Fur*) and peroxide regulon (*PerR*) repressors. *Mol Microbiol* 29: 189-198.

Bullen, J.J. (1981). The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis* 3: 1127-1138.

Bullen, J.J., Leigh, L.C. and Rogers, H.J. (1968). The effect of iron compounds on the virulence of *Escherichia coli* for guinea-pigs. *Immunology* 15: 581-588.

Bullen, J.J., Ward, C.G. and Wallis, S.N. (1974). Virulence and the role of iron in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Infect Immun* 10: 443-450.

Bullen, J.J., Wilson, A.B., Cushnie, G.H. and Rogers, H.J. (1968). The abolition of the protective effect of *Pasteurella septica* antiserum by iron compounds. *Immunology* 14: 889-898.

Burnette-Curley, D., Wells, V., Viscount, H., Munro, C.L., Fenno, J.C., Fives-Taylor, P. and Macrina, F.L. (1995). FimA, a major virulence factor associated with *Streptococcus parasanguis* endocarditis. *Infect Immun* 63: 4669-4674.

Cain, D., Malouin, F., Dargis, M., Harel, J. and Gottschalk, M. (1995). Alterations in penicillin-binding proteins in strains of *Streptococcus suis* possessing moderate and high levels of resistance to penicillin. *FEMS Microbiol Lett* 130: 121-127.

Cantin, M., Harel, J., Higgins, R. and Gottschalk, M. (1992). Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of *Streptococcus suis* isolates. *J Vet Diagn Invest* 4: 170-174.

Cellier, M., Belouchi, A. and Gros, P. (1996). Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of Nramp. *Trends Genet* 12: 201-204.

Cellier, M., Govoni, G., Vidal, S., Kwan, T., Groulx, N., Liu, J., Sanchez, F., Skamene, E., Schurr, E. and Gros, P. (1994). Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J Exp Med* 180: 1741-1752.

Cellier, M.F., Bergevin, I., Boyer, E. and Richer, E. (2001). Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters. *Trends Genet* 17: 365-370.

Charland, N., Harel, J., Kobish, M., Lacasse, S. and Gottschalk, M. (1998). *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* 144: 325-332.

Charland, N., Kobisch, M., Martineau-Doize, B., Jacques, M. and Gottschalk, M. (1996). Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* 14: 195-203.

Charland, N., Nizet, V., Rubens, C., Kim, K.S., Lacouture, S. and Gottschalk, M. (2000). *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* 68: 637-643.

Charney, J., Fisher, W.P. and Hegarty, C.P. (1951). Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*. *J Bacteriol* 62: 145-148.

Chart, H. and Griffiths, E. (1985). Antigenic and molecular homology of the ferric enterobactin receptor protein of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 131: 1503-1509.

Chatellier, S., Gottschalk, M., Higgins, R., Brousseau, R. and Harel, J. (1999). Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. *J Clin Microbiol* 37: 362-366.

Chatellier, S., Harel, J., Zhang, Y., Gottschalk, M., Higgins, R., Devriese, L.A. and Brousseau, R. (1998). Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Int J Syst Bacteriol* 48: 581-589.

Chia, J.S., Yeh, C.Y. and Chen, J.Y. (2000). Identification of a fibronectin binding protein from *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 68: 1864-1870.

Claverys, J.P. (2001). A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Res Microbiol* 152: 231-243.

Clifton-Hadley, F.A., Alexander, T.J., Enright, M.R. and Guise, J. (1984). Monitoring herds for *Streptococcus suis* type 2 by sampling tonsils of slaughter pigs. *Vet Rec* 115: 562-564.

Courcol, R.J., Trivier, D., Bissinger, M.C., Martin, G.R. and Brown, M.R. (1997). Siderophore production by *Staphylococcus aureus* and identification of iron-regulated proteins. *Infect Immun* 65: 1944-1948.

Davidsson, L., Lonnerdal, B., Sandstrom, B., Kunz, C. and Keen, C.L. (1989). Identification of transferrin as the major plasma carrier protein for manganese introduced orally or intravenously or after *in vitro* addition in the rat. *J Nutr* 119: 1461-1464.

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

de Moor, C.E. (1963). Septicaemic infections in pigs, caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designated R, S and T. *Antonie van Leeuwenhoek* 29: 272-280.

Dee, S.A., Carlson, A.R., Winkelman, N.L. and Corey, M.M. (1993). Effect of management practices on the *Streptococcus suis* carrier rate in nursery swine. *J Am Vet Med Assoc* 203: 295-299.

Devriese, L.A. and Haesebrouck, F. (1992). *Streptococcus suis* infections in horses and cats. *Vet Rec* 130: 380.

Diarra, M.S., Lavoie, M.C., Jacques, M., Darwish, I., Dolence, E.K., Dolence, J.A., Ghosh, A., Ghosh, M., Miller, M.J. and Malouin, F. (1996). Species selectivity of new siderophore-drug conjugates that use specific iron uptake for entry into bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2610-2617.

Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C. and Claverys, J.P. (1997). Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: *Adc* and *PsaA* mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol* 25: 727-739.

Doyle, R.J. (1989). How cell walls of gram-positive bacteria interact with metal ions. *Metal ions and bacteria*. R.J.Doyle, T.J.B., New York: Wiley: 275-293.

Drake, D., Taylor, K.G. and Doyle, R.J. (1988). Expression of the glucan-binding lectin of *Streptococcus cricetus* requires manganous ion. *Infect Immun* 56: 2205-2207.

Durand, F., Perino, C.L., Recule, C., Brion, J.P., Kobish, M., Guerber, F. and Croize, J. (2001). Bacteriological diagnosis of *Streptococcus suis* meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 519-521.

Edwards, M.S., Kasper, D.L., Jennings, H.J., Baker, C.J. and 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.

Eichenbaum, Z., Green, B.D. and Scott, J.R. (1996). Iron starvation causes release from the group A streptococcus of the ADP-ribosylating protein called plasmin receptor or surface glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase. *Infect Immun* 64: 1956-1960.

Eichenbaum, Z., Muller, E., Morse, S.A. and Scott, J.R. (1996). Acquisition of iron from host proteins by the group A streptococcus. *Infect Immun* 64: 5428-5429.

Eisenstadt, E., Fisher, S., Der, C.L. and Silver, S. (1973). Manganese transport in *Bacillus subtilis* W23 during growth and sporulation. *J Bacteriol* 113: 1363-1372.

Francis, R.T., Booth, J.W. and Becker, R.R. (1985). Uptake of iron from hemoglobin and the haptoglobin-hemoglobin complex by hemolytic bacteria. *Int J Biochem* 17: 767-773.

Galina, L., Pijoan, C., Sitjar, M., Christianson, W.T., Rossow, K. and Collins, J.E. (1994). Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *Vet Rec* 134: 60-64.

Galina, L., Vecht, U., Wisselink, H.J. and Pijoan, C. (1996). Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A. based on the presence of muraminidase-released protein and extracellular factor. *Can J Vet Res* 60: 72-74.

Gerlach, D., Reichardt, W. and Vettermann, S. (1998). Extracellular superoxide dismutase from *Streptococcus pyogenes* type 12 strain is manganese-dependent. *FEMS Microbiol Lett* 160: 217-224.

Gottschalk, M., Kobisch, M. and Berthelot-Hérault, F. (2001). L'infection à *Streptococcus suis* chez le porc. Revue générale. *Journées Rech Porcine en France* 33: 269-276.

Gottschalk, M., Lebrun, A., Wisselink, H., Dubreuil, J.D., Smith, H. and Vecht, U. (1998). Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res* 62: 75-79.

Gottschalk, M., Petitbois, S., Higgins, R. and Jacques, M. (1991). Adherence of *Streptococcus suis* capsular type 2 to porcine lung sections. *Can J Vet Res* 55: 302-304.

Gottschalk, M. and Segura, M. (2000). The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* 76: 259-272.

Gottschalk, M.G., Lacouture, S. and Dubreuil, J.D. (1995). Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology* 141: 189-195.

Govoni, G., Canonne-Hergaux, F., Pfeifer, C.G., Marcus, S.L., Mills, S.D., Hackam, D.J., Grinstein, S., Malo, D., Finlay, B.B. and Gros, P. (1999). Functional expression of Nramp1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7. *Infect Immun* 67: 2225-2232.

Govoni, G. and Gros, P. (1998). Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm Res* 47: 277-284.

Griffiths, B.B. and McClain, O. (1988). The role of iron in the growth and hemolysin (streptolysin S) production in *Streptococcus pyogenes*. *J Basic Microbiol* 28: 427-436.

Griffiths, I.B., Done, S.H. and Hunt, B.W. (1991). Pneumonia in a sow due to *Streptococcus suis* type II and *Bordetella bronchiseptica*. *Vet Rec* 128: 354-355.

Gruenheid, S. and Gros, P. (2000). Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. *Curr Opin Microbiol* 3: 43-48.

Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L. and Hediger, M.A. (1997).

Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388: 482-488.

Haataja, S., Penttinen, A., Pulliainen, A.T., Tikkanen, K., Finne, J. and Papageorgiou, A.C. (2002). Expression, purification and crystallization of Dpr, a ferritin-like protein from the Gram-positive meningitis-associated bacterium *Streptococcus suis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58: 1851-1853.

Haataja, S., Tikkanen, K., Nilsson, U., Magnusson, G., Karlsson, K.A. and Finne, J. (1994). Oligosaccharide-receptor interaction of the Gal alpha 1-4Gal binding adhesin of *Streptococcus suis*. Combining site architecture and characterization of two variant adhesin specificities. *J Biol Chem* 269: 27466-27472.

Halaby, T., Hoitsma, E., Hupperts, R., Spanjaard, L., Luirink, M. and Jacobs, J. (2000). *Streptococcus suis* meningitis, a poacher's risk. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19: 943-945.

Hanski, E. and Caparon, M. (1992). Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6172-6176.

Hantke, K. (1997). Ferrous iron uptake by a magnesium transport system is toxic for *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 179: 6201-6204.

Hao, Z., Chen, S. and Wilson, D.B. (1999). Cloning, expression, and characterization of cadmium and manganese uptake genes from *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 65: 4746-4752.

Harris, W.R. and Chen, Y. (1994). Electron paramagnetic resonance and difference ultraviolet studies of Mn²⁺ binding to serum transferrin. *J Inorg Biochem* 54: 1-19.

Higgins, R. and Gottschalk, M. (1989). L'infection à *Streptococcus suis*: une zoonose méconnue. *Méd Vét Québec* 19: 161-164.

Higgins, R. and Gottschalk, M. (1999). Streptococcal diseases. *Diseases of swine*. Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L. and Taylor, D.J., Ames, Iowa State University. 563-570.

Higgins, R. and Gottschalk, M. (2001). Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 2000. *Can Vet J* 42: 223.

Higgins, R., Gottschalk, M., Boudreau, M., Lebrun, A. and Henrichsen, J. (1995). Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *J Vet Diagn Invest* 7: 405-406.

Higgins, R., Gottschalk, M., Mittal, K.R. and Beaudoin, M. (1990). *Streptococcus suis* infection in swine. A sixteen month study. *Can J Vet Res* 54: 170-173.

Higgins, R., Lagace, A., Messier, S. and Julien, L. (1997). Isolation of *Streptococcus suis* from a young wild boar. *Can Vet J* 38: 114.

Horsburgh, M.J., Clements, M.O., Crossley, H., Ingham, E. and Foster, S.J. (2001). PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 69: 3744-3754.

Horsburgh, M.J., Ingham, E. and Foster, S.J. (2001). In *Staphylococcus aureus*, Fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *J Bacteriol* 183: 468-475.

Horsburgh, M.J., Wharton, S.J., Karavolos, M. and Foster, S.J. (2002). Manganese: elemental defence for a life with oxygen. *Trends Microbiol* 10: 496-501.

Hulse, M.L., Smith, S., Chi, E.Y., Pham, A. and Rubens, C.E. (1993). Effect of type III group B streptococcal capsular polysaccharide on invasion of respiratory epithelial cells. *Infect Immun* 61: 4835-4841.

Iglesias, J.G., Trujano, M. and Xu, J. (1992). Inoculation of pigs with *Streptococcus suis* type 2 alone or in combination with pseudorabies virus. *Am J Vet Res* 53: 364-367.

Inaoka, T., Matsumura, Y. and Tsuchido, T. (1999). SodA and manganese are essential for resistance to oxidative stress in growing and sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 181: 1939-1943.

Jabado, N., Jankowski, A., Dougaparsad, S., Picard, V., Grinstein, S. and Gros, P. (2000). Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J Exp Med* 192: 1237-1248.

Jacobs, A.A., Loeffen, P.L., van den Berg, A.J. and Storm, P.K. (1994). Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* 62: 1742-1748.

Jacobs, A.A., van den Berg, A.J., Baars, J.C., Nielsen, B. and Johannsen, L.W. (1995). Production of suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*, by field isolates from diseased pigs. *Vet Rec* 137: 295-296.

Jacobs, A.A., van den Berg, A.J. and Loeffen, P.L. (1996). Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. *Vet Rec* 139: 225-228.

Jacques, M., Gottschalk, M., Foiry, B. and Higgins, R. (1990). Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* 172: 2833-2838.

Jakubovics, N.S. and Jenkinson, H.F. (2001). Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria. *Microbiology* 147: 1709-1718.

Jakubovics, N.S., Smith, A.W. and Jenkinson, H.F. (2000). Expression of the virulence-related Sca (Mn²⁺) permease in *Streptococcus gordonii* is regulated by a diphtheria toxin metalloregressor-like protein ScaR. *Mol Microbiol* 38: 140-153.

Kehres, D.G., Zaharik, M.L., Finlay, B.B. and Maguire, M.E. (2000). The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol Microbiol* 36: 1085-1100.

Kilpper-Balz, R. and Schleifer, K.H. (1987). *Streptococcus suis* sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bact* 37: 160-162.

Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N., Baker, R.A. and Jenkinson, H.F. (1998). The adhesion-associated *sca* operon in *Streptococcus gordonii* encodes an inducible high-affinity ABC transporter for Mn²⁺ uptake. *J Bacteriol* 180: 290-295.

Krachler, M., Rossipal, E. and Micetic-Turk, D. (1999). Concentrations of trace elements in sera of newborns, young infants, and adults. *Biol Trace Elem Res* 68: 121-135.

Kurl, D.N., Haataja, S. and Finne, J. (1989). Hemagglutination activities of group B, C, D, and G streptococci: demonstration of novel sugar-specific cell-binding activities in *Streptococcus suis*. *Infect Immun* 57: 384-389.

Lalonde, M., Segura, M., Lacouture, S. and Gottschalk, M. (2000). Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology* 146: 1913-1921.

Langford, P., Williams, A.E. and Kroll, J.S. (1991). Superoxide dismutases of pathogenic and non-pathogenic *Streptococcus suis* type 2 isolates. *FEMS Microbiol Lett* 61: 347-350.

Lindsay, J.A. and Riley, T.V. (1994). Staphylococcal iron requirements, siderophore production, and iron-regulated protein expression. *Infect Immun* 62: 2309-2314.

Lottenberg, R., Minning-Wenz, D. and Boyle, M.D. (1994). Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends Microbiol* 2: 20-24.

Luque, I., Tarradas, C., Astorga, R., Perea, A., Wisselink, H.J. and Vecht, U. (1999). The presence of muramidase released protein and extracellular factor protein in various serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased and healthy pigs in Spain. *Res Vet Sci* 66: 69-72.

Madsen, L.W., Bak, H., Nielsen, B., Jensen, H.E., Aalbaek, B. and Riising, H.J. (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.

Makui, H., Roig, E., Cole, S.T., Helmann, J.D., Gros, P. and Cellier, M.F. (2000). Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol Microbiol* 35: 1065-1078.

Marie, J., Morvan, H., Berthelot-Herault, F., Sanders, P., Kempf, I., Gautier-Bouchardon, A.V., Jouy, E. and Kobisch, M. (2002). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from swine in France and from humans in different countries between 1996 and 2000. *J Antimicrob Chemother* 50: 201-209.

Marra, A., Lawson, S., Asundi, J.S., Brigham, D. and Hromockyj, A.E. (2002). *In vivo* characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection. *Microbiology* 148: 1483-1491.

Martin, M.E., Byers, B.R., Olson, M.O., Salin, M.L., Arceneaux, J.E. and Tolbert, C. (1986). A *Streptococcus mutans* superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor. *J Biol Chem* 261: 9361-9367.

Martinez, J.L., Delgado-Iribarren, A. and Baquero, F. (1990). Mechanisms of iron acquisition and bacterial virulence. *FEMS Microbiol Rev* 6: 45-56.

Mazmanian, S.K., Liu, G., Jensen, E.R., Lenoy, E. and Schneewind, O. (2000). *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5510-5515.

Mazmanian, S.K., Ton-That, H., Su, K. and Schneewind, O. (2002). An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2293-2298.

Mclver, K.S., Heath, A.S. and Scott, J.R. (1995). Regulation of virulence by environmental signals in group A streptococci: influence of osmolarity, temperature, gas exchange, and iron limitation on emm transcription. *Infect Immun* 63: 4540-4542.

Michel, K.P., Thole, H.H. and Pistorius, E.K. (1996). IdiA, a 34 kDa protein in the cyanobacteria *Synechococcus sp.* strains PCC 6301 and PCC 7942, is required for growth under iron and manganese limitations. *Microbiology* 142: 2635-2645.

Modun, B., Kendall, D. and Williams, P. (1994). Staphylococci express a receptor for human transferrin: identification of a 42-kilodalton cell wall transferrin-binding protein. *Infect Immun* 62: 3850-3858.

Modun, B. and Williams, P. (1999). The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun* 67: 1086-1092.

Mogollon, J.D., Pijoan, C., Murtaugh, M.P., Cleary, P.P. and Collins, J.E. (1992). Testing meningeal strains of *Streptococcus suis* to detect M protein genes. *Res Vet Sci* 53: 244-246.

Nikaido, H. (1979). Permeability of the outer membrane of bacteria. *Angew Chem Int Ed Engl* 18: 337-350.

Niven, D.F., Donga, J. and Archibald, F.S. (1989). Responses of *Haemophilus pleuropneumoniae* to iron restriction: changes in the outer membrane protein profile and the removal of iron from porcine transferrin. *Mol Microbiol* 3: 1083-1089.

Niven, D.F. and Ekins, A. (2001). Iron content of *Streptococcus suis* and evidence for a *dpr* homologue. *Can J Microbiol* 47: 412-416.

Niven, D.F., Ekins, A. and al-Samaurai, A.A. (1999). Effects of iron and manganese availability on growth and production of superoxide dismutase by *Streptococcus suis*. *Can J Microbiol* 45: 1027-1032.

Norton, P.M., Rolph, C., Ward, P.N., Bentley, R.W. and Leigh, J.A. (1999). Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin. *FEMS Immunol Med Microbiol* 26: 25-35.

Novak, R., Braun, J.S., Charpentier, E. and Tuomanen, E. (1998). Penicillin tolerance genes of *Streptococcus pneumoniae*: the ABC-type manganese permease complex Psa. *Mol Microbiol* 29: 1285-1296.

- Novak, R., Cauwels, A., Charpentier, E. and Tuomanen, E. (1999).** Identification of a *Streptococcus pneumoniae* gene locus encoding proteins of an ABC phosphate transporter and a two-component regulatory system. *J Bacteriol* 181: 1126-1133.
- Ofek, I. and Beachey, E.H. (1980).** General concepts and principles of bacterial adhesion. *Bacterial adherence. Receptors and recognition.* Beachy, E.H., London, Chapman and Hall. 6: 1-29.
- Ogunniyi, A.D., Giammarinaro, P. and Paton, J.C. (2002).** The genes encoding virulence-associated proteins and the capsule of *Streptococcus pneumoniae* are upregulated and differentially expressed *in vivo*. *Microbiology* 148: 2045-2053.
- Osaki, M., Takamatsu, D., Shimoji, Y. and Sekizaki, T. (2002).** Characterization of *Streptococcus suis* genes encoding proteins homologous to sortase of gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 184: 971-982.
- Pancholi, V. and Fischetti, V.A. (1992).** A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med* 176: 415-426.
- Pancholi, V. and Fischetti, V.A. (1998).** alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J Biol Chem* 273: 14503-14515.
- Pandey, A., Bringel, F. and Meyer, J.-M. (1994).** Iron requirement and search for siderophores in lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 40: 735-739.
- Pappenheimer, A.M., Jr. (1977).** Diphtheria toxin. *Annu Rev Biochem* 46: 69-94.
- Peacock, S.J., Foster, T.J., Cameron, B.J. and Berendt, A.R. (1999).** Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin

mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology* 145: 3477-3486.

Posey, J.E., Hardham, J.M., Norris, S.J. and Gherardini, F.C. (1999). Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10887-10892.

Poyart, C., Pellegrini, E., Gaillot, O., Boumaila, C., Baptista, M. and Trieu-Cuot, P. (2001). Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* 69: 5098-5106.

Quagliarello, V. and Scheld, W.M. (1992). Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med* 327: 864-872.

Que, Q. and Helmann, J.D. (2000). Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Mol Microbiol* 35: 1454-1468.

Quessy, S., Busque, P., Higgins, R., Jacques, M. and Dubreuil, J.D. (1997). Description of an albumin binding activity for *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Microbiol Lett* 147: 245-250.

Quessy, S., Dubreuil, J.D., Caya, M. and Higgins, R. (1995). Discrimination of virulent and avirulent *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates from different geographical origins. *Infect Immun* 63: 1975-1979.

Reams, R.Y., Glickman, L.T., Harrington, D.D., Thacker, H.L. and Bowersock, T.L. (1994). *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. *J Vet Diagn Invest* 6: 326-334.

Reynolds, P.E. and Brown, D.F. (1985). Penicillin-binding proteins of beta-lactam-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Effect of growth conditions. *FEBS Lett* 192: 28-32.

Robertson, I.D. and Blackmore, D.K. (1989). Prevalence of *Streptococcus suis* types 1 and 2 in domestic pigs in Australia and New Zealand. *Vet Rec* 124: 391-394.

Salyers, A.A. and Whitt, D.D. (1994). Virulence factors that promote colonization. *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. Washington: 30-46.

Segers, R.P., Kenter, T., de Haan, L.A. and Jacobs, A.A. (1998). Characterisation of the gene encoding suilysin from *Streptococcus suis* and expression in field strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 167: 255-261.

Segura, M. and Gottschalk, M. (1999). Adhesion of *Streptococcus suis* capsular type 2 to phagocytic cells. *Abstracts of the XIV Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases*, Auckland, New Zealand, abstract P8.17.

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

Segura, M.A., Cl eroux, P. and Gottschalk, M. (1998). *Streptococcus suis* and group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* 21: 189-195.

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

Signas, C., Raucci, G., Jonsson, K., Lindgren, P.E., Anantharamaiah, G.M., Hook, M. and Lindberg, M. (1989). Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 699-703.

Silver, S. and Walderhaug, M. (1992). Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol Rev* 56: 195-228.

Smith, H.E., Buijs, H., de Vries, R.R., Wisselink, H.J., Stockhofe-Zurwieden, N. and Smits, M.A. (2001). Environmentally regulated genes of *Streptococcus suis*: identification by the use of iron-restricted conditions in vitro and by experimental infection of piglets. *Microbiology* 147: 271-280.

Smith, H.E., Damman, M., Van der Velde, J., Wagenaar, F., Wisselink, H.J., Stockhofe-Zurwieden, N. and Smits, M.A. (1999). Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun* 67: 1750-1756.

Smith, H.E., Reek, F.H., Vecht, U., Gielkens, A.L. and Smits, M.A. (1993). Repeats in an extracellular protein of weakly pathogenic strains of *Streptococcus suis* type 2 are absent in pathogenic strains. *Infect Immun* 61: 3318-3326.

Smith, H.E., Vecht, U., Gielkens, A.L. and Smits, M.A. (1992). Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the 136-kilodalton surface protein (muramidase-released protein) of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun* 60: 2361-2367.

Smith, H.E., Wisselink, H.J., Stockhofe-Zurwieden, N., Vecht, U. and Smits, M.M. (1997). Virulence markers of *Streptococcus suis* type 1 and 2. *Adv Exp Med Biol* 418: 651-655.

Spatafora, G.A. and Moore, M.W. (1998). Growth of *Streptococcus mutans* in an iron-limiting medium. *Methods Cell Sci* 20: 217-221.

Srinivasa Rao, P.S., Lim, T.M. and Leung, K.Y. (2003). Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Infect Immun* 71: 1343-1351.

St Geme, J.W., 3rd and Cutter, D. (1996). Influence of pili, fibrils, and capsule on in vitro adherence by *Haemophilus influenzae* type b. *Mol Microbiol* 21: 21-31.

Staats, J.J., Feder, I., Okwumabua, O. and Chengappa, M.M. (1997). *Streptococcus suis* - past and present. *Vet Res Commun* 21: 381-407.

Tai, S.S., Lee, C.J. and Winter, R.E. (1993). Hemin utilization is related to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 61: 5401-5405.

Tikkanen, K., Haataja, S. and Finne, J. (1996). The galactosyl-(alpha 1-4)-galactose-binding adhesin of *Streptococcus suis*: occurrence in strains of different hemagglutination activities and induction of opsonic antibodies. *Infect Immun* 64: 3659-3665.

Touil, F. and Higgins, R. (1988). Les infections à *Streptococcus suis* chez l'espèce porcine: revue de la littérature. *Méd Vét Québec* 18: 25-31.

Touil, F., Higgins, R. and Nadeau, M. (1988). Isolation of *Streptococcus suis* from diseased pigs in Canada. *Vet Microbiol* 17: 171-177.

Tseng, H.J., McEwan, A.G., Paton, J.C. and Jennings, M.P. (2002). Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: *PsaA* mutants are hypersensitive to oxidative stress. *Infect Immun* 70: 1635-1639.

Vadeboncoeur, N., Segura, M., Al-Numani, D., Vanier, G. and 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.

Vecht, U., Arends, J.P., van der Molen, E.J. and van Leengoed, L.A. (1989). Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type II after experimentally induced infection of newborn germ-free pigs. *Am J Vet Res* 50: 1037-1043.

Vecht, U., Wisselink, H.J., Jellema, M.L. and Smith, H.E. (1991). Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun* 59: 3156-3162.

von Hunolstein, C., Ricci, M.L., Valenti, P. and Orefici, G. (1992). Lack of activity of transferrins towards *Streptococcus* spp. *Med Microbiol Immunol* 181: 351-357.

Weinberg, E.D. (1977). Mineral element control of microbial secondary metabolism. *Microorganisms and Minerals*. Dekker, M., New York: Chap. 7.

Weinberg, E.D. (1997). The Lactobacillus anomaly: total iron abstinence. *Perspect Biol Med* 40: 578-583.

Weinberg, E.D. (2000). Microbial pathogens with impaired ability to acquire host iron. *Biometals* 13: 85-89.

Williams, A.E. (1990). Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 isolates. *Microb Pathog* 8: 189-196.

Williams, A.E. and Blakemore, W.F. (1990). Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J Infect Dis* 162: 474-481.

Williams, P. and Griffiths, E. (1992). Bacterial transferrin receptors--structure, function and contribution to virulence. *Med Microbiol Immunol* 181: 301-322.

Winterhoff, N., Goethe, R., Gruening, P., Rohde, M., Kalisz, H., Smith, H.E. and Valentin-Weigand, P. (2002). Identification and characterization of

two temperature-induced surface-associated proteins of *Streptococcus suis* with high homologies to members of the arginine deiminase system of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* 184: 6768-6776.

Wisselink, H.J., Stockhofe-Zurwieden, N., Hilgers, L.A. and Smith, H.E. (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.

Wisselink, H.J., Vecht, U., Stockhofe-Zurwieden, N. and Smith, H.E. (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.

Yamamoto, Y., Higuchi, M., Poole, L.B. and Kamio, Y. (2000). Role of the *dpr* product in oxygen tolerance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 182: 3740-3747.

Yamamoto, Y., Poole, L.B., Hantgan, R.R. and Kamio, Y. (2002). An iron-binding protein, Dpr, from *Streptococcus mutans* prevents iron-dependent hydroxyl radical formation in vitro. *J Bacteriol* 184: 2931-2939.

Zitzelsberger, W., Gotz, F. and Schleifer, K.H. (1984). Distribution of superoxide dismutases, oxidases, and NADH peroxidase in various streptococci. *FEMS Microbiol Lett* 21: 243-246.

Zwilling, B.S., Kuhn, D.E., Wikoff, L., Brown, D. and Lafuse, W. (1999). Role of iron in Nramp1-mediated inhibition of mycobacterial growth. *Infect Immun* 67: 1386-1392.

ANNEXE

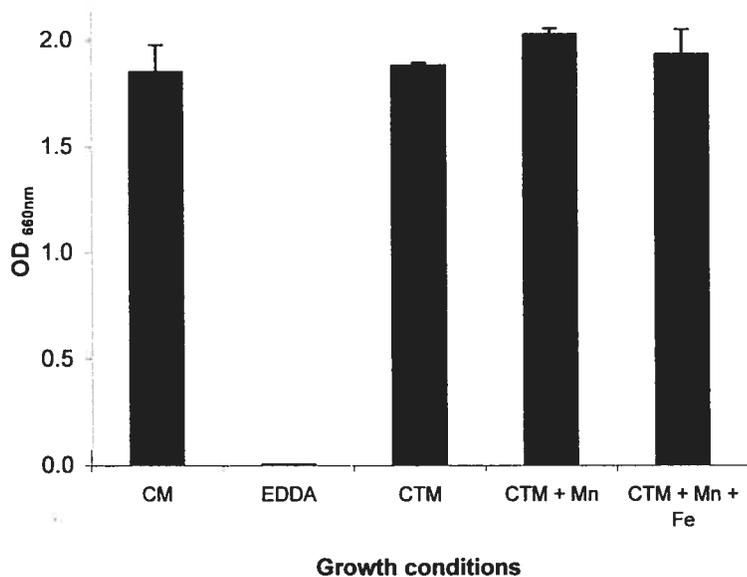


Figure 1

Growth of *A. suis* in different environmental conditions. Bacteria were grown to early stationary phase ($t = 5-6h$) in the media described in the text. The 5 conditions tested are indicated below. CM, control medium; EDDA, iron-restricted; CTM, Mn-depleted; CTM+ Mn, Mn-depleted supplemented with Mn; CTM+ Mn⁺+Fe, Mn-depleted supplemented with Fe and Mn. Cell growth was monitored by measuring OD 660 nm. Data represent the means and standard errors obtained from at least two independent experiments.