

Université de Montréal

Caractérisation de souches de *Streptococcus ruminantium* isolées de ruminants et étude des premières étapes de la pathogénèse de l'infection causée par cette bactérie

Par Anaïs Boa

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)
en sciences vétérinaires option microbiologie

Avril 2023

© Boa, 2023

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

Caractérisation de souches de *Streptococcus ruminantium* isolées de ruminants et étude des premières étapes de la pathogénèse de l'infection causée par cette bactérie

Présenté par

Anaïs Boa

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Nahuel Fittipaldi

Président-rapporteur

Marcelo Gottschalk

Directeur de recherche

Mariela Segura

Codirectrice

Juan Carlos Arango-Sabogal

Membre du jury

Résumé

Bien que connu en tant que pathogène bactérien porcin majeur et agent zoonotique responsable principalement de méningites, septicémies et de morts soudaines, *Streptococcus suis* a également été isolé chez une variété d'autres animaux tels que les ruminants. Malgré sa diversité génotypique et sérologique, des études taxonomiques récentes ont mené à la reclassification de 6 de ses sérotypes dont le sérotype 33, maintenant dénommé comme nouvelle espèce *Streptococcus ruminantium*. Contrairement à *S. suis*, *S. ruminantium* a principalement été décrit chez les ruminants comme pathogène responsable de diverses manifestations cliniques telles que des endocardites et des arthrites. En raison de sa description récente, plusieurs lacunes concernant ses caractéristiques biologiques et pathologiques demeurent. De plus, *S. suis* et *S. ruminantium* sont très difficiles à différencier l'un de l'autre par l'entremise des tests biochimiques traditionnellement utilisés dans les laboratoires de diagnostic. Ainsi, plusieurs souches de *S. suis* isolées de ruminants malades avant la mise à jour de la classification, s'avèrent mal identifiées. D'où la raison pour laquelle l'importance étiologique de *S. ruminantium* chez les ruminants reste incertaine. Pour y remédier, 14 isolats de *S. suis* provenant d'échantillons cliniques chez des ruminants au Canada, ont été reclassifiés en *S. ruminantium* selon les nouvelles analyses génétiques moléculaires décrites. À ces derniers s'ajoutent 7 isolats de *S. ruminantium* provenant de cas d'endocardites bovines au Japon, qui ont été également davantage caractérisés génotypiquement et phénotypiquement et leurs interactions avec différentes cellules de l'hôte ont été évaluées. En résumé, on a pu démontrer que tous les isolats étaient faiblement voire non encapsulés avec une surface cellulaire hydrophobe, ils avaient une grande capacité d'auto-agrégation et une habileté à produire du biofilm. Ces phénotypes pourraient contribuer à la pathogénèse de l'infection en intensifiant la capacité d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales et endothéliales et en augmentant la résistance à l'effet bactéricide du sang entier et à la phagocytose par les cellules immunitaires de l'hôte. Cependant, certains isolats étaient plus susceptibles que d'autres à la phagocytose, suggérant que d'autres mécanismes de protection seraient impliqués dans cette étape. Ainsi, cette étude aide à améliorer notre

connaissance sur la pathogénicité et la virulence de *S. ruminantium* pour les maladies chez les ruminants.

Mots-clés : *Streptococcus ruminantium*, *Streptococcus suis*, auto-agrégation, biofilm, non-encapsulé, hydrophobicité, adhérence, invasion, phagocytose, killing

Abstract

Although *Streptococcus suis* is known as a major swine bacterial pathogen and zoonotic agent mainly responsible for meningitis, septicemia, and sudden death, it has also been isolated from a variety of other animals including ruminants. Despite its genotypical and serological diversity, recent taxonomic studies led to the reclassification of 6 *S. suis* serotypes such as *S. suis* serotype 33 currently renamed as the novel species *Streptococcus ruminantium*. Unlike *S. suis*, *S. ruminantium* has been mainly described in ruminants as a cause of endocarditis and arthritis. Because of its recent description, information on its biological and pathological characteristics remains unclear. Moreover, *S. suis* and *S. ruminantium* are not easily differentiated by traditional biochemical tests done in diagnostic laboratories. Hence, some *S. suis* isolates recovered from diseased ruminants before the updated classification, have been misidentified. Consequently, the aetiological importance of *S. ruminantium* in ruminants remains unknown. To address this, 14 *S. suis* isolates from clinical samples of ruminants in Canada have been reclassified, based on the new genetic molecular testing described for the identification of *S. ruminantium*. In addition of them, 7 *S. ruminantium* isolates from bovine endocarditis in Japan, were further genotypically and phenotypically characterized and their interactions with various host cells were studied. Overall, we demonstrated that all isolates were poorly or non-capsulated with a high cell surface hydrophobicity, had a high capacity of self-aggregation and the ability to produce biofilm. These biological phenotypes might contribute to the pathogenesis of the infection by enhancing the adhesion/invasion capacity of both epithelial and endothelial cells, and by increasing the resistance to whole blood killing and phagocytosis by host immune cells. However, some isolates were more susceptible to the phagocytosis than others suggesting that other protective mechanisms might be implicated in this step. Taken together, this study will help to increase our understanding of the pathogenicity and the virulence of *S. ruminantium* in ruminant diseases.

Mots-clés : *Streptococcus ruminantium*, *Streptococcus suis*, self-aggregation, biofilm, non-encapsulated, hydrophobicity, adherence, invasion, phagocytosis, killing

Table des matières

Résumé	3
Abstract	5
Table des matières	6
Liste des tableaux	9
Liste des figures	10
Liste des abréviations	11
Remerciements	15
I/ Introduction	17
II/ Revue de la littérature	22
1. <i>Streptococcus suis</i>	23
1.1 Caractéristiques générales	23
1.2 Sérotypage et distribution géographique de <i>S. suis</i>	23
1.2.1 Dominance de <i>S. suis</i> sérotype 2	25
1.2.2 Classification approfondie selon le type allélique (ST)	25
1.2.3 Souches non typables	27
1.3 Infection, transmission et traitement de la maladie causée par <i>S. suis</i>	29
1.3.1 Chez le porc	29
1.3.2 Chez l'humain	31
1.4 Pathogenèse de l'infection	32
1.4.1 Colonisation : adhésion et invasion des surfaces épithéliales	33
1.4.2 Survie dans le sang et dissémination	34
1.4.3 Déclenchement de la réponse inflammatoire et choc septique	36
1.4.4 Invasion du système nerveux central (CNS) et méningite	36
1.5 Principaux facteurs de virulence	38
1.5.1 Capsule polysaccharidique (CPS)	38
1.5.2 Suilysine	40
1.5.3 Paroi cellulaire	41

1.5.3.1 D-alanylation de l'acide lipotéichoïque (LTA)	41
1.5.3.2 N-déacétylation du peptidoglycane	42
1.5.4 Autres facteurs de virulence	43
2. Réponse immunitaire innée	45
2.1 Caractéristiques générales	45
2.2 Phagocytes professionnels	46
2.2.1 Monocytes	46
2.2.2 Macrophages	48
2.2.3 Cellules dendritiques	50
2.2.4 Neutrophiles	51
2.3 Rôle de la réponse immunitaire innée lors de l'infection à <i>S. suis</i>	53
2.3.1 Rôle des macrophages	53
2.3.2 Rôle des cellules dendritiques	55
3. <i>Streptococcus suis</i> sérotype 33 reclassé en <i>Streptococcus ruminantium</i>	57
3.1 Caractéristiques générales	57
3.1.1 Hôtes et symptômes	58
3.1.2 <i>S. suis</i> isolé chez les ruminants	59
3.2 Nouveaux outils de diagnostic	60
3.2.1 PCR du gène codant pour la protéine de réparation d'ADN (<i>recN</i> -PCR)	60
3.2.2 PCR spécifique pour <i>S. ruminantium</i>	61
3.3 Diversité sérologique et génomique impliquée dans la pathogénèse	61
3.3.1 Différents clusters de la capsule polysaccharidique (CPS)	61
3.3.2 Résistance antimicrobienne	62
3.4 Autres streptocoques retrouvés chez les ruminants	62
3.4.1 <i>Streptococcus agalactiae</i>	62
3.4.2 <i>Streptococcus uberis</i>	63
3.4.3 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp <i>dysgalactiae</i>	63
III/ Article scientifique	65
IV/ Discussion	98

1. L'analyse génétique par PCR est requise pour bien diagnostiquer l'agent étiologique des maladies causées par des streptocoques chez les ruminants	99
2. Caractérisation de souches de <i>S. ruminantium</i> isolées de ruminants	101
2.1. <i>S. ruminantium</i> ne porte aucun des trois gènes (<i>mrp</i> , <i>epf</i> , <i>sly</i>) codant pour des marqueurs de virulence décrits chez <i>S. suis</i>	101
2.2. <i>S. ruminantium</i> exprime faiblement voire aucune CPS menant à une augmentation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire	103
2.3. <i>S. ruminantium</i> exprime un phénotype d'auto-agrégation menant à la formation de microcolonies	104
2.4. <i>S. ruminantium</i> est capable de produire du biofilm en présence et en absence de fibrinogène	105
3. Premières étapes de la pathogénèse de l'infection causée par <i>S. ruminantium</i>	106
3.1. Colonisation : Meilleure adhérence et invasion des cellules épithéliales et endothéliales par <i>S. ruminantium</i> comparativement à <i>S. suis</i> sérotype 2	107
3.2. Survie dans le sang : Meilleure survie à l'effet bactéricide du sang entier et à la phagocytose de <i>S. ruminantium</i> comparativement à <i>S. suis</i> sérotype 2 malgré quelques exceptions	108
V/ Conclusions et perspectives	110
1. Conclusions générales	111
2. Perspectives	113
Bibliographie	115
Annexe : Isolation of <i>Streptococcus ruminantium</i> (<i>Streptococcus suis</i> -like) from diseased ruminants in Canada	121

Liste des tableaux

II/ Revue de la littérature

Tableau 1. Gènes de ménage de *S. suis* utilisés pour l'approche par MLST

Tableau 2. Différences phénotypiques entre *Streptococcus ruminantium* et les espèces phylogénétiquement proches du genre *Streptococcus*

III/ Article scientifique

Tableau 1. Clinical history, host and country origin of each bacterial strains used in this study

Tableau 2. List of primer sequences used for virulence associated gene detection by PCR

Annexe

Tableau 1. Identification of *Streptococcus ruminantium* isolates by MALDI-TOF and PCR

Tableau 2. Sequencing analysis of 16S rRNA and *cps60* gene sequences of *Streptococcus ruminantium* isolates included in this report.

Liste des figures

II/ Revue de la littérature

Figure 1. Distribution mondiale des séquences types les plus importantes de *S. suis* sérotype 2 isolées à la fois de cas cliniques d'infection chez le porc et l'humain

Figure 2. Schématisation des hypothèses proposées pour les différentes étapes impliquées dans la pathogénèse de l'infection causée par *S. suis* sérotype 2

III/ Article scientifique

Figure 1. Hydrophobicity assay of *S. ruminantium* isolates

Figure 2. Visualization of *S. ruminantium* capsule by transmission electron microscopy following labelling with polycationic ferritin

Figure 3. Self-aggregation assay of *S. ruminantium* isolates

Figure 4. Confocal microscopy showing the self-aggregation phenotype of *S. ruminantium*

Figure 5. Biofilm formation by *S. ruminantium* in the presence and absence of porcine and bovine fibrinogen

Figure 6. Adhesion to and invasion of Madin-Darby Bovine Kidney cells (MDBK) and Newborn Pig Tracheal cells (NPTr) by *S. ruminantium*

Figure 7. Adhesion to and invasion of Calf Pulmonary Artery Endothelial (CPAE) and Porcine Aortic Endothelial Cells (AOC) by *S. ruminantium*

Figure 8. *S. ruminantium* resistance to killing by bovine whole blood

Figure 9. *S. ruminantium* strain-dependent resistance to phagocytosis by bovine monocytes-derived macrophages

Liste des sigles et abréviations

Agl/II : Antigène I/II

AOC : « Porcine Aortic Endothelial Cells »

Atl : Autolysine

ARNr : ARN ribosomique

BBB : Barrière hémato-encéphalique ou «blood-brain barrier»

BMEC : Cellules endothéliales microvasculaires du cerveau

CAMP : Peptides antimicrobiens cationiques

CCL : « Chemokine (C-C motif) ligand »

CFU : « Colony-forming unit »

CPAE : « Calf Pulmonary Artery Endothelial »

CPS : Capsule polysaccharidique

CSF : Liquide céphalorachidien ou « cerebrospinal fluid »

CXCL : : Chemokine (C-X-C motif) ligand

DAMP : « Damage-associated molecular pattern »

DC : cellules dendritiques

DppIV : « Dipeptidyl peptidase IV »

EF : Extracellular factor

ELISA : « Enzyme-linked immunosorbent assay »

Fhb : Protéine de liaison au facteur H

ICE : Élément intégratif et conjugatif

IL : Interleukine

LPS : Lipopolysaccharide

LTA : Acide lipotéichoïque

MALDI-TOF MS : « Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry »

MDBK : « Madin-Darby Bovine Kidney »

MEC : matrice extracellulaire

MHC : Complexe majeur d'histocompatibilité

MLST : Typage de séquences multilocus

MOI : « Multiplicity of infection »

MRP : Muramidase-release protein »

NaCl : Chlorure de sodium

NAG : N-acétylglucosamine

NAM : N-acétylmuramique

NCL : Nouveau locus de la capsule polysaccharidique

NET : « Neutrophil extracellular traps »

NK : cellules tueuses naturelles ou « Natural Killer »

NOD : Domaines de liaison des nucléotides et d'oligomérisation

NPTr : « Newborn pig tracheal cells »

OatA : O-acétyltransférase A

PAMP : motifs moléculaires spécifiques associés aux pathogènes ou « Pathogen-associated molecular patterns »

PBMEC : Cellules endothéliales microvasculaire du cerveau de porc

PBPs : Penicillin binding proteins

PCPEC : Cellules épithéliales porcines du plexus choroïdien

PCR : « Polymerase chain reaction »

PMN : Leucocytes polymorphonucléaires

PRR : Récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires ou « Pattern recognition receptors »

ROS : Espèces oxygènes réactives

SLY : Suilysine

SNC : Système nerveux central

SRRP : Syndrome reproducteur et respiratoire porcin

ST : Type allélique ou « sequence type »

STSLs : « Streptococcal toxic shock-like syndrome »

TLR : « Toll-like receptors »

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale α

VGS : groupe de streptocoques viridans

À ma mère pour son soutien incommensurable

Remerciements

- ❖ J'aimerais tout d'abord remercier infiniment mon directeur de maitrise, le Dr. Marcelo Gottschalk, pour m'avoir donné la chance de découvrir le domaine de la recherche en microbiologie lors d'un stage d'été il y a maintenant plus de 5 ans et de m'avoir par la suite proposé de réaliser un double programme avec une maîtrise combinée à un doctorat de premier cycle en médecine vétérinaire. Merci de m'avoir pris sous votre aile et de m'avoir guidé, d'avoir fait preuve de patience et de compréhension envers mon parcours ardu et atypique, mais surtout merci pour la confiance que vous m'avez accordé tout au long de mon cheminement. J'ai eu la chance d'apprendre énormément à votre côté et je vous en suis grandement reconnaissante.
- ❖ Je remercie également ma co-directrice, Dre. Mariela Segura pour toutes les belles discussions, suggestions, commentaires et critiques constructives apportées et qui ont permis d'améliorer grandement mes expériences et mon projet de maîtrise. Merci pour votre expertise, votre gentillesse et votre humour.
- ❖ Je tiens à remercier aussi Sonia Lacouture, agente de recherche du Dr. Marcelo Gottschalk, pour m'avoir épaulé et guidé à travers ma maitrise. Merci d'avoir pris le temps d'écouter mes difficultés expérimentales rencontrées et de m'avoir aidé à trouver des solutions. Merci pour tous ces bons conseils et ton enseignement en technique de laboratoire.
- ❖ Un gros merci à Jean-Philippe Auger, ancien étudiant au doctorat dans le laboratoire du Dr. Marcelo Gottschalk, pour avoir été mon mentor dans mes débuts en tant que stagiaire puis étudiante à la maitrise. Merci pour m'avoir transmis ton savoir et avoir fait preuve de patience dans ton enseignement étant donné mon manque d'expérience en microbiologie. Sans ton aide, ta confiance et tes encouragements, je n'aurais pu acquérir cette autonomie pour mener à bien ce projet.
- ❖ Je remercie Héloïse Pageaut, étudiante à la maîtrise, et Annie Gaudreau, assistante de recherche, pour toute votre aide dans la standardisation et la réalisation de certaines expériences.

- ❖ Je remercie également tous les membres des laboratoires Gottschalk et Segura que j'ai eu l'occasion de côtoyer durant ma maîtrise dont Audrey, Marêva, Guillaume et Dominic. Un merci spécial pour Servane Payen pour avoir toujours été présente pour moi, pour m'avoir aidé dans la préparation des centaines de géloses nécessaires pour mes expériences mais surtout pour m'avoir soutenu et épaulé dans mes moments difficiles. Tu es devenu bien plus qu'une collègue mais une véritable amie. Merci pour tous ses beaux moments passés aussi bien au laboratoire qu'à l'extérieure.
- ❖ Merci à toutes mes amies en médecine vétérinaire pour m'avoir soutenu dans ce parcours et pour m'avoir toujours considérée surhumaine voire folle de réaliser un double programme!
- ❖ Je remercie énormément ma famille dont spécialement ma mère pour m'avoir gardé sur le droit chemin et permis de voir le bout du tunnel au fil de ces années. Merci pour ton écoute et ton énorme soutien qui m'ont poussé à me dépasser malgré la complexité de réaliser un double programme.
- ❖ Finalement j'aimerais remercier mon mari Yassir Bello, pour être resté à mes côtés dans les moments de joie comme de peines, pour m'avoir encouragé sans cesses et remonté le moral mais surtout pour avoir cru en moi et fait preuve de patience pendant ces 5 années.
- ❖ Merci aux organismes subventionnaires pour votre soutien financier dans la réalisation de ce projet de maîtrise : FRQNT, CRSNG, GREMIP, CRIPA et la Faculté de Médecine Vétérinaire.

I/Introduction

Streptococcus suis est l'un des plus importants pathogènes responsable de pertes économiques considérables pour l'industrie porcine. Retrouvée mondialement, cette bactérie entraîne chez le porc une variété de manifestations cliniques telles que des arthrites, des endocardites, des pneumonies, des septicémies associées avec la mort soudaine des animaux ainsi que des méningites [1, 2]. De plus, le premier cas humain d'infection à *S. suis* reporté en 1968 au Danemark, a modifié notre vision de ce pathogène porcin vers un possible agent de zoonose touchant particulièrement les travailleurs en contact direct avec les animaux ou les produits dérivés de porcs [3]. Cependant, l'explosion de deux épidémies majeures en Chine en 1998 et 2005 avec plus de 200 personnes infectées, a mis fin au statut de zoonose professionnelle préalablement suggéré pour la bactérie [2, 4, 5]. À l'heure actuelle, *S. suis* représente l'une des principales causes de méningites bactériennes chez l'humain au Vietnam, en Thaïlande et à Hong-Kong [6-8]. *S. suis* a également été isolé chez une variété d'autres espèces animales telles que les chevaux, les chats, les chiens, les oiseaux et les ruminants [9-12]. Ce large spectre d'hôtes dériverait entre autres de la forte diversité génétique et sérologique présente au sein même de l'espèce.

Initialement, *S. suis* avait été classifié en 35 sérotypes (types 1-34 et type 1/2) selon l'hétérogénéité antigénique de la capsule polysaccharidique. Cependant, le développement de nouvelles techniques d'analyse génétique moléculaire, a remis en question le statut taxonomique de plusieurs de ces sérotypes dont les sérotypes 20, 22, 26, 32, 33 et 34. Parmi eux, les sérotypes 32 et 34 ont été redéfinis comme appartenant à l'espèce *Streptococcus orisatti* selon la séquence en nucléotides de la chaperone-60 (*cpn60*) et le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S [13] tandis que les sérotypes 20, 22 et 26 ont été reclassifiés en tant que *Streptococcus parasuis*. [14]. Récemment, Tohya *et al.* (2017 et 2018) ont proposé de renommer le sérotype 33 comme nouvelle espèce *Streptococcus ruminantium*. Cette dénomination émane de la spécificité du spectre d'hôte de cette bactérie.

En effet, contrairement à tous les autres sérotypes de *S. suis*, les souches de *S. ruminantium* ont été jusqu'à présent uniquement isolées chez des ruminants. La souche de référence du sérotype 33 a d'ailleurs été originellement isolée à partir d'un agneau atteint d'arthrite [13,14]. *S. ruminantium* aurait donc un tropisme naturel pour les ruminants

occasionnant principalement des endocardites, des arthrites, des pneumonies, des mammites et des abcès localisés dans divers organes [17]. Ces signes cliniques se rapprochent de ceux observés lors de l'infection à *S. suis* ce qui pourrait suggérer une certaine analogie concernant les premières étapes de la pathogénèse de ces deux bactéries. Ainsi, tout comme *S. suis*, *S. ruminantium* serait en mesure de traverser la barrière épithéliale pour rejoindre la circulation sanguine afin de se disséminer vers d'autres organes. Néanmoins, chez *S. suis*, cette dissémination entraîne le déclenchement d'une réponse inflammatoire exacerbée responsable du choc septique et du phénomène de mort soudaine chez l'humain et le porc respectivement; ce qui n'est pas rapporté pour *S. ruminantium*. Outre son caractère pathogénique, *S. ruminantium* a également été retrouvé dans la cavité orale de ruminants cliniquement sains suggérant que la bactérie pourrait faire partie de la flore commensale et contribuer au développement de maladies en tant que pathogène opportuniste plutôt que primaire [18]. En effet, similairement à *S. suis*, l'affaiblissement des défenses immunitaires, secondairement à plusieurs facteurs de risque, pourrait créer un environnement propice à la dissémination aberrante de *S. ruminantium* dans divers organes et faciliter de ce fait le déclenchement de la maladie. Cependant, en raison de sa description et de son acceptation récente en tant que nouvelle espèce, très peu d'étude spécifique sur *S. ruminantium* ont été réalisées à ce jour. De ce fait, beaucoup de lacunes demeurent concernant les mécanismes de pathogénicité utilisés par la bactérie pour infecter ses hôtes. De plus, il est très difficile de discriminer *S. ruminantium* de *S. suis* par l'utilisation de tests biochimiques de routine au laboratoire de diagnostic. C'est la raison pour laquelle Okura *et al.* (2019) ont mis au point un PCR spécifique pour l'identification de *S. ruminantium*. Néanmoins, plusieurs souches de *S. suis* ont été également isolées de ruminants dans le passé sans pour autant être réanalysées taxonomiquement basé sur les nouvelles connaissances actuelles. Autrement dit, l'importance étiologique de *S. ruminantium* comme pathogène chez les ruminants reste incertaine.

L'objectif général de ce projet est donc de caractériser plusieurs souches de *S. ruminantium* afin d'identifier leurs propriétés phénotypiques et biologiques ainsi que d'étudier les premières étapes de la pathogénèse de l'infection causée par cette espèce. Pour ce faire, 21 souches de *S. suis* isolées dans le passé de cas cliniques chez des ruminants, ont été réanalysées

par les méthodes d'analyse taxonomique spécifiquement décrites pour *S. ruminantium* afin d'évaluer l'importance étiologique de la bactérie chez les ruminants. Étant donné la proximité phylogénétique de *S. ruminantium* et de *S. suis*, ce dernier a également été utilisé comme comparatif pour réaliser cette étude. Plus spécifiquement, le sérotype 2 de *S. suis* qui représente le sérotype le plus étudié, mais également le plus fréquemment isolé de cas cliniques à la fois chez le porc et l'humain [4] a été choisi comme souche de comparaison en raison de son impact.

Basées sur les connaissances actuelles, les **hypothèses** de notre recherche sont :

- La prévalence d'infections attribuées à *S. ruminantium* chez les ruminants est largement sous-estimée secondairement à des erreurs de diagnostic.
- *S. ruminantium* possède des caractéristiques phénotypiques et biologiques différentes de *S. suis* sérotype 2.
- Par conséquent la pathogénèse de l'infection causée par *S. ruminantium* diffère de celle de *S. suis* sérotype 2.

Pour tester ces hypothèses, **trois objectifs spécifiques** ont été proposés :

1. Réanalyser taxonomiquement par des tests moléculaires, plusieurs isolats originellement identifiés en tant que *S. suis* isolés chez des ruminants malades
2. Sélectionner les souches de *S. ruminantium* et les caractériser d'un point de vue génotypique et phénotypique par des analyses *in vitro* afin de :
 - Détecter chez *S. ruminantium*, par analyse PCR, la présence des gènes *mrp*, *epf*, *sly* codant pour des marqueurs de virulence décrits chez *S. suis*.
 - Analyser l'expression d'une capsule polysaccharidique chez *S. ruminantium*.
 - Étudier la capacité de *S. ruminantium* à faire de l'auto-agrégation.
 - Étudier la capacité de *S. ruminantium* à former des biofilms.
3. Étudier *in vitro* les interactions entre *S. ruminantium* et les cellules de l'hôte impliquées dans la réponse immunitaire innée pour :
 - Comparer la capacité d'adhésion et d'invasion de *S. ruminantium* aux cellules épithéliales et endothéliales bovines et porcines (MDBK, NPTr, CPAE, AOC) par rapport à *S. suis* sérotype 2.

- Comparer *S. ruminantium* et *S. suis* sérotype 2 dans leur capacité à résister à l'effet bactéricide du sang entier bovin.
- Comparer la résistance à la phagocytose par les macrophages bovins dérivés des monocytes de *S. ruminantium* par rapport à *S. suis* sérotype 2.

II/Revue de littérature

1. *Streptococcus suis*, pathogène zoonotique

1.1. Caractéristiques générales

Streptococcus suis est une bactérie Gram positive encapsulée sous forme de coque. Elle est en général présente individuellement ou en paire voire parfois en courtes chaînettes. Capable de croître à la fois en présence d'oxygène et en milieu anaérobie, elle forme des petites colonies grises tout en étant α -hémolytique lorsqu'inoculée sur des géloses sang de mouton ou de bœuf [19]. Néanmoins, certaines souches sont β -hémolytiques et produisent une hémolysine sur agar de sang de cheval [20]. *S. suis* est caractérisé par une absence de croissance en présence de 6.5% de NaCl permettant de le dissocier du genre *Enterococcus* [20-22]. De plus, l'absence de production d'acétoïne à partir de la fermentation du glucose dans le contexte du test de Voges-Proskauer, permet de distinguer les espèces *S. suis* et *Streptococcus bovis* l'une de l'autre [22].

S. suis se retrouve de manière commensale principalement au niveau des voies respiratoires supérieures des porcs mais aussi dans leur tractus reproducteur et digestif. En effet, la bactérie est fréquemment isolée depuis les amygdales et les cavités nasales de son hôte naturel [23]. Bien que certains hôtes soient des porteurs asymptomatiques, *S. suis* est également un important pathogène responsable de pertes économiques considérables pour l'industrie porcine au niveau mondial. En effet, suite à l'infection à *S. suis*, les porcs développent plusieurs pathologies sévères dont la septicémie, la pneumonie, l'endocardite, l'arthrite, la méningite et dans certains cas la mort subite de l'animal [2]. Ce pathogène est également un agent zoonotique causant des méningites, des septicémies et le syndrome de type-choc toxique streptococcique (STSLs) chez l'humain [24]. Pour ajouter une autre corde à son arc, *S. suis* est aussi un organisme très diversifié, divisé en 29 sérotypes, faisant de la lutte contre ce pathogène un défi d'autant plus complexe [2].

1.2. Sérotypage et distribution géographique de *S. suis*

Au début des années 1950, Jansen et van Dorssen ont décrit pour la première fois *S. suis*, suite à l'isolement de streptocoques α -hémolytiques de porcelets et de porcs adultes atteints de méningo-encéphalites [25]. Ces streptocoques ont d'abord été classés par de Moor en quatre

nouveaux groupes de Lancefield à savoir R, S, RS et T selon leur capsule polysaccharidique (CPS) [26]. Cependant, en 1966, Elliot a démontré que *S. suis* faisait plutôt partie du groupe D de Lancefield basé sur l'acide lipotéichoïque (LTA) de la paroi cellulaire. L'erreur de classification était due au fait que le LTA servant à classer les streptocoques parmi le groupe D, était masqué par les antigènes de la CPS dont Demoor s'était servi [27]. *S. suis* a été officiellement reconnu en 1987 en tant que nouvelle espèce lorsque Kilpper-Balz et Schleifer ont réalisé l'analyse de la paroi cellulaire démontrant la divergence suffisante entre *S. suis* et les autres membres du groupe D de Lancefield [28].

De par son hétérogénéité au sein même de l'espèce, de nouvelles techniques ont vu le jour afin d'affiner la classification de *S. suis* en différents sérotypes. En effet, *S. suis* a été divisé en 35 sérotypes, c'est-à-dire les sérotypes 1 à 34 et 1/2, selon les caractéristiques antigéniques de sa CPS. Cependant, des résultats récents ont démontré que 6 sérotypes parmi ceux-ci font en fait partie d'autres espèces bactériennes. C'est le cas notamment des sérotypes 32 et 34, maintenant désignés comme *Streptococcus orisratti* basé sur la séquence des nucléotides de la chaperonin-60 (cpn60) et le gène de l'ARN ribosomal 16S [13, 16, 29]. De même, les sérotypes 20, 22 et 26 ont récemment été reclassifiés comme appartenant à l'espèce *Streptococcus parasuis* basé sur la séquence génétique de *sodA* et *reCN* [14, 19, 30].

Les souches de référence étudiées pour chacun des sérotypes ont différentes origines. En effet, pour les sérotypes 20 et 31, leurs souches ont été isolées chez des veaux malades, alors que les souches de référence des sérotypes 33 et 14 proviennent respectivement d'un agneau malade et d'un cas humain de méningite [22, 31]. La plupart des souches de *S. suis* isolées de porcs malades, appartient à un nombre limité de sérotypes, entre autres les sérotypes 1 à 9, tandis que les autres proviennent des cavités nasales de porcs cliniquement sains [24]. Parmi ces sérotypes, certains d'entre eux se démarquent des autres par leur prévalence et la sévérité des maladies dont ils sont responsables. C'est le cas notamment du sérotype 9, particulièrement important en Europe, causant des maladies porcines sévères dans plusieurs pays [4, 32]. Cependant, il n'en demeure pas moins que le sérotype 2 reste le plus important en termes de virulence et de prédominance.

1.2.1. Dominance de *Streptococcus suis* sérotype 2

De tous les sérotypes, le sérotype 2 est le plus fréquemment isolé de cas cliniques à la fois chez le porc et chez l'humain au niveau mondial. Il est de ce fait considéré comme l'un des plus virulents et actuellement le plus étudié [4]. En effet, la plupart des recherches sur les facteurs de virulence et la pathogénèse se sont concentrées sur ce sérotype. Néanmoins, un bémol quant à son monopole reste à souligner. En effet, sa prévalence peut différer selon la localisation géographique. Bien que dominant en Asie avec un taux d'isolement au niveau individuel de plus de 40 %, sa prévalence au niveau des animaux malades demeure relativement basse en Amérique du Nord (Canada et États-Unis) avec moins de 25 % [19]. De plus, depuis les années 2000, la dominance du sérotype 2 a été remplacée par celle du sérotype 9 dans plusieurs pays d'Europe. En revanche, en ce qui concerne les infections chez l'humain, le sérotype 2 est le sérotype le plus isolé avec une prévalence mondiale de 74,7 % [19]. Du fait de l'importante diversification et du dynamisme évolutif de ce pathogène, chaque sérotype nécessite une classification plus spécifique afin de pouvoir identifier précisément la souche causant des épidémies périodiques ou des pandémies.

1.2.2. Classification approfondie selon le type allélique (ST)

Au sein du sérotype 2, plusieurs souches génétiquement et phénotypiquement différentes ayant également des niveaux de virulence variables, ont été isolées dans différentes parties du monde [33]. C'est entre autres la raison pour laquelle un type allélique (« sequence type » ou ST) a été attribué à *S. suis* par la technique du typage de séquences multilocus (MLST) permettant de mieux spécifier l'hétérogénéité génétique à l'intérieur d'un même sérotype. La MLST est une technique de typage mise en place pour générer des données non ambiguës et reproductibles d'un laboratoire à l'autre de façon à comparer et/ou différencier efficacement les différentes souches au sein d'une même espèce bactérienne [34]. Elle consiste en l'amplification par PCR et le séquençage de sept gènes de ménage conservés dans les génomes de toutes les souches de *S. suis* (Tableau 1). Ces gènes ont été ciblés de par leur habilité à pouvoir distinguer un grand nombre de génotypes sans pour autant avoir des variations génétiques qui s'effectuent trop rapidement. Une fois les séquences de ces sept gènes de ménage connues, celles-ci sont comparées aux profils des banques de données internationales (ssuis.mlst.net) dans le but

d'assigner un numéro correspondant à chacun des différents allèles. Par la suite, un profil allélique peut être construit pour obtenir un type de séquence (ST) pour chacune des souches analysées [35].

Tableau 1. Gènes de ménage de *S. suis* utilisés pour l'approche par MLST. Tiré de King *et al.* (2002).

Gènes	Fonctions
<i>cpn60</i>	Chaperonne de 60 kDa
<i>dpr</i>	Protéine putative de résistance au peroxyde
<i>recA</i>	Facteur de recombinaison homologue
<i>aroA</i>	5-énolpyruvylshikimate 3-phosphate synthétase
<i>thrA</i>	Aspartokinase/homosérine déshydrogénase
<i>gki</i>	Glucose kinase
<i>mutS</i>	Enzyme de réparation des erreurs dans l'ADN

Malgré les nombreux avantages procurés par cette technique, elle comporte néanmoins certains points faibles. En effet, se baser sur des gènes de ménage aux séquences hautement conservées peut masquer des différences génotypiques et possiblement phénotypiques entre les différents STs. L'acquisition possible d'ADN exogène et l'intégration de celui-ci par des phénomènes de recombinaison homologue peuvent donner lieu à des différences entre les souches d'un même ST qui passeraient inaperçues lors de la détection par cette technique [36]. C'est d'ailleurs ce qui a été démontré par l'étude des ST25 et ST28 du sérotype 2 mettant en évidence des différences majeures entre certaines souches de ces STs qui pourtant devraient être génétiquement très rapprochées [37, 38]. C'est pourquoi de nos jours, le séquençage au complet du génome de *S. suis* commence à être de plus en plus utilisé pour pallier aux limitations des autres techniques et assurer une bonne classification [39].

En ce qui concerne le sérotype 2, 111 différents STs ont été décrits à ce jour possédant une distribution géographique particulière. En effet, les souches provenant du ST1, qui représentent la majorité des isolats issus de porcs et humains malades, sont les plus prévalentes en Europe, Asie et Amérique de Sud (Figure 1). En revanche, les souches appartenant au ST7 sont

retrouvées exclusivement en Chine où elles ont été responsables des éclosions mortelles chez l'humain. Aux Pays-Bas, il s'agit des souches du ST20 qui représentent la cause principale des maladies chez le porc et l'humain. Concernant l'Amérique du Nord, les souches appartenant aux ST25 (également retrouvées en Thaïlande) et ST28 (présentes aussi au Japon) sont les plus isolées [19]. Ces deux STs sont également moins virulents que le ST1 comme le témoigne une étude dans laquelle une souche ST28 isolée d'Amérique du Nord a été démontrée être non virulente dans un modèle d'infection expérimental tandis qu'une virulence intermédiaire a été observée pour des souches du ST25 [40]. Enfin, les souches appartenant aux ST101 et 104 sont endémiques en Thaïlande et semblent être de plus en plus associées à des cas de maladies chez l'humain en particulier pour le ST104 [19].

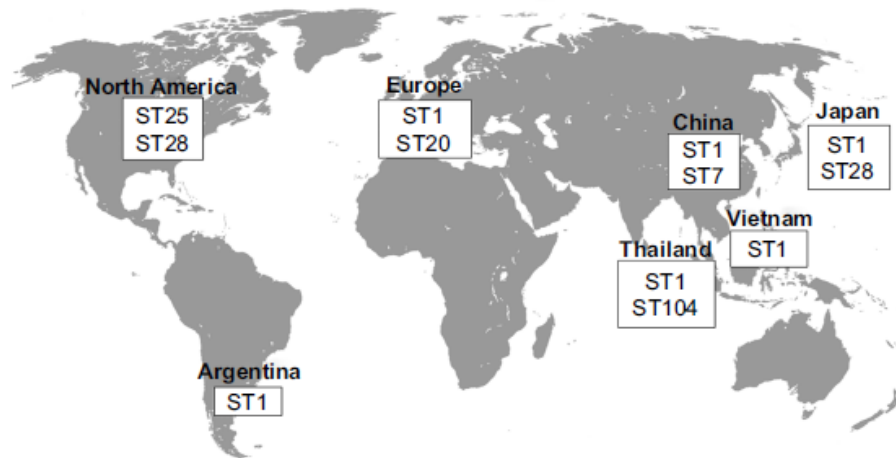


Figure 1 : Distribution mondiale des séquences types les plus importantes de *S. suis* sérotype 2 isolées à la fois de cas cliniques d'infection chez le porc et l'humain. Adapté à partir de Goyette-Desjardins *et al.* (2014).

1.2.3. Souches non typables

Malgré les différentes méthodes de classification, plusieurs souches de *S. suis* demeurent non typables et ceci peu importe la méthode employée [41]. En effet, 5,4% des souches de *S. suis* isolées chez des porcs malades en Chine s'avèrent non typables selon l'analyse réalisée par Wei *et al* (2009). Ce pourcentage s'élève à 15% pour les isolats rapportés au Canada et entre 14 et 33% au Québec [43-45]. Ceci représente une proportion non négligeable provenant de cas cliniques chez le porc, élargissant notre vision de la diversité sérologique de *S. suis* et renforçant

l'importance de définir une nouvelle catégorisation pour ces souches afin d'évaluer leur capacité de virulence. En effet, plusieurs études récentes ont mis en évidence la présence de nouveaux gènes de CPS procurant un type de capsule à ce jour non identifiable par les méthodes disponibles actuellement [46]. Au total, 26 nouveaux loci de CPS désignés par NCL1-26 ont été identifiés chez des isolats non typables provenant de porcs aussi bien malades que cliniquement sains [41, 46-48]. De plus, un nouveau variant de sérotype Chz a également été mis en évidence lors d'une épidémie en Chine, de porcelets atteints de méningite [49]. Ce dernier s'avère même être plus virulent que la souche P1/7 du sérotype 2 de *S. suis* selon une étude expérimentale avec un modèle murin [49]. L'identification de ces nouveaux types sérologiques repose sur la présence du gène *wzy* codant pour la polymérase Wzy impliquée dans la biosynthèse de la CPS. Ce gène s'avère être assez variable entre les différents types de loci de CPS mais hautement conservé au sein d'un même groupe faisant de lui une cible idéale afin de discriminer les loci de CPS chez les souches non typables de *S. suis* [41].

Outre la présence de nouveaux loci de CPS, certaines souches seraient non typables secondairement à l'absence de gène responsable de la production de la CPS ou à l'absence d'expression de ces gènes à la suite de l'insertion/délétion de gène ou à la présence de mutations entraînant un phénotype non encapsulé ou peu encapsulé [43, 50]. En effet, Gottschalk *et al.* (2013) ont mis en évidence que 89% des isolats de porcs non typables démontraient un fort pourcentage d'hydrophobicité. Or la CPS est connue pour avoir une composition hydrophile ce qui laisse suggérer que ces isolats seraient soit dépourvus de CPS ou n'exprimeraient qu'une faible quantité de celle-ci. De même, certaines souches pourraient potentiellement produire une capsule d'épaisseur insuffisante expliquant leur incapacité à être détectées par la technique de coagglutination utilisée dans les laboratoires de diagnostic de routine [41]. Cependant, il reste difficile de déterminer si ces souches étaient déjà peu ou non encapsulées avant l'infection, ou si elles auraient perdu leur capacité d'exprimer leur CPS au cours de l'infection, de leur isolement ou encore de leur culture [10, 51]. Ainsi, la présence de souches encapsulées et non encapsulées au sein de *S. suis* pourrait jouer un rôle important dans la pathogénèse et la virulence de son infection.

1.3. Infection, transmission et traitement de la maladie causée par *Streptococcus suis*

1.3.1. Chez le porc

Présent naturellement chez le porc, il est communément accepté que *S. suis* emprunte le système respiratoire (oro-nasal) comme route principale d'infection [32]. *S. suis* est également capable d'infecter des porcs de tout âge. Cependant, le développement de la maladie se fait habituellement chez des porcs post sevrages âgés de 5 à 10 semaines [32]. Cette fourchette d'âge représente la période pendant laquelle le système immunitaire du porcelet change par le déclin de l'immunité maternelle, le rendant de ce fait plus vulnérable à une infection. En effet, en tant qu'habitant naturel chez le porc, les infections à *S. suis* sont principalement associées à certains facteurs de risque pouvant occasionner des stress chez les individus tels que des fluctuations excessives de températures, une humidité relative élevée, une mauvaise ventilation, une surpopulation d'animaux ou encore le sevrage [52]. À ceci s'ajoute la présence d'autres pathogènes bactériens ou viraux tels que le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) pouvant entraîner des prédispositions chez le porc facilitant le déclenchement d'une infection à *S. suis*. Celui-ci pourrait donc agir en tant que pathogène respiratoire opportuniste [53].

En plus des voies respiratoires supérieures (amygdales et cavités nasales), *S. suis* peut être isolé depuis l'appareil digestif faisant du système gastrointestinal la deuxième route d'infection. Cependant les expériences réalisées à ce sujet se basaient uniquement sur des souches disposant d'une capsule résistante à l'acide gastrique [54]. Dans le cas contraire, *S. suis* ne serait pas capable du moins dans un contexte *in vitro*, de survivre face aux composés de l'estomac même si la bactérie semble exprimer une arginine déaminase pouvant conférer une protection face à l'acidité [55, 56]. Certaines lacunes en ce qui concerne ce sujet demeurent. Il n'en reste pas moins que cette route ne peut être mise de côté étant donné son importance chez l'humain [32].

Enfin, *S. suis* est également présent au niveau de l'appareil urogénital permettant une transmission verticale entre les truies infectées et leurs porcelets. En effet, lors de la parturition, les porcelets entrent en contact direct avec les sécrétions vaginales infectées de leur mère, permettant la colonisation rapide de leurs amygdales après la naissance [57]. *S. suis* est

également capable de se transmettre horizontalement lors de contacts entre différents individus [32]. Ceci s'explique par le fait que la majorité des porteurs asymptomatiques serve de réservoir pour différents sérotypes au niveau de leurs cavités nasales, transmettant ainsi le pathogène aux autres animaux qu'ils côtoient [58, 59].

Quelques heures à quelques semaines après l'infection à *S. suis*, l'un des premiers signes observés chez l'animal est une augmentation de la température corporelle (hyperthermie) accompagnée d'une perte de poids, de signes de dépression et de rougeur des muqueuses [1]. *S. suis* peut se retrouver ensuite dans la circulation sanguine et déclencher une septicémie sévère suivie d'autres affections tels que des arthrites, endocardites, pneumonies et parfois la mort soudaine de l'individu [1, 2]. Si celui-ci survit, une méningite se développe associée à des signes cliniques neurologiques tels que l'ataxie, l'opisthotonos, des convulsions et du nystagmus [1].

Les infections à *S. suis* sont majoritairement traitées par l'utilisation d'antibiotiques administrés via la nourriture ou l'eau consommées par les animaux malades [60]. Cependant, la forte utilisation de ceux-ci a mené au développement de profils de résistances pour la majorité des souches testées [61, 62]. Il est important néanmoins de se souvenir que *S. suis* ne peut être complètement éliminé de l'animal étant donné le statut porteur de ce dernier [61]. Cela n'empêche pas de développer des traitements thérapeutiques pour prévenir le développement de la maladie notamment via la vaccination. Les premiers agents vaccinaux suggérés ont été des bactérines commerciales. Il s'agit de la bactérie entière inactivée par un traitement à la chaleur ou au formol, et administrée aux porcs dans le but de leur conférer une protection face à une infection à *S. suis*. L'efficacité de ces bactérines est toujours controversée dans la littérature avec des résultats positifs comme négatifs [62]. Face à ce manque de performance, l'utilisation de composantes de la bactérie telles que la CPS ou encore des protéines (de surface ou toxine) ont été suggérées comme alternative de candidats vaccinaux. En effet, une étude a démontré l'effet protecteur d'un vaccin glycoconjugué CPS-toxine tétanique contre *S. suis* lors d'une infection expérimentale [63]. Cependant, l'utilisation seule de la CPS n'est pas suffisante due à son faible caractère immunogène et sa spécificité pour un sérotype particulier. Ainsi, récemment, un grand nombre de protéines a été étudié en tant que vaccin potentiel contre toutes les souches combinées de *S. suis*. Néanmoins, la variation de la méthode expérimentale utilisée par les

différentes équipes de recherche pour démontrer leur effet protecteur nuit à la possibilité d'obtenir un vaccin opérationnel [62, 63].

1.3.2. Chez l'humain

Les infections humaines causées par *S. suis* ont beaucoup attiré l'attention lors des dernières années à la suite d'épidémies mortelles émergentes [32]. Ces infections étaient originellement considérées comme des maladies occupationnelles. En d'autres mots, elles étaient reliées à la profession étant donné que la majorité des cas concernait des personnes travaillant dans l'industrie porcine ayant un contact direct avec les porcs ou des produits dérivés de porcs infectés [24]. Suite aux épidémies majeures en Chine en 1998 et en 2005 dans les provinces de Jiangsu et Sichuan respectivement, l'image professionnelle de ces infections a pris une toute autre dimension. En effet, elles sont devenues une préoccupation majeure pour la santé publique dans plusieurs pays d'Asie compte-tenu de la pratique courante de l'élevage porcin dans ces régions [24]. De plus, ces régions dont notamment le Vietnam et la Thaïlande, sont également plus susceptibles aux infections à *S. suis* en raison de leurs enjeux socioculturels de consommation crue d'aliments dérivés du porc contenant fréquemment une charge bactérienne considérable et propageant de ce fait le pathogène [19].

En effet, à la différence de chez son hôte naturel, *S. suis* pénètre dans le corps humain via des lésions cutanées et mucoales [24] ou suite à l'ingestion d'aliments insuffisamment cuits et contaminés [19]. Cependant, la voie d'infection orale n'a jamais été confirmée expérimentalement tant chez le porc que chez la souris. De plus, des expositions fréquentes à *S. suis* peuvent également mener à une colonisation des voies respiratoires supérieures sans pour autant déclencher de maladie même si cela reste possible dans certains cas [2]. Certains facteurs tels que l'alcoolisme, le diabète et la splénectomie ont été suggérés comme des facteurs de prédisposition à l'infection par *S. suis* [2]. Une fois présente dans l'organisme, la bactérie entraîne une infection systémique affectant plusieurs organes [32]. L'infection évolue ensuite sous forme de choc septique comme il a été observé lors des deux épidémies chinoises avec le syndrome de type-choc toxique streptococcique (STSL) [2]. Cependant, la manifestation clinique la plus fréquente s'avère être le développement de méningite [32]. Celle-ci se caractérise par des maux

de tête frontaux, une raideur au niveau de la nuque, des confusions et des convulsions généralisées [24]. Enfin, lorsque les individus survivent à cette méningite, la surdité temporaire ou permanente, est la séquelle la plus commune et est présente dans 50% des cas [24, 64]. Pour le moment aucune transmission entre humains ou d'humain à un porc n'a été prouvée [4].

La prévalence des infections humaines par *S. suis* varie beaucoup d'un continent à l'autre. En effet, comme mentionné précédemment, l'Asie est particulièrement touchée par ces infections zoonotiques avec un nombre de cas humains s'élevant à 1481 [19]. De plus, avec un taux de mortalité entre 20 et 26%, *S. suis* est présentement la première cause de méningite bactérienne chez l'adulte au Vietnam, la deuxième en Thaïlande et la troisième cause de méningite bactérienne acquise dans la collectivité à Hong Kong [2, 6-8, 19, 64]. Cependant, cette situation observée en Asie diffère grandement de celle retrouvée en Occident. Certes plusieurs cas d'infections humaines ont été signalés dans divers pays d'Europe mais leur nombre de 140 cas avec un taux de mortalité de 13%, reste largement inférieur à celui reporté en région asiatique [2, 63, 64]. De même, bien qu'étant le continent avec le plus d'infections à *S. suis* chez les porcs, seuls quelques cas humains sporadiques ont été signalés en Amérique du Nord. Il s'agit entre autres de huit cas humains de méningite dont cinq au Canada et trois aux États-Unis avec aucune mortalité associée [2, 63, 65]. La plupart de ces cas au niveau mondial étaient causés majoritairement par le sérotype 2 mais également par le sérotype 14 qui gagne en importance ces dernières années [24, 66]. À ce jour, au moins 9 sérotypes peuvent infecter l'humain [46].

1.4. Pathogénèse de l'infection

S. suis est un pathogène très invasif capable de traverser plusieurs barrières du système immunitaire et résister aux différentes attaques mises en place par l'hôte dans le but de l'éliminer. La plupart des études sur la pathogénèse de *S. suis* ont été réalisées à l'aide de souches provenant du sérotype 2 de la bactérie. Mais malgré les avancées récentes, les connaissances des mécanismes impliqués dans le développement de l'infection restent toujours limitées [2]. La figure 2 représente un résumé du modèle proposé de la pathogénèse de l'infection causée par *S. suis* sérotype 2.

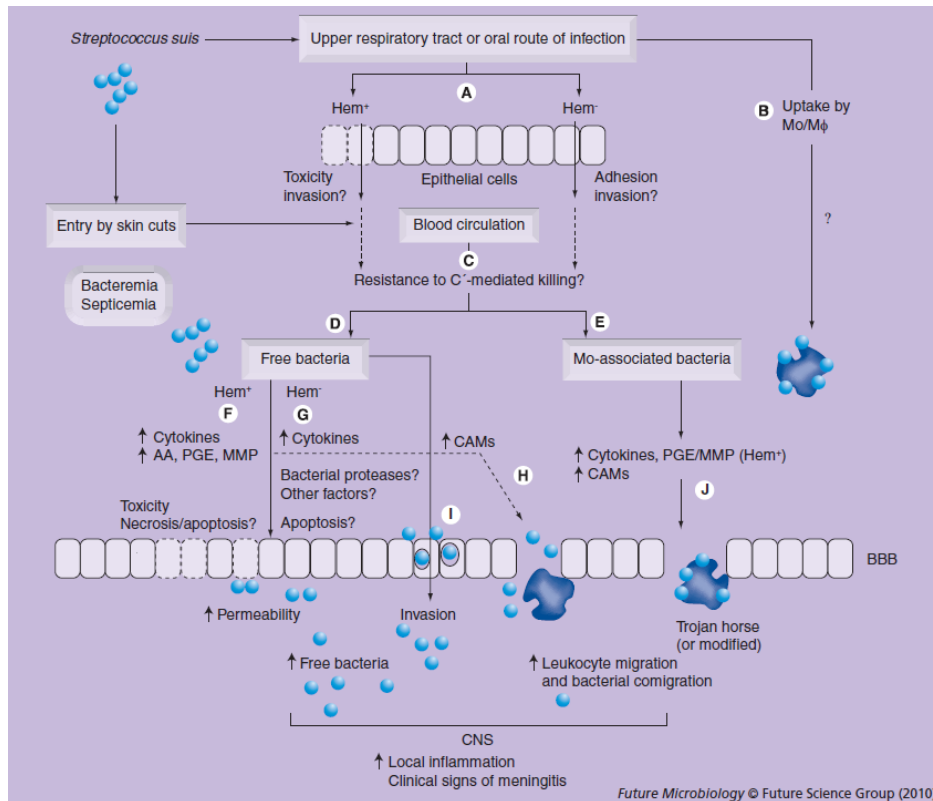


Figure 2 : Schématisation des hypothèses proposées pour les différentes étapes impliquées dans la pathogenèse de l'infection causée par *S. suis* sérotype 2. AA: acide arachidonique; BBB: barrière hématoencéphalique; C': complément; CAM: molécule d'adhésion cellulaire; CNS: système nerveux central; Hem-: souche hémolysine-négative; Hem+: souche hémolysine-positve; Mo: monocyte; Mφ: macrophage; MMP: métalloprotéinase; PGE: prostaglandine E. Adapté à partir de Gottschalk *et al.* (2010).

1.4.1. Colonisation : adhérence et invasion des surfaces épithéliales

Lors de l'infection classique par voie respiratoire chez le porc, *S. suis* doit faire face à la première barrière de défense du système immunitaire composée des cellules épithéliales pour résider dans les amygdales palatines et pharyngées. Celles-ci sont pénétrées par de nombreuses cryptes qui se branchent extensivement avec les tissus lymphoïdes [67]. Des antigènes spécifiques de *S. suis* associés à des marqueurs de fluorescence, mais également des bactéries entières ont fréquemment été observés au niveau de ces cryptes tout comme dans l'épithélium et les zones subépithéliales sous-jacentes [67]. De plus, les bactéries ont également été retrouvées en association avec des macrophages matures des amygdales. Cette association engendrait une infiltration locale et une augmentation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ suggérant le début de la mise en place des réponses humorales et cellulaires déjà au niveau des cryptes épithéliales des amygdales [68].

Ainsi, *S. suis* est capable d'adhérer aux cellules à l'aide d'au moins 20 facteurs identifiés suite aux études sur la capacité d'adhésion de *S. suis* à différentes lignées cellulaires épithéliales (NPT_r, Hep-2 et HeLa) [69]. À ceux-ci s'ajoute plus d'une quarantaine de protéines suggérées dans la liaison aux composantes de la matrice extracellulaire (MEC) telles que la fibronectine, le fibrinogène, la laminine ou encore le collagène [69-72]. Ces adhésines feraient partie de la paroi cellulaire et seraient partiellement masquées par la CPS [73]. Il a donc été suggéré que *S. suis*, serait capable de réguler l'épaisseur de sa CPS en réponse à des signaux environnementaux dans le but d'optimiser l'interaction entre ses adhésines et les récepteurs cellulaires des cellules de l'hôte [69, 74]. D'autres facteurs joueraient également un rôle indirect dans la colonisation de *S. suis* par exemple le régulateur de transcription orphelin RevSC21. La délétion de ce gène entraîne une diminution significative de l'adhésion aux cellules épithéliales et une absence d'activité hémolytique [75].

Une fois colonisés, certains animaux peuvent devenir des porteurs sains tandis que d'autres peuvent développer une bactériémie, septicémie et/ou méningite. Pour que ces pathologies se développent, *S. suis* doit pouvoir se disséminer depuis les amygdales et/ou autres muqueuses, envahir les cellules, pour ensuite atteindre la circulation sanguine et lymphatique. Chez l'humain, *S. suis* accède directement à la circulation sanguine en entrant principalement par des lésions cutanées et mucoales [24]. Autrement, les bactéries nécessitent une brèche de la muqueuse épithéliale qu'il s'agisse de la peau, de la bouche ou de la cavité nasale [43, 57]. Celle-ci peut être réalisée à l'aide de la suilysine sécrétée par *S. suis*, une hémolyse à activité cytotoxique qui permettrait de détruire les jonctions cellulaires pour atteindre la circulation sanguine [57, 73]. Cependant, certaines souches n'expriment pas cette toxine, mais restent capables de se disséminer vers les vaisseaux sanguins par un mécanisme toujours inconnu [57]. Il est néanmoins spéculé qu'elles pourraient envahir les cellules épithéliales par endocytose à l'aide de récepteurs sans pour autant être cytotoxiques pour les cellules [76].

1.4.2. Survie dans le sang et dissémination

Une fois rendue dans la circulation sanguine, *S. suis* doit pouvoir survivre dans cet environnement hostile de telle sorte à causer une bactériémie suivie d'une septicémie. Pour ce

faire, *S. suis* est équipé d'une épaisse CPS servant de bouclier de défense face à l'effet bactéricide des neutrophiles et monocytes/macrophages [77, 78]. En effet, des études soutiennent cette théorie dans la mesure où des mutants isogéniques non encapsulés sont beaucoup plus sensibles à la phagocytose par des monocytes/macrophages porcins et murins, des neutrophiles porcins et des cellules dendritiques porcines et murines [77-80]. De plus, il a été démontré que la CPS purifiée seule serait suffisante pour inhiber la phagocytose par les macrophages en déstabilisant les microdomaines lipidiques présents à la surface cellulaire et empêchant l'internalisation via ces radeaux lipidiques [81]. Chez *Streptococcus agalactiae*, l'acide sialique de sa CPS semblerait être important pour prévenir la déposition de la protéine C3 du complément à la surface de la bactérie bloquant de ce fait l'activation de la voie alternative et conférant une résistance à l'effet bactéricide intracellulaire opsonine dépendante [69]. Basé sur ceci, le rôle de l'acide sialique de *S. suis* a alors été étudié par l'inactivation du gène *neuC* du sérotype 2. L'absence de ce gène est responsable de la perte de l'expression de la CPS entraînant une augmentation de la phagocytose par les macrophages murins et une atténuation de la virulence chez le modèle d'infection murin [82]. Autrement dit, on ne peut dissocier le rôle de la CPS de celui de l'acide sialique pour confirmer que celui-ci serait à l'origine du phénomène observé.

Pour survivre, *S. suis* doit également résister à l'effet bactéricide des neutrophiles et macrophages présents dans la circulation sanguine [69]. La suilysine sécrétée par *S. suis*, pourrait diminuer la capacité bactéricide des neutrophiles et autres cellules phagocytaires ainsi qu'affecter l'effet bactéricide complément dépendant par diminution de l'opsonisation de *S. suis* [77, 80]. De plus, face aux différents stress physiologiques imposés dans le sang tels que le stress oxydatif, *S. suis* dispose de facteurs impliqués dans la tolérance à ce stress de manière à persister dans le milieu. Plusieurs autres facteurs sont également impliqués dans la régulation de l'expression de ces protéines de tolérances aux stress jouant ainsi un rôle essentiel dans la survie de la bactérie [69].

Persister dans le sang n'est pas suffisant pour causer une infection généralisée, telle qu'une septicémie et méningite dont *S. suis* est responsable. En effet, *S. suis* doit pouvoir se disséminer via la circulation sanguine pour envahir plusieurs organes tels que la rate, le foie, les reins, les poumons, le cœur et le cerveau [32]. Cependant, les mécanismes de déplacement

restent encore peu connus. Certaines études ont proposé une théorie du cheval de Troie modifiée (« modified Trojan horse ») dans laquelle *S. suis* serait capable d'adhérer à la surface des monocytes et d'y rester attaché tout au long du transport [2]. Ce phénomène serait rendu possible par une diminution des voies de signalisation centrales impliquées dans la phagocytose des macrophages par la présence de sa CPS [83]. Néanmoins, *S. suis* serait également capable de se déplacer par lui-même [2].

1.4.3. Déclenchement de la réponse inflammatoire et choc septique

L'hôte utilise diverses stratégies dans le but d'éliminer un pathogène infectieux. Parmi elles, l'inflammation induite à la suite de l'activation du système immunitaire est généralement bénéfique lors d'une infection. Celle-ci se caractérise par la libération de médiateurs pro-inflammatoires [86]. Cependant, lorsque ce relâchement est excessivement régulé, il entraîne un déséquilibre homéostatique menant à des conséquences physiologiques néfastes chez l'hôte. C'est ce qui est observé chez les cas humains par le choc septique causé par *S. suis* plus particulièrement lors de la phase systémique de l'infection [2]. De plus, des expériences *in vivo* utilisant un modèle murin d'infection, ont démontré qu'en 24h, *S. suis* induit la production de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires, dont le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) avec un pic de production en début d'infection qui serait responsable de la létalité durant le choc septique [84]. Cet excès d'inflammation expliquerait la mort soudaine des animaux infectés [69]. En effet, cette libération massive de médiateurs s'accompagne d'un dysfonctionnement des organes caractéristiques à une infection à *S. suis*. Malgré le déclenchement de la réponse anti-inflammatoire pour contrôler l'inflammation, lorsque l'équilibre ne peut être rétabli, les dommages tissulaires et la défaillance multiple des organes conduisent à la mort de l'hôte [85].

1.4.4. Invasion du système nerveux central (CNS) et méningite

Pour des raisons inconnues à ce jour, certains individus ne succombent pas à ce choc septique. Cependant, si la charge bactérienne de *S. suis* est suffisamment élevée, la bactérie est de nouveau capable soit librement soit attachée à des monocytes, de migrer vers le système nerveux central (CNS) et induire le déclenchement de méningites [2]. Pour atteindre le CNS, *S. suis* doit traverser la barrière hématoencéphalique (BBB) constituée des cellules endothéliales

microvasculaires du cerveau (BMECs) et/ou la barrière sang-liquide céphalorachidien (sang-CSF) composée par les cellules épithéliales du plexus choroïdien (PCPEC) [32]. Cependant, les mécanismes permettant à *S. suis* de traverser ces barrières restent incertains.

En ce qui concerne la BBB, des études réalisées sur les interactions entre *S. suis* et les BMEC humaines (HBMECs) et porcines (PBMECs), ont montré que la bactérie serait capable d'adhérer à ces cellules et de les endommager une fois de plus à l'aide de la suilysine [69]. Autrement dit, au lieu d'envahir directement les cellules, les souches porteuses de cette toxine accèderaient au CNS grâce à l'activité cytotoxique de celle-ci. Plus récemment, il a été démontré que l'énolase de *S. suis* serait capable d'augmenter la perméabilité de la BBB et permettre à la bactérie de se rendre au CNS [87]. Une fois *S. suis* adhérent aux cellules BMECs, des composantes de sa paroi cellulaire induisent la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires dont les interleukines IL-6, IL-8 et la chimiokine CCL2 et stimulent l'expression de molécules adhésives [88]. Cette libération de médiateurs inflammatoires et cette régulation à la hausse de l'expression de molécules d'adhésion joueraient un rôle important dans l'initiation des changements de la perméabilité et des propriétés d'adhésion des BMECs [88, 89]. En effet, en réponse à une infection au niveau du CNS, l'inflammation qui s'en suit favorise l'entrée des cellules immunitaires dans le CNS [88]. Cette infiltration pourrait alors être utilisée par la bactérie pour traverser la BBB et moduler l'inflammation locale [90].

D'autres études se sont plutôt intéressées à la barrière sang-CSF en utilisant des PCPEC. Ces cellules sont fortement attachées les unes aux autres par des jonctions serrées afin d'empêcher le passage de microbes ou toxines [91]. Néanmoins, suite à une infection à *S. suis*, il est possible d'observer un important réarrangement du cytosquelette d'actine et des protéines impliquées dans la formation des jonctions serrées affectant de ce fait l'intégrité des PCPEC [92, 93]. Ceci pourrait permettre le déplacement des bactéries jusque dans le CSF [92]. *S. suis* est également capable d'adhérer à ces cellules et de les traverser de leur face basolatérale (sang) à leur face apicale (liquide céphalorachidien) [93]. Tout comme pour la BBB, la bactérie induit également la mort des cellules via l'utilisation de la suilysine [92]. De même, l'étude du transcriptome de cellules infectées par *S. suis* a permis de démontrer que les gènes régulés sont principalement impliqués dans la réponse inflammatoire et dans la production de médiateurs inflammatoires qui

pourrait faciliter la migration des cellules du système immunitaire telles que les neutrophiles, dans le CSF [94, 95]. Le CNS possède son propre système immunitaire inné doté de cellules spécialisées qui lorsque stimulées par un pathogène, déclenchent la production de cytokines pour contrôler l'infection et promouvoir la réparation du CNS. Cependant, l'inflammation induite pour se débarrasser de *S. suis* n'est plus contrôlée par l'organisme engendrant des pathologies dont principalement la méningite[96].

1.5. Principaux facteurs de virulence

La pathogenèse de l'infection causée par *S. suis* est assurée via un large éventail de facteurs de virulence dont l'identification a été l'objectif principal de différentes études au cours des dernières années. La plupart de ces études ont été réalisées avec des souches de sérotype 2 et peu d'informations concernant les facteurs de virulence chez les autres sérotypes sont disponibles pour le moment. Cependant, plusieurs facteurs ont été considérés comme étant importants dans la pathogenèse de *S. suis* sans pour autant être critiques pour la virulence de la bactérie. En effet, la majorité de ces facteurs sont considérés comme des « facteurs putatifs » ou accessoires [32]. Néanmoins, quelques-uns ont été bien caractérisés dont la CPS qui représente le seul facteur déterminé comme étant essentiel pour la virulence [57].

1.5.1. Capsule polysaccharidique (CPS)

S. suis est une bactérie encapsulée dont la capsule intervient dans plusieurs mécanismes importants pour la virulence de la bactérie. De nature polysaccharidique, la synthèse de la CPS de *S. suis* sérotype 2 est régulée par diverses protéines codées par le locus *cps* [97]. La capsule est constituée de cinq sucres différents à savoir du galactose, du glucose, du N-acétylglucosamine, du rhamnose et un acide sialique, et de l'acide N-acétylneuraminique [57, 97]. Cette composition chimique lui permet d'avoir un caractère hydrophile à l'avantage de la bactérie. En effet, la capsule permet de masquer les composés de la paroi cellulaire principalement constituée de composés lipidiques, c'est-à-dire hydrophobes [57]. D'ailleurs, des études effectuées avec des mutants isogéniques non encapsulés ont démontré une augmentation de l'hydrophobicité de ces souches ainsi qu'une augmentation de leur phagocytose par des cellules phagocytaires telles que les neutrophiles, macrophages et cellules

dendritiques murins et porcins [77, 79, 80, 98, 99]. Autrement dit, la présence de la capsule permet de protéger la bactérie contre la phagocytose des cellules immunitaires de l'hôte. De plus, la capsule serait capable de moduler l'activation des voies intracellulaires impliquées dans la phagocytose par les macrophages murins [83].

L'acide sialique présent au niveau de la capsule de certains sérotypes, dont les sérotypes 2 et 14 impliqués également dans les infections humaines, participerait à l'adhésion de la bactérie à la surface des macrophages murins [100]. Cette adhésion permettrait à la bactérie de circuler dans la circulation sanguine de manière attachée aux cellules comme le suggère le modèle du « Cheval de Troie modifié » [57]. De plus, une certaine similarité entre le groupement terminal de l'acide sialique en liaison α -2, 6 et les épitopes des sucres présents à la surface des cellules des mammifères, indiquerait un mimétisme moléculaire qui pourrait mener à l'absence de reconnaissance de l'antigène par le système immunitaire de l'hôte [69]. En effet, la CPS de *S. suis* sérotype 2 a été rapportée comme étant pauvrement immunogène chez le porc [101]. Ainsi, la capsule permettrait à la bactérie d'échapper à la reconnaissance du système immunitaire adaptatif de l'hôte.

De plus, elle est également capable de moduler la réponse inflammatoire induite suite à la reconnaissance de la bactérie par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs) des cellules de l'hôte. En effet, une diminution de médiateurs pro-inflammatoires dont TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-8 ainsi que CCL2 a été observée lors d'études réalisées avec des mutants non encapsulés [102, 103]. Cette diminution serait liée à la non exposition des composés activateurs de la paroi cellulaire en raison de la présence de la capsule.

Enfin, l'importance critique de la CPS a été déterminée lors d'infections *in vivo* chez le porc et la souris à l'aide de mutants non encapsulés devenant complètement avirulents de par leur élimination rapide de la circulation sanguine [97]. À cela s'ajoute une corrélation positive entre l'épaisseur de la CPS et la virulence de la bactérie dans la mesure où une augmentation de l'épaisseur de la CPS suite à une croissance *in vivo* a été notée pour des souches virulentes, mais pas pour des souches avirulentes. Cette augmentation a été également associée à une résistance à l'effet bactéricide des leucocytes polymorphonucléaires (PMN) porcins [104]. Cependant, bien

que la CPS semble être un facteur de virulence critique pour *S. suis*, la majorité des souches non-virulentes sont aussi encapsulées suggérant que d'autres facteurs de virulence sont également essentiels à la bactérie et que la virulence serait d'ordre multifactorielle [57].

1.5.2. Suilysine

S. suis sécrète une panoplie de composés dont une toxine hémolysine appelée suilysine. Avec une taille de 54 kDa, elle appartient au groupe de toxines cytolytiques liant le cholestérol de la membrane cellulaire eucaryote. Cette toxine n'est cependant pas retrouvée chez tous les sérotypes de *S. suis*. Le gène codant pour cette hémolysine est similaire à celui codant pour la pneumolysine chez *Streptococcus pneumoniae* à l'exception que cette dernière n'est pas sécrétée contrairement à la suilysine. Cette dernière se rapproche également de la streptolysine O de *Streptococcus pyogenes*, la listeriolysine de *Listeria monocytogenes* et le perfringolysine de *Clostridium perfringens* [105]. Ces toxines, de même que la suilysine sont caractérisées par une perte d'activité et un regain de celle-ci suite à l'oxydation et à la réduction respectivement. Elles sont inhibées par de faibles quantités de cholestérol et responsables de la formation de pores transmembranaires [106, 107].

Tout comme n'importe quel autre facteur de virulence putatif, le rôle de la suilysine dans la pathogenèse de l'infection causée par *S. suis* a été investigué, mais reste tout de même complexe. En effet, une cytotoxicité envers les cellules endothéliales et épithéliales de même qu'envers les neutrophiles, monocytes et macrophages a été observée en réponse à cette toxine [73, 77, 89, 100, 108]. De plus, la suilysine purifiée et les souches exprimant cette toxine, induiraient la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires par les HBMEC et PBMEC, les macrophages alvéolaires porcins et les cellules dendritiques murines [109, 80, 88, 110-112]. Récemment, le rôle de la suilysine dans la protection face à l'opsonophagocytose par les cellules dendritiques murines a été mis en évidence [80]. L'ensemble de ces données soutient le statut de facteur de virulence essentiel de la suilysine au niveau de la dissémination bactérienne, de l'induction de l'inflammation ainsi que de l'invasion des différents tissus de l'hôte [113].

Au niveau *in vivo*, le rôle de cette toxine reste très controversé. En effet, aucune mort n'est observée chez des souris de modèle systémique infectées par le surnageant d'une culture

d'une souche sécrétant de la suilysine. Cependant, aucune toxicité n'est obtenue pour les macrophages murins infectés à l'aide d'un mutant généré par remplacement allélique du gène *sly* codant pour la suilysine. De même, ce mutant est avirulent chez le modèle murin mais démontre une virulence légèrement réduite lors de l'infection systémique chez le porc [114]. Enfin, lors d'une étude de challenge chez le porc, la souche mutante induit une maladie similaire à celle de la souche mère accompagnée de signes cliniques et d'isolements de la bactérie de différents tissus [112]. Ainsi, il est difficile de pouvoir considérer cette toxine en tant que facteur de virulence critique compte-tenu de la variation obtenue au niveau des études.

1.5.3. Paroi cellulaire

Masqué par la capsule polysaccharidique (CPS), la paroi cellulaire dispose d'une variété de composés bactériens possiblement impliqués dans la pathogénèse de *S. suis*. Parmi eux, on retrouve la couche épaisse de peptidoglycane traversée par d'autres facteurs de virulence putatifs tels que des adhésines, protéines, acides lipothéichoïques, lipoprotéines, attachés à la membrane plasmique [109, 102].

1.5.3.1. D-alanylation de l'acide lipotéichoïque (LTA)

L'acide lipotéichoïque (LTA) est une molécule amphiphile présente chez la plupart des bactéries Gram positives et considérée comme l'équivalent du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives. Il s'agit d'un polymère de polyphosphoglycérol chargé négativement et pouvant être substitué avec un ester D-alanyl (D-Ala) lui conférant alors une charge positive [115]. Cette D-alanylation du LTA, codée par le gène *dltA*, permettrait aux bactéries Gram positives de moduler leur charge de surface et leur attachement avec des ligands augmentant alors leur virulence [116]. En effet, les peptides antimicrobiens cationiques (CAMPs) peuvent exercer des effets bactéricides sur des bactéries négativement chargées via les interactions des charges. Ainsi, en modifiant leur charge de surface de telle sorte à ce que celle-ci devienne positive est un mécanisme important utilisé par les bactéries pour résister aux CAMPs et la phagocytose par les neutrophiles.

C'est le cas notamment de *S. suis* sérotype 2. Des mutants déficients pour le gène *dltA* ne peuvent pas modifier leur charge de surface résultant en une plus grande susceptibilité aux

CAMPs mais aussi moins de résistance au « killing » par les neutrophiles porcins [117]. Cette D-alanylation du LTA favorise également l'adhérence et l'invasion des cellules endothéliales microvasculaire du cerveau de porc (PBMEC) via possiblement une stabilisation de la charge de l'enveloppe cellulaire permettant d'afficher efficacement des adhésines et invasines [118]. Enfin, lors d'infections chez des modèles expérimentaux de souris et de porc, les souches mères présentent une virulence plus élevée que celle des mutants de la D-alanylation du LTA possiblement due à la facilitation de la pénétration des barrières de l'hôte [117].

Le LTA a longtemps été considéré comme impliqué dans le développement du choc septique chez les infections à *S. suis* en activant les leucocytes et induisant la production exacerbée de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires chez l'hôte [119, 120]. Cependant, une étude réalisée très récemment a pu mettre en évidence que le LTA de *S. suis* sérotype 2 ne serait pas en mesure d'induire la production de cytokines par les cellules dendritiques murines [121]. Cette erreur d'interprétation préalable concernant les propriétés immunostimulatrices du LTA serait liée à une mauvaise purification de ce dernier empêchant l'élimination des lipoprotéines contaminantes comme il a été observé chez *Staphylococcus aureus* [122]. Les lipoprotéines, et non le LTA, participeraient donc possiblement au développement de la réponse inflammatoire exacerbée de l'hôte.

1.5.3.2. N-déacétylation du peptidoglycane

Le peptidoglycane est le principal composant de la paroi cellulaire des bactéries Gram positives assurant la rigidité et stabilité de celle-ci [118]. Il s'agit d'une longue chaîne polysaccharidique constituée de deux sucres alternants, le N-acétylglucosamine (NAG) et l'acide N-acétylmuramique (NAM), réticulés par des sous-unités peptidiques formant des ponts [113]. Cette structure polysaccharidique est hautement conservée chez les bactéries à l'exception des sous-unités peptidiques dont la composition varie. Pour cette raison, l'hôte a développé des mécanismes dans le but de reconnaître cette structure conservée afin de se débarrasser des agents infectieux. En effet, le peptidoglycane dispose de caractéristiques propices à sa reconnaissance par les cellules de l'hôte via les protéines de domaines de liaison des nucléotides et d'oligomérisation (NOD) 1 et 2. Celles-ci reconnaissent les muropeptides libérés durant la

rotation de la paroi cellulaire ou les fragments minimes du peptidoglycane libérés via l'activité hydrolytique du lysosyme [123].

Cependant, pour détourner les défenses de l'hôte, les bactéries ont développé d'autres mécanismes pour modifier la structure de leur peptidoglycane et donc leur reconnaissance. Il s'agit entre autres de l'O-acétylation à la position C-6 de NAM catalysé par l'O-acétyltransférase A (OatA) ainsi que la N-désacétylation de NAG et la réduction du NAM en glucosamine ou acide muramique via l'action de la protéine PgdA [102]. Ces modifications du peptidoglycane peuvent aider la bactérie à échapper à la surveillance des récepteurs NOD1 et NOD2 et/ou augmenter la résistance au lysozyme [124]. Un homologue du gène *pgdA* a été identifié chez *S. suis* sérotype 2 et serait régulé à la hausse lors d'infections des cellules PBMEC et neutrophiles ainsi que lors d'infections *in vivo* chez des modèles de souris. Enfin, les mutants déficients pour le gène *pgdA* ont une virulence fortement diminuée en comparaison à la souche sauvage lors d'infection chez le porc et la souris ainsi qu'une survie diminuée dans le sang [125].

1.5.4. Autres facteurs de virulence

Plusieurs autres composés bactériens ont été suggérés comme facteurs de virulence chez *S. suis*. Cependant, le statut critique de ces derniers dans la virulence reste difficile à confirmer en raison de l'incertitude et du manque de consensus en ce qui a trait au terme « virulence ». En effet, ce concept varie d'un laboratoire de recherche à l'autre utilisant des paramètres expérimentaux différents qui peuvent mener à des conclusions divergentes [2, 126]. Parmi ces paramètres, le choix des modèles *in vitro* et *in vivo* employés peut affecter les résultats obtenus. À titre d'exemple au niveau *in vitro*, le rôle de trois facteurs de virulence putatifs, à savoir la dipeptidyl peptidase 4 (DppIV), l'autolysine (Atl) et une protéine de liaison au facteur H (Fhb) a été investigué. Pour ce faire, différents types de lignées cellulaires (murines, humaines et porcines), MOI (« multiplicity of infection ») et temps d'incubation ont été utilisés dans chaque étude empêchant l'obtention d'un consensus au niveau des résultats différents obtenus [127].

Au niveau *in vivo*, bien que *S. suis* soit retrouvé naturellement chez le porc, d'autres animaux tels que le poisson-zèbre, la souris ou encore le cochon d'Inde ont été utilisés en tant que modèles d'infection expérimentale pour l'identification des facteurs critiques dans la virulence

de *S. suis*. Chacun de ces modèles présente des avantages et inconvénients au niveau du coût, de la reproductibilité des résultats ou plus important de la reproductibilité des signes cliniques associés à la maladie [127]. La majorité des études *in vivo* chez *S. suis* est réalisée chez le porc ou la souris. Pour celle-ci, la lignée C57BL/6 permet de réduire la variabilité des résultats liée à la diversité génétique des individus étant donné qu'il s'agit d'une lignée endogame. En plus de l'organisme choisi comme modèle d'infection, la voie d'inoculation employée varie également entre les études. Des infections intranasales, intraveineuses et intrapéritonéales sont fréquemment appliquées chez le porc et la souris. Or dépendamment de la voie d'inoculation adoptée, les cellules rencontrées et activées par *S. suis* ne seront pas les mêmes affectant ainsi la réponse de l'organisme infecté.

Outre la méthode expérimentale, le rôle de certains facteurs dans la virulence varie dépendamment des sérotypes de *S. suis* voire même à l'intérieur d'un même sérotype [127]. C'est le cas notamment de la protéine Atl de *S. suis*. En effet, son rôle a été investigué à l'aide de trois souches de séquence type différentes de *S. suis* sérotype 2 : une souche ST1 (forte virulence), une ST7 (très forte virulence) et une ST25 (virulence intermédiaire) [128]. La protéine Atl aurait un impact dans la formation de biofilm uniquement pour les souches provenant des ST7 et ST25 et non du ST1. Ce qui soutient l'effet de la variabilité génétique des souches sur le rôle des facteurs de virulence étudiés.

Tout comme la protéine Atl, l'antigène I/II (Agl/II) de *S. suis*, bien que présent chez plusieurs sérotypes, n'a pas le même poids dans la virulence du pathogène dépendamment de la souche. En effet, son rôle se trouve être modeste chez le sérotype 2, et pourtant essentiel chez le sérotype 9 au niveau de l'adhésion et invasion des cellules épithéliales, de la formation de biofilm ou encore de la survie à pH acide [129]. Cette variabilité observée entre les souches pourrait être liée à la redondance observée chez *S. suis*. Autrement dit, différents facteurs peuvent être impliqués dans la virulence tout en ayant des rôles et cibles très similaires de telle sorte à créer un effet compensatoire en absence d'un des facteurs. Ainsi, le rôle de l'Agl/II dans l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales pour le sérotype 9 pourrait être compensé par d'autres adhésines, telles que le facteur H, chez le sérotype 2 ajoutant davantage de complexité à l'identification de facteurs de virulence généraux chez tous les sérotypes. Enfin, certains facteurs

de virulence proposés sont présents à la fois chez des souches virulentes et non-virulentes. Ainsi, la détermination de facteurs de virulence critiques chez *S. suis* reste un processus difficile et controversé.

2. Réponse immunitaire innée

2.1. Caractéristiques générales

Lorsque confronté à un agent infectieux, l'hôte dispose de deux principaux mécanismes de défense pour l'éliminer : la réponse immunitaire innée et adaptative. Le système immunitaire inné représente la première ligne de défense contre les pathogènes, jouant de ce fait un rôle crucial dans la reconnaissance de ces microorganismes et le déclenchement subséquent de la réponse inflammatoire [130-132]. Ce système est constitué à la fois de barrières physiques et chimiques dont l'épiderme, les muqueuses et les sécrétions antimicrobiennes ainsi que de plusieurs types cellulaires tels que les monocytes/macrophages, granulocytes, les cellules dendritiques et les cellules tueuses naturelles (NK), qui reconnaissent les pathogènes et permettent la mise en place d'une réponse rapide et relativement non spécifique [131, 132]. Cette réponse est induite par la reconnaissance de motifs moléculaires spécifiques associés aux pathogènes (PAMP). Les PAMPs sont des structures microbiennes exogènes qui ont été peu modifiées au cours de l'évolution de telle sorte à ce que les cellules de l'hôte soient en mesure de les reconnaître via des récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRR). Ces récepteurs sont exprimés à la surface cellulaire, dans les compartiments intracellulaires, ou sécrétés dans la circulation sanguine [131]. Ils sont responsables de plusieurs fonctions dont l'opsonisation, l'activation de la cascade du complément, la phagocytose ainsi que l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires menant à la sécrétion de cytokines et chimiokines. Cette signalisation par les PRRs induit aussi la maturation des cellules présentatrices d'antigènes qui sont responsables de l'induction de la seconde ligne de défense de l'hôte, soit l'immunité adaptative [133].

Outre les pathogènes, l'hôte peut également être confronté à des dommages au sein de lui-même. On parle dans ce cas de signaux de danger (DAMP) dont les motifs moléculaires peuvent être reconnus par les cellules de l'immunité innée afin de les activer. Les DAMPs sont donc des molécules dérivées des cellules en réponse à un trauma, une ischémie, un cancer ou d'autres

situations où des tissus sont endommagés. Suite à l'interaction des DAMPs avec leurs récepteurs, des voies de signalisation cellulaire sont activées, menant à la survie ou à la mort cellulaire par apoptose [134].

2.2. Phagocytes professionnels

Comme mentionné précédemment, le système immunitaire inné est constitué d'une variété d'effecteurs cellulaires appelés globules blancs qui agissent en coopération de telle sorte à éliminer l'agent infectieux le plus efficacement possible et ramener l'équilibre homéostatique. Ces leucocytes peuvent être divisés en deux groupes principaux. Le premier groupe comporte les cellules mononuclées, c'est-à-dire possédant un noyau unique tandis que le deuxième regroupe les cellules polynuclées. Afin de simplifier ce système complexe, seuls les leucocytes considérés comme impliqués dans la réponse à *S. suis* ont été choisis ci-dessous pour plus amples renseignements.

2.2.1. Monocytes

Appartenant au groupe des cellules mononuclées, les monocytes représentent l'un des leucocytes les plus nombreux localisés majoritairement dans la circulation sanguine [135]. Initialement, ils se développent depuis les cellules hématopoïétiques au niveau de la moelle osseuse. Ils subissent par la suite plusieurs étapes de maturation en passant par le progéniteur myéloïde partagé avec les cellules granulocytes avant de rejoindre la circulation périphérique [136]. La demi-vie d'un monocyte circulant a été estimée à 3 jours chez l'humain et 1 jour chez la souris [136]. Cette faible durée de vie serait due au fait que les monocytes fonctionnent majoritairement en tant que réservoir de précurseurs myéloïdes pour permettre le réapprovisionnement constant, en conditions normales, des populations de macrophages résidant au niveau des tissus ainsi que des cellules dendritiques [136]. En effet, suite à une infection, les monocytes migrent rapidement vers le site concerné et se différencient soit en macrophages ou soit en cellules dendritiques de telle sorte à mettre en place la réponse immunitaire innée et adaptative. Cependant, des études récentes ont mis en évidence que les rôles des monocytes seraient beaucoup plus complexes que de servir uniquement de source pour

les macrophages et cellules dendritiques tissulaires [135]. Cette complexification est d'ailleurs liée en partie à l'hétérogénéité et la plasticité des monocytes.

En effet, bien que le terme « monocyte » ait été préalablement choisi pour désigner une population homogène de cellules, il a été démontré récemment que celle-ci pouvait être divisée en différentes sous-populations selon le type de marqueurs exprimés à la surface des cellules [136]. Chez la souris, les monocytes sont séparés en deux sous-groupes : les monocytes inflammatoires caractérisés principalement par la forte expression du marqueur de surface Ly6C⁺ et les monocytes patrouilleurs chez lesquels ce marqueur Ly6C⁻ est faiblement exprimé [137]. Chez l'humain, ces deux mêmes types de monocytes ont été identifiés selon l'expression des marqueurs antigéniques de surface CD14 (corécepteur du LPS) et CD16 (FcγRIII). Les monocytes qualifiés de classiques correspondent aux monocytes inflammatoires des souris et possèdent un fort niveau d'expression de CD14 mais un faible niveau de CD16 (CD14⁺⁺ CD16⁻). Au contraire, les monocytes non classiques équivalent aux monocytes patrouilleurs chez la souris, expriment moins fortement le CD14 mais beaucoup plus le CD16 que les monocytes classiques (CD14⁺ CD16⁺⁺). Une troisième sous-population de monocytes qualifiés d'intermédiaires a également été différenciée chez l'humain montrant de hauts niveaux d'expression de CD14 mais une plus faible quantité de CD16 (CD14⁺⁺ CD16⁺).

En plus d'être différenciées au niveau de l'expression des récepteurs cellulaires, les sous-populations de monocytes présentent des propriétés fonctionnelles différentes. En effet, comme les noms l'indiquent, les monocytes inflammatoires participent directement à la réponse inflammatoire en migrant vers le site d'infection et en sécrétant des cytokines IL-6 et TNF- α ainsi que des espèces oxygènes réactives (ROS) afin d'éliminer les pathogènes présents [137]. En effet, des études réalisées chez les souris démontrent que durant l'inflammation, les monocytes deviennent les phagocytes mononucléaires dominant au niveau des tissus [135]. Ils peuvent également acquérir la capacité de présenter les antigènes et de migrer vers les nœuds lymphatiques pour commencer la réponse adaptative [138]. Enfin, certains ne restent pas sous forme de monocyte mais se différencient en macrophages ou DC comme mentionné précédemment. En revanche, le rôle des monocytes patrouilleurs reste incertain. Certaines études semblent indiquer qu'ils resteraient dans la circulation sanguine et seraient impliqués

dans la surveillance de dommages tissulaires [139] alors que d'autres soutiennent leur contribution dans la réponse anti-inflammatoire pour contrôler l'inflammation via la production de la cytokine IL-10 [140]. Cependant, il semble que ces deux sous populations ne seraient pas si différentes l'une de l'autre en ce qui a trait à leur origine. En effet, les monocytes inflammatoires dont leur demi-vie est estimée à 2 jours seraient en fait les précurseurs des monocytes patrouilleurs dotés d'une demi-vie plus longue de 11 jours [141]. Autrement dit, pour allonger leur durée de vie, les monocytes inflammatoires seraient capables de se différencier en monocytes patrouilleurs une fois l'inflammation terminée de telle sorte à disposer d'un nombre suffisant de monocytes patrouilleurs pour surveiller avec efficacité l'intégrité de l'organisme [141].

Ainsi, contrairement à ce qui était suggéré dans le passé, les monocytes sont capables d'effectuer par eux-mêmes une panoplie de fonctions pour maintenir l'homéostasie de l'organisme que ce soit en réparant les tissus endommagés ou en éliminant tout agent infectieux par la mise en place de la réponse immunitaire innée, mais aussi adaptative [135].

2.2.2. Macrophages

Tout comme les monocytes, les macrophages, découverts à la fin du 19e siècle par Ilya Metchnikoff, contribuent à la fois à l'homéostasie et au déroulement des maladies [142]. Il s'agit de larges cellules phagocytaires professionnelles dotées d'une durée de vie de plusieurs mois dont l'une des fonctions principales est d'éliminer tous débris cellulaires et corps étrangers présents à l'intérieur de l'organisme. Pour ce faire, ils sont distribués dans les tissus à travers le corps afin de surveiller les invasions microbiennes ou l'accumulation de particules étrangères. Chaque tissu possède sa propre population spécifique de macrophages dérivée du développement embryonnaire. Ces populations sont alors différenciées l'une de l'autre par des appellations spécifiques telles que les cellules de Kupffer pour les macrophages du foie ou les microglies au niveau du CNS [130]. Récemment, des études semblent indiquer que cette différenciation observée serait due à la capacité de régénération des macrophages tissulaires de telle sorte à maintenir leur population [142]. Cependant, la plupart des études soutiennent le fait que les macrophages seraient dérivés des monocytes circulants comme mentionné

précédemment. En effet, lors d'une infection ou à la suite d'une blessure, les monocytes sortent de la circulation sanguine par diapédèse pour se rendre au niveau du tissu infecté dans lequel ils se différencient en macrophages [143]. Ces derniers ingèrent alors les pathogènes qui se retrouvent piégés dans leur phagosome avant que celui-ci ne fusionne avec le lysosome. Une fois à l'intérieur du phagolysosome, des enzymes et radicaux libres toxiques digèrent le pathogène assurant ainsi son élimination [143]. Les macrophages sont capables d'éliminer plus de 100 bactéries avant de mourir par l'action de leurs propres composés digestifs. De plus, ils sont capables de récupérer les particules des pathogènes et de les exposer au niveau de leur surface cellulaire, attachées au complexe majeur d'histocompatibilité de type II (MHCII). Ils migrent ensuite vers les nœuds lymphatiques pour activer les cellules T helper de type 1 (Th1) et enclencher la réponse adaptative [130].

Les macrophages interviennent également dans la réponse inflammatoire en sécrétant plusieurs cytokines et chimiokines nécessaires au recrutement d'autres leucocytes au site d'infection, mais aussi à l'activation d'autres macrophages. Une fois activés, ils adoptent des phénotypes contexte-dépendant qui vont soit promouvoir ou soit inhiber la défense immunitaire et les réponses inflammatoires de l'hôte [143]. C'est pour cette raison que les macrophages ne sont pas divisés en sous-populations stables et discrètes, mais en plusieurs phénotypes activés. En effet, il a été démontré qu'ils seraient en mesure de changer d'un phénotype fonctionnel à l'autre en réponse à des signaux du microenvironnement local [144]. On peut néanmoins différencier deux groupes principaux de macrophages désignés M1 et M2. Les macrophages activés de manière classiques ou M1 « killer », sont activés par le LPS ou l'interféron- γ et produisent IL-12 et de faibles quantités d'IL-10. Ils ont des fonctions pro-inflammatoires, bactéricides et phagocytaires. Ils participent également dans l'immunité anti-tumeur [143]. Les macrophages M2 « repair » quant à eux aussi désignés comme macrophages activés alternativement, sont stimulés par l'IL-4 ou l'IL-13 et sont impliqués dans des processus constructifs tels que la réparation des tissus [143]. Ils permettent de maintenir les tissus en bonne santé en éliminant les cellules mortes et les matériaux toxiques [143]. De plus, ils seraient aussi impliqués dans l'atténuation de la réponse inflammatoire excessive en sécrétant la cytokine anti-

inflammatoire IL-10 pour protéger l'intégrité des tissus et assurer le retour homéostatique à la suite d'une infection ou blessure [130, 143].

Ainsi, les macrophages sont le principal effecteur cellulaire de l'immunité innée et sont impliqués à la fois dans les processus pro- et anti-inflammatoires. Ils assurent également l'homéostasie des tissus, supportent leur développement et réparent les dommages présents [130]. Récemment, l'évidence de la spécificité des macrophages envers l'organe ou le tissu dans lequel ils s'établissent a modifié notre vision de ces cellules avec la découverte de nouveaux phénotypes fonctionnels selon le micro-environnement dans lequel elles résident [142, 145].

2.2.3. Cellules dendritiques

Décrites pour la première fois dans la rate de souris au début des années 1970 par Ralph Steinman, les cellules dendritiques représentent un type de leucocyte caractérisé par une morphologie étoilée ou « dendritique » [146]. Elles sont dérivées de la moelle osseuse et retrouvées dans tous les tissus lymphoïdes et la plupart des tissus non-lymphoïdes [147]. Bien qu'originellement considérées comme un groupe de cellules homogènes, les peuvent être classées en différentes sous-populations selon leur stade de différenciation, leur phénotype et leurs fonctions [148]. Autrement dit, les DC sont plutôt définies par leurs propriétés fonctionnelles et une combinaison de marqueurs cellulaires, dont une forte expression de CD11c et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) [147].

Tout comme les autres leucocytes, les DC participent activement à une multitude de fonctions immunologiques pour assurer l'homéostasie de l'organisme. En effet, lorsque les conditions sont stables, les DC immatures provenant de leurs progéniteurs de la moelle osseuse circulent librement dans le corps. Elles migrent ensuite vers les tissus pour échantillonner l'environnement à la recherche d'antigènes étrangers [148]. En absence d'inflammation ou de pathogène, les DC présentent de grandes capacités phagocytaires et expriment de faibles niveaux de molécules du CMH et de co-stimulation CD80, CD86 et CD40. Elles sont également particulièrement importantes pour l'induction de la tolérance aux antigènes de soi [148]. En revanche, suite à la reconnaissance d'un signal de danger, les DC subissent plusieurs changements physiologiques afin d'effectuer leur fonction principale de cellules présentatrices

d'antigènes [149]. En effet, tout comme les macrophages, les DC sont capables de phagocyter les agents infectieux. Au lieu de détruire ces derniers au complet, elles ne dégradent les protéines que de façon partielle de telle sorte à préserver l'information contenue dans les peptides [149]. Ces derniers sont ensuite présentés sur les molécules MHC-II à la surface des cellules. Durant ce processus de maturation, les DC produisent non seulement une grande quantité de cytokines, mais régulent également à la hausse leurs molécules co-stimulatrices et MHC-II de telle sorte à favoriser l'activation des cellules T [148]. En effet, elles migrent ensuite vers les organes lymphoïdes adjacents pour commencer la réponse adaptative T-dépendante. Elles sont aussi impliquées dans la modulation des réponses des cellules B et des cellules « Natural Killer » (NK) [148].

Selon ces fonctions décrites précédemment, quatre principaux sous-types spécialisés de DC ont été décrits chez la souris. À l'état d'équilibre, on parle des DC classiques ou conventionnelles spécialisées dans l'apprêtement et la présentation antigénique aux cellules T. Les DC plasmacytoïdes quant à elles, sont très peu efficaces en termes de présentation antigénique, mais sont impliquées lors d'infection virale en sécrétant de fortes quantités d'IFN de type I [150]. Au niveau de la peau, on retrouve les cellules de Langerhans dérivées d'un précurseur myélomonocytaire qui migrent vers les nœuds lymphatiques pour présenter leurs antigènes tout comme les DC classiques. Enfin, les DC dérivées des monocytes sont induites en réponse à l'inflammation et constituent potentiellement un réservoir de cellules présentatrices d'antigènes nécessaire en cas d'urgence [150]. Ainsi, les DC jouent un rôle important dans la défense de l'hôte face aux pathogènes. Elles sont entre autres le lien crucial entre la réponse innée et la réponse adaptative [79].

2.2.4. Neutrophiles

Contrairement aux autres cellules présentées ci-dessus, les neutrophiles appartiennent à la famille des leucocytes polymorphonucléés (PMN). Autrement dit, ils sont caractérisés par un noyau divisé en plusieurs lobes et par la présence de différentes classes de granules intracytoplasmiques porteuses d'enzymes et autres agents potentiellement toxiques impliqués dans la défense de l'hôte [151]. Les neutrophiles proviennent des cellules hématopoïétiques de

la moelle osseuse qui selon le type de facteurs de croissance et cytokines présents dans l'environnement vont se différencier en myéloblastes, un type de cellule destiné à évoluer en granulocytes [151]. Une fois matures, ils se rendent au niveau de la circulation sanguine dans laquelle ils participent à la surveillance contre tout corps étranger ou signe d'une réponse inflammatoire dans l'organisme [151]. En présence d'une infection, les cellules endothéliales présentes au niveau du site produisent des molécules d'adhésion du côté luminal de telle sorte à ce que lorsque les neutrophiles traversent le système circulatoire, ces derniers puissent reconnaître ces signaux inflammatoires grâce à leurs adhésines de surface. S'ensuit la caractéristique de « rolling » des neutrophiles le long de l'endothélium jusqu'à ce qu'ils se fixent afin de traverser les cellules endothéliales. Ils réalisent alors la diapédèse tout comme les monocytes pour pénétrer à l'intérieur des tissus infectés [152].

Les neutrophiles sont attirés par chimiotaxie au niveau du site d'infection par plusieurs chimiokines CXC telles que CXCL8, CXCL1 ou même CXCL2 dédiées non seulement à leur recrutement, mais également à leur activation [152]. Une fois en présence des agents infectieux, les neutrophiles ont recours à une panoplie de fonctions différentes pour se débarrasser des pathogènes. La plus commune et partagée avec d'autres leucocytes est la fonction de phagocytose. Les neutrophiles ingèrent les débris ou pathogènes et les détruisent via l'action de protéases ou de molécules antibiotiques. Néanmoins, les neutrophiles ne sont pas vraiment efficaces au niveau de leur capacité de phagocytose. Celle-ci est grandement facilitée par l'opsonisation qui consiste en la modification de la cible en la recouvrant d'immunoglobulines ou de composés du complément pour faciliter sa détection par les neutrophiles [153]. Une fois le pathogène détruit, les neutrophiles subissent l'apoptose avant d'être éliminés par les macrophages. Ce mécanisme programmé de mort cellulaire permet d'éviter une présence trop longue de ces cellules dans l'organisme. En effet, les neutrophiles sont dotés d'une durée de vie de quelques heures en raison des produits antimicrobiens qu'ils transportent à l'intérieur d'eux-mêmes [152]. L'apoptose permettrait de prévenir la libération de ces composés toxiques qui pourraient causer des dommages aux cellules de l'hôte [151]. Elle envoie également des signaux pour diminuer le recrutement de nouveaux neutrophiles. De même, lorsque les macrophages

phagocytent les neutrophiles morts d'apoptose, ils reçoivent un signal qui les pousse vers la mise en place d'une réponse anti-inflammatoire [151].

En plus de leur fonction de phagocytose, les neutrophiles sont capables d'émettre des espèces oxygènes réactives (ROS) dont le monoxyde d'azote (NO), l'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) afin d'éliminer les microorganismes étrangers à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Ils libèrent également un mélange contenant leurs trois types de granules ayant des propriétés antimicrobiennes. Il s'agit du mécanisme de dégranulation [152]. Les granules fusionnent soit avec la membrane du phagosome soit avec la membrane plasmique pour relâcher leur contenu dans leur environnement respectif [151]. Enfin, découverts en 2004 par Brinkmann et al, les neutrophiles sont capables de libérer des pièges extracellulaires (NETs) constitués de structures ressemblant à l'ADN. Il s'agit plus précisément de fibres constituées de chromatines et de sérine protéases qui attrapent et tuent les microbes extracellulaires. En plus de leurs propriétés antimicrobiennes, ces pièges peuvent également servir de barrières physiques pour empêcher la dispersion des pathogènes [154]. En tant que premier type cellulaire présent au niveau du site d'infection, les neutrophiles participent également à la mise en place de la réponse inflammatoire en produisant plusieurs cytokines et chimiokines telles que IL-8, IL-12, CCL2 et CCL3, nécessaires au recrutement de nouvelles cellules immunitaires [152, 153]. Ainsi, les neutrophiles sont des effecteurs cellulaires clés de la réponse immunitaire innée [151]. Ils possèdent un arsenal de mécanismes anti-microbiens dont le but ultime est d'éliminer tout pathogène présent dans l'organisme.

2.3. Rôle de la réponse immunitaire innée lors de l'infection à *S. suis*

2.3.1. Rôle des macrophages

Une fois pénétré à l'intérieur de l'organisme, *S. suis* fait face à différents effecteurs de l'immunité innée dont leur fonction principale est de l'éliminer. Parmi ces effecteurs, les macrophages jouent un rôle important en faisant partie du système des phagocytes mononucléés [155]. Comme le nom l'indique, les macrophages sont principalement caractérisés par leur fonction de phagocytose. Autrement dit, ils détectent et ingèrent le pathogène qui sera détruit à l'aide d'enzymes et de radicaux libres toxiques une fois retrouvé à l'intérieur du phagolysosome [143]. Cependant, lors d'une infection à *S. suis*, il a été démontré que la bactérie serait capable

de survivre au moins 3h à l'intérieur des macrophages péritonéaux [156]. De plus, elle serait même en mesure de se répliquer à l'intérieur des cellules de telle sorte à maintenir une bactériémie chez l'hôte [157]. Cette résistance à l'effet bactéricide des macrophages s'explique par la présence de la capsule polysaccharidique (CPS) de la bactérie. En effet, celle-ci serait responsable de moduler les voies de signalisations intracellulaires impliquées dans la phagocytose par les macrophages murins [83] en déstabilisant les microdomaines lipidiques à la surface cellulaire et bloquant la production de monoxyde d'azote (NO) [81].

Outre cette survie intracellulaire, contrairement à *Streptococcus agalactiae*, *S. suis* est un pathogène qui démontre un faible taux de phagocytose par les macrophages murins. En effet, presque aucune bactérie n'a été retrouvée à l'intérieur des macrophages même après 90 min en contact avec les cellules [158]. En revanche, le mutant non encapsulé de cette même souche présentait un fort pourcentage de phagocytose indiquant que la CPS de *S. suis* agit comme bouclier pour permettre à la bactérie de résister à la phagocytose [97, 156, 158]. Ce même résultat a été obtenu avec les macrophages alvéolaires porcins représentant des défenses importantes au niveau des voies respiratoires. Ces derniers sont capables de phagocyter rapidement des souches de *S. suis* non encapsulée, mais lorsque celles-ci sont encapsulées, ils peuvent uniquement maintenir leur concentration constante étant donné que leur phagocytose n'est plus suffisante pour éliminer les bactéries [159].

Au lieu d'éliminer efficacement *S. suis*, les macrophages serviraient plutôt de véhicules de transport pour la bactérie favorisant ainsi sa dissémination à l'intérieur de l'hôte. En effet, des études ont démontré que *S. suis* est capable d'adhérer fortement aux macrophages murins sans pour autant être ingéré dans les cellules [100]. Son adhésion à la surface des cellules serait effectuée au moins en partie par l'acide sialique de sa CPS [100]. De plus, en interagissant avec les macrophages, *S. suis* induit la libération de plusieurs cytokines et chimiokines pro-inflammatoires [57]. En effet, Segura *et al.* (1999) ont démontré que *S. suis* sérotype 2 stimule la sécrétion des cytokines TNF- α et IL6 par des macrophages murins. Cette production de cytokine a également été confirmée comme étant indépendante de la phagocytose [103]. Cette libération de médiateurs pro-inflammatoire est un mécanisme de défense utilisé par l'hôte de telle sorte à mettre en place une réponse inflammatoire et recruter d'autres cellules au niveau du site

d'infection pour éliminer la bactérie. Cependant, *S. suis* serait en mesure d'utiliser ce mécanisme pour favoriser sa dissémination notamment en traversant, attaché à des monocytes/macrophages, la barrière hémato-encéphalique du cerveau et causant des méningites subséquentes selon la théorie modifiée du cheval de Troie [57, 90]. Ainsi, les macrophages jouent un rôle important dans la pathogénèse de l'infection causée par *S. suis* aussi bien au niveau systémique que cérébral.

2.3.2. Rôle des cellules dendritiques

Tout comme les macrophages, les cellules dendritiques (DC) sont responsables de la phagocytose des agents microbiens présents dans l'organisme. Cependant, au lieu de détruire complètement les pathogènes, elles ne dégradent leurs protéines que de façon partielle de telle sorte à les présenter à leur surface cellulaire et jouer leur rôle principal de cellules présentatrices d'antigènes [149]. Une fois ces antigènes capturés, les DC subissent un processus de maturation complexe marqué par la libération de cytokines et l'augmentation de l'expression des molécules co-stimulatrices et MHC-II. Les DC devenues matures migrent alors vers les organes lymphoïdes adjacents pour activer les cellules T et déclencher la réponse adaptative [146]. Malgré l'importance de ces cellules en tant que lien entre les deux systèmes d'immunité innée et adaptative, ce n'est que récemment que les études se sont intéressées aux rôles de celles-ci dans la pathogénèse de l'infection causée par *S. suis* ainsi qu'aux mécanismes utilisés par la bactérie pour moduler les fonctions de ces cellules [79]. Le rôle anti-phagocytaire de la CPS de *S. suis* a également été confirmé contre les DC murines, porcines et humaines [79, 80, 160]. En effet, le taux de phagocytose par les DC est plus élevé pour les souches mutantes non-encapsulées que pour les souches sauvages [79, 160]. Cependant, face aux DC murines, la CPS de *S. suis* n'est pas suffisante pour lui permettre de résister à l'opsonophagocytose et au « killing » en condition opsonisante. *S. suis* nécessite l'addition des modifications de l'acide lipotéichoïque, du peptidoglycane ainsi que la suilysine pour réduire le dépôt des molécules du complément à sa surface cellulaire, limitant ainsi sa reconnaissance par les récepteurs du complément et son élimination par phagocytose [80]. En revanche, une fois phagocyté par les DC, la survie intracellulaire de la bactérie n'est pas affectée par la présence de sa CPS étant donné que les souches encapsulées et les mutants non-encapsulés sont tous deux éliminés de manière égale

par les DC porcines. Autrement dit, *S. suis* ne peut utiliser sa CPS pour se protéger contre le « killing » intracellulaire des DC [79]. Ce même résultat a également été obtenu lors d'infection de DC humaines par une souche du sérotype 2 et son mutant non encapsulé [160]. Néanmoins, après 24h d'internalisation, environ 10^3 CFU de bactéries viables étaient toujours présentes à l'intérieur des DC humaines. Sachant que les DC activées subissent ultérieurement une apoptose, elles pourraient libérer des bactéries viables de *S. suis* et favoriser sa dissémination dans le corps de l'hôte [160].

De plus, l'interaction de *S. suis* avec les DC entraîne l'activation de ces cellules caractérisée par la libération de cytokines pro-inflammatoires principalement via la signalisation induite par les TLRs [79, 161]. Néanmoins, les niveaux de ces cytokines étaient significativement plus élevés en l'absence de la CPS de *S. suis*. Autrement dit, en masquant les composés de sa paroi cellulaire par sa CPS, *S. suis* est capable de moduler l'activation des DC en diminuant les niveaux de cytokines émis [80]. De plus, *S. suis* modifie la production des ratios des cytokines IL-10/IL-12 et IL-10/TNF- α vers un profil de réponse anti-inflammatoire de façon à échapper aux réponses inflammatoires de l'hôte possiblement en supprimant la réponse Th1 [160]. De même, la CPS altère le processus de maturation des DC murines et porcines en empêchant l'expression des molécules co-stimulatrices CD80/86 et MHC-II [79, 80, 162] ainsi que CD83/86 pour les DC humaines [160]. En effet, l'analyse de la transcription des gènes impliqués dans la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle du MHC-II *in vitro* et *in vivo*, permet de suggérer que *S. suis* régule à la baisse la synthèse de nouvelles molécules juste après la rencontre avec le pathogène et favorise leur dégradation lysosomale [162]. Ainsi, en altérant l'activation et la maturation des DC, *S. suis* diminue leur processus de présentation d'antigènes ainsi que l'activation subséquente des cellules T. Ceci expliquerait la faible activation des cellules T CD4⁺ et les faibles réponses mémoires humorales observées chez la souris et le porc [162, 163]. Autrement dit, par le biais de ces mécanismes, *S. suis* empêche la mise en place par l'hôte d'une réponse immunitaire adaptative efficace et assure sa persistance [162].

3. *Streptococcus suis* sérotype 33 reclassé en *Streptococcus ruminantium*

3.1. Caractéristiques générales

Les progrès dans le domaine de la génomique ont permis d'affiner les classifications phylogénétiques menant à la découverte et à la reclassification de plusieurs bactéries. C'est le cas notamment du sérotype 33 de *S. suis* proposé en 2017 par Tohya *et al.* et accepté en 2018 comme *Streptococcus ruminantium*. En dépit de leurs différences génétiques, *S. ruminantium* partage plusieurs caractéristiques biologiques avec *S. suis*. En effet, *S. ruminantium* est une bactérie Gram positive non sporulant et non motile sous forme de coque. Tout comme *S. suis*, elle peut s'organiser en pair ou en chaîne et elle produit des colonies circulaires, α -hémolytiques et non pigmentées d'environ 0.5 à 1 mm de diamètre sur des géloses de sang [15]. Elle peut également croître en conditions aérobie ou anaérobie entre 10-42°C mais pas en présence de 6.5% de NaCl. De plus, elle est négative pour la catalase, l'oxidase et pour le test de Voges–Proskauer. Cependant, comme décrit par Tohya *et al.* (2017), *S. ruminantium* présente plusieurs caractéristiques biochimiques permettant de le différencier des espèces phylogénétiquement proches du genre *Streptococcus* (tableau 2).

Tableau 2. Différences phénotypiques entre *Streptococcus ruminantium* et les espèces phylogénétiquement proches du genre *Streptococcus*. Réaction positive : + ; réaction négative : -. Adapté à partir de Tohya *et al.* (2017).

Caractéristiques phénotypiques		<i>S. ruminantium</i>	<i>S. suis</i>	<i>S. parasuis</i>	<i>S. acidominis</i>	<i>S. porci</i>
Production de	β -Glucosidase	+	+	-	+	+
	β -Glucuronidase	-	+	-	-	-
	α -Galactosidase	-	+	-	-	+
	β -Galactosidase	-	+	-	+	+
	Pyroglutamic acid arylamidase	-	+	-	+	-
	N-Acétyle- β -glucosaminidase	-	+	-	-	-
	Glycyl-tryptophan arylamidase	+	+	-	-	+
	Estérase (C4)	+	+	+	-	-
	Lipase Estérase (C8)	+	+	+	-	-
	α -Chymotrypsine	-	-	-	+	-
	Acide phosphatase	-	-	-	+	-
	Naphtol-AS-BI-phosphohydro	-	-	+	-	-
	α -Glucosidase	+	+	-	+	+
Hydrolyse de	Hippurate de sodium	-	-	-	+	-
	Arginine	-	+	-	-	-
Production d'acide à partir de	D-Mannitol	-	-	-	+	-
	Trehalose	+	+	+	-	+
	Raffinose	+	+	+	-	+
	L-Arabinose	-	-	-	-	+
	Glycogène	+	+	+	-	+
	Pullulan	+	+	+	-	+
	Mélibiose	-	-	-	-	+
	Méthyle β -glucopyranoside	-	+	-	-	-

3.1.1. Hôtes et symptômes

S. ruminantium n'a été isolé à ce jour que chez des ruminants dont les bovins, les caprins et les ovins. En effet, même la souche de référence du sérotype 33 de *S. suis*, considérée dorénavant comme appartenant à l'espèce *S. ruminantium*, a été isolée d'un agneau souffrant d'arthrite et non d'un porc. Récemment, une souche de *S. ruminantium* a également été retrouvée dans des lésions chez un chamois des Pyrénées [17]. Puisque *S. ruminantium* n'a jamais fait l'objet d'une caractérisation approfondie, plusieurs lacunes demeurent concernant la pathogénèse de l'infection causée par cette nouvelle espèce. Les investigations réalisées au niveau de la diversité génétique des souches ont néanmoins permis d'associer la bactérie à plusieurs pathologies. En effet, les infections à *S. ruminantium* se manifestent principalement par des endocardites, des arthrites, des pneumonies, des mammites et des abcès localisés au niveau du foie, des poumons ou de la cavité tympanique [17]. Parmi ces affectations, l'endocardite est la principale manifestation clinique associée à cette bactérie. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle la souche de référence GUT-187 de la nouvelle espèce *S. ruminantium* a été isolée à partir d'un cœur de bovin atteint d'endocardite. Contrairement à *S. suis*, il semble que *S. ruminantium* ne serait pas en mesure de causer des symptômes neurologiques puisqu'aucune souche à ce jour n'a été isolée depuis un cerveau ou du liquide céphalorachidien [18]. Bien que décrit en tant qu'agent pathogène avec une spécificité d'hôte pour les ruminants, *S. ruminantium* a également été retrouvé dans la cavité orale, les amygdales, les poumons et le lait d'individus cliniquement sains laissant suggérer que la bactérie pourrait faire partie de la flore commensale et contribuer au développement de maladies en tant que pathogène secondaire ou opportuniste plutôt que primaire [18]. Cette hypothèse a été renforcée récemment par Neila-Ibanez C. *et al.* (2022), spécifiant que *S. ruminantium* serait la cause d'infections secondaires suite à l'immunosuppression de l'hôte par d'autres pathogènes ou d'autres facteurs de stress.

3.1.2. *S. suis* isolé chez les ruminants

Outre *S. ruminantium*, *S. suis* est également considéré comme un organisme commensal du microbiote intestinal et de la cavité oral (amygdales) des ruminants [18, 164, 165]. De plus, *S. suis* aurait été isolé dans le passé chez des ruminants atteints de divers pathologies cliniques dont des pneumonies, des arthrites, des méningites et des septicémies en plus d'un cas de

transmission zoonotique rapporté depuis un ruminant [12, 166, 167]. Ces infections arrivent plutôt de manière sporadique [19] suggérant que *S. suis* serait également un pathogène opportuniste chez les ruminants. Cependant, l'identification de ces isolats a été faite dans le passé uniquement sur la base de tests biochimiques. Or, la reclassification récente de *S. suis* sérotype 33 en *S. ruminantium* a remis en question l'authenticité de ces isolats en tant que *S. suis*. En effet, il est très difficile de faire la distinction entre *S. suis* et *S. ruminantium* sans analyse génétique. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle des nouveaux outils diagnostiques ont été développées pour permettre d'établir un diagnostic étiologique véridique lors de cas cliniques chez les ruminants. Ainsi, Komatsu *et al.* (2018) a été la première étude confirmant l'infection d'un veau par une souche authentique de *S. suis* renforçant l'importance d'utiliser les bons outils afin d'éviter de poser des diagnostics erronés. L'origine des souches authentiques de *S. suis* retrouvés chez les ruminants reste inconnue à ce jour. Cependant, ces souches sont génétiquement différentes de celles retrouvées chez le porc ou l'humain selon l'analyse par MLST et le séquençage du locus *cps* [168]. Enfin, bien que l'on retrouve à la fois *S. suis* et *S. ruminantium* chez des ruminants en santé et malades, la majorité des isolats identifiés chez les animaux malades appartiennent à *S. ruminantium* suggérant que ce dernier serait plus impliqué dans les maladies chez les ruminants que *S. suis* [18].

3.2. Nouveaux outils de diagnostic

3.2.1. PCR du gène codant pour la protéine de réparation d'ADN (*recN*-PCR)

Dans le passé, le PCR du gène codant pour la glutamate déshydrogénase (*gdh*-PCR) était utilisé abondamment pour identifier *S. suis*. [169-171]. Cependant, suite à la reclassification de certains sérotypes en nouvelles espèces, ce test PCR ne discrimine pas entre les 6 sérotypes reclassifiés et les 29 sérotypes de *S. suis* [18]. De nos jours, un test PCR ciblant le gène codant pour la protéine de recombinaison/réparation de l'ADN (*recN*-PCR), développé par Ishidia *et al.* (2014), différencie *S. suis* des anciens 6 sérotypes reclassifiés comme nouvelles espèces. De plus, les gènes codant pour la superoxyde dismutase (*sodA*) ou codant pour l'ARN ribosomal 16S sont des outils taxonomiques efficaces pour l'identification des streptocoques à l'échelle de l'espèce [30, 172-175]. C'est d'ailleurs en effectuant des analyses phylogénétiques par amplification des séquences de ces deux gènes et l'homologie de celles-ci par rapport aux séquences de référence

disponibles, que Tohya *et al.* (2017) ont pu mettre en évidence une similarité de 99.2-100% et 99.7-100% respectivement pour les gènes codant pour l'ARNr 16S et *sodA* entre les isolats provenant d'endocardites bovines et la souche de référence *S. suis* sérotype 33. Ces pourcentages sont d'autant plus importants qu'avec *S. suis* ou d'autres streptocoques. De plus, la méthode d'hybridation ADN/ADN, entre ces isolats et la souche *S. suis* sérotype 33 montre un pourcentage de similarité de 76.7% contre maximum 24.9% avec d'autres streptocoques (*S. suis*, *S. parasuis*, *S. acidominimus* et *S. porci*). Il s'agit de cette analyse qui a permis de clairement confirmer l'appartenance de *S. suis* sérotype 33 à une nouvelle espèce. Un an plus tard, Tohya *et al.* (2018) ont confirmé cette reclassification en comparant la séquence génomique complète de la souche de référence GUT-187 de *S. ruminantium* avec d'autres souches de *S. suis*. Étant donné que *S. suis* et *S. ruminantium* sont très similaires et difficiles à différencier en utilisant les tests biochimiques de routine au laboratoire de diagnostic, un test PCR spécifique pour *S. ruminantium* a récemment été décrit [18] afin de mieux distinguer ces bactéries et de comprendre leur rôle respectif en ce qui a trait aux infections chez les ruminants.

3.2.2. PCR spécifique pour *S. ruminantium*

Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a été utilisé pour créer des amorces spécifiques nécessaires à l'identification de *S. ruminantium* dont les séquences sont les suivantes : F : 5'-GCA AGT GGA ACG CAA CTT TTCA-3' et R : 5'-CTA TGT ATC GTT GCC TTG GTAG-3'. Ainsi, lorsque l'on isole des souches semblables à *S. suis* à partir de ruminants, la première étape consiste à les différencier de *S. ruminantium* en effectuant le PCR spécifique. Dans les cas où les résultats sont négatifs, le test *recN*-PCR doit être réalisé pour identifier s'il s'agit de *S. suis* et ensuite effectuer le sérotypage à l'aide du PCR multiplex à deux étapes si le résultat est positif [17,176]. Cette nouvelle méthode diagnostique a permis de reclassifier plusieurs autres souches non typables de *S. suis* ainsi que certaines appartenant préalablement aux espèces *S. oralis* et *S. mitis* comme faisant partie de *S. ruminantium* [17].

3.3. Diversité sérologique et génomique impliqué dans la pathogénèse

3.3.1. Différents clusters de la capsule polysaccharidique (CPS)

La capsule polysaccharidique est connue comme étant non seulement un outil de diagnostic, mais également un facteur de virulence crucial dans la pathogénèse de l'infection

causée par *S. suis*. Initialement connu en tant que sérotype 33 de *S. suis*, Okura *et al.* (2019) ont récemment mis en évidence une forte diversité sérologique suite à l'analyse des gènes codant pour la CPS chez *S. ruminantium*. En effet, outre les gènes *cps33*, plusieurs autres groupes génétiques ont été identifiés et divisés en 7 patrons génétiques. De plus, plusieurs isolats se sont avérés non typables suggérant soit, l'existence de nouveaux patrons génétiques de *cps* qui ne peuvent pas être identifiés par l'analyse actuelle de PCR, soit la perte de certains gènes *cps* dont ceux utilisés comme cibles pour le PCR. Par ailleurs, certaines souches de *S. ruminantium* présentent un caractère hydrophobe en bouillon de culture insinuant que celles-ci pourraient être non-encapsulées ou produire une faible quantité de capsule. Il serait donc nécessaire de confirmer l'expression de la capsule pour chaque patron génétique de *cps* afin de mieux comprendre son implication dans la pathogénèse de l'infection ainsi que l'association ou non de certains types sérologiques avec les pathologies cliniques retrouvées chez les ruminants comme c'est le cas pour *S. suis* chez le porc.

3.3.2. Résistance antimicrobienne

La prophylaxie antibiotique reste encore largement répandue dans les élevages commerciaux afin de prévenir les infections bactériennes. Cependant, cette pratique confère une pression sélective favorisant les populations bactériennes exprimant des gènes de résistances aux antibiotiques [17]. Tout comme *S. suis*, plusieurs gènes ont été identifiés chez *S. ruminantium* et localisés sur des îlots génomiques, dont la famille ICESa2603 qui sont des éléments génétiques mobiles [177, 178]. Leur capacité d'être transférés à d'autres espèces du genre *Streptococcus* a déjà été démontrée expérimentalement suggérant que *S. ruminantium* pourrait servir de réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques. Ces gènes ciblent particulièrement la streptothricine les tétracyclines, les macrolides, les aminoglycosides et les phénicolés. Okura *et al.* (2019) ont d'ailleurs mis en évidence une certaine résistance pour certaines souches pour le chloramphénicol, l'érythromycine, la kanamycine, la streptomycine et les tétracyclines selon les valeurs hautes de concentration minimale inhibitrice [17]. Les pénicillines constituent à ce jour un traitement efficace pour les infections à *S. ruminantium* chez les ruminants. À ce jour, aucun gène de résistance contre les bêtalactamines, ou des mutations dans les penicillin binding proteins (PBPs) n'ont été rapportés chez *S. ruminantium*.

3.4. Autres principaux streptocoques retrouvés chez les ruminants

Chez les ruminants, le genre *Streptococcus* est impliqué dans plusieurs pathologies similaires à celles causées par *S. ruminantium*. En effet, on retrouve plusieurs autres streptocoques responsables d'endocardites, d'arthrites et plus fréquemment encore de mammites. Cette dernière condition place ces agents pathogènes au centre de la recherche scientifique en raison de ses impacts économiques négatifs sur l'industrie laitière et le bien-être animal [179].

3.4.1. *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae est un pathogène majeur de la glande mammaire en raison de sa nature hautement contagieuse et de ses répercussions néfastes sur la qualité du lait. Tout comme les autres streptocoques, il s'agit d'une bactérie Gram positive considérée bêta-hémolytique avec quelques souches non-hémolytiques et appartenant au groupe B de la classification de Lancefield [179]. Cette bactérie est non seulement capable de coloniser le tractus gastrointestinal mais également de former des biofilms lui conférant une survie indéfinie au niveau des glandes mammaires des vaches laitières [180]. Cependant, la plupart des vaches infectées ne vont montrer aucun signe clinique à l'exception d'une mammite sous-clinique correspondant à l'augmentation du comptage cellulaire somatique. Ainsi, la dissémination de cette bactérie est facilitée par son infection asymptomatique et elle se fait mécaniquement par des vecteurs indirects tels que le matériel de traite ou via le tétage par les veaux de trayons infectés. Outre l'industrie laitière, *S. agalactiae* est également un pathogène humain occasionnant des infections invasives sévères, dont des méningites et sepsis chez les nouveau-nés, les femmes enceintes et les personnes âgées ainsi que des mortalités chez les adultes immunosupprimés [181]. Bien que relativement rares, plusieurs cas d'endocardites humains avec un fort taux de mortalité ont également été observés secondairement à cette bactérie [182].

3.4.2. *Streptococcus uberis*

S. uberis fait également partie du complexe bactérien responsable de mammites bovines. Cependant, il s'agit d'un pathogène principalement environnemental avec quelques cas contagieux rapportés. Majoritairement alpha-hémolytique, certaines souches peuvent causer une hémolyse partielle, voire même aucune hémolyse. Sa classification de Lancefield est

relativement complexe comme le montre son appartenance putative aux groupes E, G, P ou U [179]. Récemment, *S. uberis* a été diagnostiqué comme responsable d'une arthrite chez un humain suite à une dissémination hématogène démontrant son potentiel zoonotique. [183].

3.4.3. *Streptococcus dysgalactiae* subsp *dysgalactiae*

S. dysgalactiae subsp *dysgalactiae* est une bactérie capable de survivre non seulement à l'intérieur de son hôte mais également dans l'environnement faisant d'elle un pathogène intermédiaire en matière de mammites bovines. La bactérie appartient, en général, aux groupes C et G dans la classification de Lancefield et elle est principalement non-hémolytique avec quelques exceptions alpha-hémolytiques connues [179]. Tout comme *S. ruminantium*, son spectre d'hôte s'étend à d'autres ruminants, dont les chèvres et les moutons chez lesquels des cellulites sévères, des syndromes de chocs septiques ainsi que des arthrites ont été observés [184, 185]. De plus, bien que *S. dysgalactiae* subsp *dysgalactiae* ait été considérée comme un pathogène animal-restrictif auparavant, certains cas zoonotiques ont été rapportés dont un cas d'endocardite humaine [186].

L'endocardite bactérienne est la maladie cardiaque principale observée chez les bovins adultes [187, 188]. Sa prévalence s'élève à environ 5.2 cas sur 10 000 vaches atteintes [188]. Parmi les bactéries responsables, on retrouve principalement *Trueperella pyogenes*, le genre *Streptococcus* et plusieurs entérobactéries [187, 188]. La condition pathologique se développe la plupart du temps secondairement à une infection primaire telle que des métrites, des mammites, des arthrites ou des abcès hépatiques. Il est cependant rare que les animaux développent des signes cliniques associés à l'endocardite étant donné que l'insuffisance cardiaque n'est observée que dans les stades avancés de la maladie [187]. C'est la raison pour laquelle beaucoup d'erreurs de diagnostic ante-mortem sont observées. L'observation des lésions macroscopiques à l'abattoir ou à la nécropsie constitue le test de diagnostic définitif [187, 188]. Comme mentionné précédemment, l'endocardite représente la pathologie principale associée à *S. ruminantium*. De plus, d'autres streptocoques, dont *S. dysgalactiae* subsp *dysgalactiae* sont également en mesure d'entraîner cette pathologie aussi bien chez les ruminants que chez les humains. Étant donné la similarité des signes cliniques occasionnés par ces agents pathogènes, *S. ruminantium* pourrait

également avoir un potentiel zoonotique d'autant plus que des cas de transmission humaine secondaire à des lésions cutanées occasionnées par des morsures de veau, ont été rapportés pour *S. suis* avant que *S. ruminantium* ne soit reconnu comme nouvelle espèce [12, 166]. Ceci renforce l'intérêt de mieux comprendre ses mécanismes d'infection en tant que nouvelle espèce. Ceci s'avère d'autant plus primordial pour les personnes travaillant à l'abattoir.

III/Article scientifique

Biological characteristics of *Streptococcus ruminantium* (*Streptococcus suis*-like) and its role in the pathogenesis of the infection in ruminants

Anaïs Boa¹, Héloïse Pageaut¹, Annie Gaudreau¹, Masatochi Okura², Mariela Segura¹ and Marcelo Gottschalk¹,

¹ Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA) and Research Group on Infectious Diseases in Production Animals (GREMIP), Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 Sicotte St., Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

² Division of Bacterial and Parasitic Disease, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba 305-0856, Japan

En préparation pour soumission dans le journal Pathogens

Rôle de la candidate dans la conception de l'article

Je suis la première autrice de cet article. J'ai participé activement à la conception, au design et à la réalisation de toutes les expériences. J'ai analysé les résultats et réalisé toutes les figures. J'ai également réalisé l'écriture entière de ce manuscrit.

Abstract

Streptococcus suis serotype 33, a major swine bacterial pathogen and zoonotic agent, has recently been reclassified as a novel species, *Streptococcus ruminantium*. Unlike its close relative, *S. ruminantium* has been only described in ruminants as a cause of endocarditis and arthritis, among other pathological conditions. Despite recent genetic knowledge, information about the pathogenesis of the infection caused by this bacterium is lacking. To address this knowledge gap, genotypic and phenotypic characterizations of 21 *S. ruminantium* isolates as well as their interactions with host cells were evaluated. Results showed that all *S. ruminantium* strains lacked the three virulence associated markers (*epf*, *mrp*, *sly*) described for *S. suis*. They also are non/low-encapsulated with a high surface hydrophobicity and have a high capacity of self-aggregation which might facilitate the biofilm formation observed for almost all strains. Those phenotypic characteristics might shape the course of infections caused by *S. ruminantium*. Indeed, most strains had a better capacity to adhere and invade both epithelial and endothelial cells compared to *S. suis* serotype 2. Most of them also resisted well to the bactericidal effect of bovine whole blood and the phagocytosis by monocytes-derived macrophages. Our results provide the first evidence of the pathogenicity and the virulence mechanisms of *S. ruminantium* in ruminants.

Keywords: *Streptococcus ruminantium*; *Streptococcus suis* serotype 2; *in vitro*; virulence associated markers; hydrophobicity; non-encapsulated; self-aggregation; biofilm; phagocytosis

1. Introduction

Streptococcus suis is one of the most important bacterial pathogens responsible for important economic losses to the swine industry related to various diseases including septicemia with sudden death, arthritis, meningitis and endocarditis [1,2]. Moreover, it is an emerging zoonotic agent affecting the general population mainly in Southeast and East Asia therefore representing a significant public health concern [3]. Initially, 35 serotypes (types 1-34 and type 1/2) of *S. suis* have been described based on the antigenic differences of its capsular polysaccharides (CPS). Among these serotypes, serotype 2 is the most virulent and commonly isolated serotype from systemic infections in pigs and humans [4]. Although *S. suis* is considered

as a genetically and serologically diverse species, recent taxonomic analysis have shown that 6 of these serotypes (20, 22, 26, 32, 33 and 34) should be re-classified to other bacterial species [5-8]. Thus, *S. suis* reference strains of serotypes 32 and 34 currently belong to *Streptococcus orisratti* based on the nucleotide sequences of the chaperonin-60 (*cpn60*) [6] whereas those of serotypes 20, 22 and 26 are regarded as *Streptococcus parasuis* [7]. In respect of the reference strain of *S. suis* serotype 33, Tohya *et al.* (2017) proposed to rename it as a species nova, *Streptococcus ruminantium* which has been approved in 2018 [8,9].

Unlike *S. suis*, all *S. ruminantium* isolates have been isolated exclusively from either domestic (cattle, sheep and goats) or wild ruminants (Pyrenean chamois) [8,10-12]. Furthermore, the reference strain of *S. suis* serotype 33 was isolated from a case of arthritis in a lamb [13]. These origins suggest that *S. ruminantium* might have a preference for ruminant hosts leading to endocarditis, arthritis, pneumonia, mastitis, and purulent abscesses in several organs [11,12]. *S. ruminantium* has also been found as commensal in tonsils or oral cavities of ruminants suggesting that it could participate as an opportunistic or secondary pathogen in the pathogenesis of ruminant diseases as its relative *S. suis* does in pigs [11,12]. Yet, due to its recent reclassification, information about the virulence and the pathogenesis of the infection by *S. ruminantium* is scarce.

Isolation of *S. suis* from diseased ruminants has also been described in the past prior to the proposal of *S. ruminantium* as a new species [14-17]. Nevertheless, *S. suis* and *S. ruminantium* are difficult to distinguish by routine biochemical tests which means that some of *S. suis* isolates may have been likely misidentified. Therefore, the etiological importance of *S. ruminantium* in ruminant diseases remains unknown [12]. To accurately discriminate between *S. suis* and *S. suis*-like isolates, a PCR targeting the DNA repair protein gene (*recN*-PCR) was designed by Ishidia *et al.* [18]. The primers used for this PCR do not recognize *S. suis*-like isolates such as those belonging to serotypes 20, 22, 26, 32, 33 and 34 but it rather identifies them as different species. This *recN*-PCR method is now used to identify authentic *S. suis* isolates in diagnostic laboratories. In addition, a PCR specific for *S. ruminantium* has recently been described [12]. Accurate identification of streptococcal isolates is essential for understanding the role of *S. ruminantium* in ruminant diseases.

In the current study, 21 isolates from clinical samples collected from ruminants in Canada and Japan were reclassified as *S. ruminantium* by the established specific PCR assay. We then characterized them by testing hydrophobicity, self-aggregation, biofilm formation and by screening the presence of virulence associated markers previously described for *S. suis*. The first steps of the pathogenesis of the infection were also studied by carrying adhesion/invasion assays of epithelial and endothelial cells, bacterial survival in whole blood and resistance to phagocytosis. The classical virulent P1/7 strain of *S. suis* serotype 2 has also been used as a comparative in this study. Results indicate that, in general, *S. ruminantium* has a better capacity to adhere and invade epithelial and endothelial cells thanks to the lack of CPS and the self-aggregation phenotype observed. Moreover, the self-aggregation and biofilm formation capacities of *S. ruminantium* might contribute to the higher resistance to the bactericidal effect of whole blood and to the phagocytosis as described in this study compared to *S. suis* serotype 2.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

All experiments involving animals were carried out in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set in the Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals. The protocols and procedures used were approved by the Animal Welfare Committee of the University of Montreal (protocol number RECH-1570).

2.2. Bacterial Strains and Growth Conditions

A total of 21 strains of *S. ruminantium* confirmed by the PCR specific for the new species were used for this study [12]. Among these, 7 isolates were obtained from field samples collected from cattle showing signs of endocarditis in Japan including the reference strain of *S. ruminantium* (GUT-187) [8], 12 were recovered in the field from diseased ruminants (bovine and ovine) with various clinical affectations in Canada [11], 1 sample came from a bulk tank milk in Canada, and 1 strain is the reference strain of *S. suis* serotype 33 (EA1832.92) recovered from a diseased lamb [13] (Table 1). *S. ruminantium* strains were grown as previously described for *S. suis* strains but

with few modifications [19,20]. Briefly, bacteria were cultivated overnight on Columbia sheep blood agar plates (Oxoid, Burlington, ON, Canada) at 37°C under 5% CO₂. 5 mL of Todd Hewitt broth (THB; Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) were inoculated with few colonies of *S. ruminantium* and incubated for 16h at 37°C under 5% CO₂. To obtain the final culture, 10 mL of fresh medium was inoculated with 300 µL of the overnight culture and incubated at 37°C under 5% CO₂ until reaching the exponential growth phase corresponding to an optical density of 0.4 (OD₆₀₀). The cultures were then centrifuged, and the bacterial pellets were washed twice with endotoxin (lipopolysaccharide)-free phosphate buffered saline (LPS-free PBS). For *in vitro* cell culture assays, bacteria were resuspended in cell culture medium, and the final concentration (colony-forming units (CFU)/mL) were determined by plating on Todd-Hewitt agar (THA).

Two strains of *S. suis* serotype 2 were also used throughout this study for comparison purposes (Table 1): the classical *S. suis* serotype 2 highly encapsulated and virulent European reference P1/7 strain and its derived isogenic non-encapsulated mutant $\Delta cps2F$ [19, 21]. In addition, the strain S735 of *S. suis* serotype 2 was used as a positive control for the biofilm formation experiment [22]. *S. suis* strains were grown with the same protocol described above for *S. ruminantium* strains.

For practical purposes, only 8 strains of *S. ruminantium* (1088054, 1384855, 1546893, 1546894, 1557856, *S. suis* serotype 33, GUT-187, GUT-188) were selected based on various criteria (clinical history, hydrophobicity, self-aggregation, *S. suis* serotyping) and used throughout the study to include as much as phenotypic and genotypic variations possible and to better represent the *S. ruminantium* species.

Table 1. Clinical history, host and country origin of each bacterial strains used in this study

Strain	Country	Host	Isolation site (clinical signs)	<i>S. suis</i> serotyping by PCR	Reference
<i>S. suis</i> serotype 2					
P1/7	UK	Pig	(meningitis)	2	[21]
$\Delta cps2F$	UK	Pig	(meningitis)	2	[19]
S735	Netherlands	Pig	(pneumonia)	2	[22]
<i>S. ruminantium</i>					
1088054	Canada	Ovine	Lung (pneumonia)	33	[11]
1088055	Canada	Ovine	Oral (abscess)	33	[11]
1384854	Canada	Ovine	Heart (endocarditis)	UT	[11]
1384855	Canada	Ovine	Joint (arthritis)	33	[11]
1192202	Canada	Bovine	Milk (bulk tank)	33	[11]

1515249	Canada	Bovine	Ombilical (abscess)	UT	[11]
1515575	Canada	Bovine	Oral (abscess)	UT	[11]
1546893	Canada	Bovine	Joint (arthritis)	UT	[11]
1546894	Canada	Bovine	Joint (arthritis)	UT	[11]
1557846	Canada	Bovine	Joint (arthritis)	UT	[11]
1579484	Canada	Bovine	Joint (arthritis)	33	[11]
1923258	Canada	Bovine	Lung (pneumonia)	UT	[11]
1963982	Canada	Bovine	Joint (arthritis)	UT	[11]
<i>S. suis</i> serotype 33	Canada	Ovine	Joint (arthritis)	33	[13]
GUT-183	Japan	Bovine	Heart (endocarditis)	UT	[8]
GUT-185	Japan	Bovine	Heart (endocarditis)	UT	[8]
GUT-186	Japan	Bovine	Heart (endocarditis)	UT	[8]
GUT-187	Japan	Bovine	Heart (endocarditis)	UT	[8]
GUT-188	Japan	Bovine	Heart (endocarditis)	33	[8]
GUT-191	Japan	Bovine	Heart (endocarditis)	UT	[8]
GUT-193	Japan	Bovine	Heart (endocarditis)	UT	[8]

UT: Untypable

2.3. Detection of Classical Virulence Associated Markers

Amplification of classical virulence associated genes identified for *S. suis* such as suilysin (*sly*), muramidase-released protein (*mrp*), and extracellular protein factor (*epf*) was achieved by conventional multiplex PCR assays on each *S. ruminantium* isolates, using the sequence of primers and conditions described previously by Silva *et al.* [23]. The serotype 2 P1/7 strain (*epf+* / *mrp+* / *sly+*) of *S. suis* was used as a positive control whereas nuclease free water served as a negative control in the study.

Table 2. List of primer sequences used for the virulence associated gene detection by PCR

Gene name	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
<i>sly</i>	ACTCTATCACCTCATCCGC	ATGAGAAAAAGTTCGCACTTG
<i>mrp</i>	ATTGCTCCACAAGAGGATGG	TGAGCTTTACCTGAAGCGGT
<i>epf</i>	GCTACGACGGCCTCAGAAATC	TGGATCAACCACTGGTGTTAC

2.4. Bacterial Surface Hydrophobicity Assay

Hydrophobicity has previously been used as an indicator of the presence of capsule in *S. suis* strains [24]. Cell surface hydrophobicity of the *S. ruminantium* strains was determined by measuring their adsorption to n-hexadecane according to the procedure previously described

[25]. *S. suis* serotype 2 and its derived isogenic non-encapsulated mutant $\Delta cps2F$ was used for comparison.

2.5. Detection of Capsule by Transmission Electron Microscopy (TEM)

TEM was carried out as previously described [20,26] with some modifications. Briefly, 8 selected *S. ruminantium* bacteria (1088054, 1384855, 1546893, 1546894, 1557856, *S. suis* serotype 33, GUT-187, GUT-188) in addition of *S. suis* P1/7 strain and its isogenic mutant, were grown to mid-logarithmic phase and resuspended in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.3, containing 2.5% glutaraldehyde and 0.05% ruthenium red. Ferritin was then added to a final concentration of 1 mg/mL and the suspension incubated for 30 min at room temperature. Cells were then immobilized in 3% agar, washed five times in cacodylate buffer containing 0.05% ruthenium red, and fixed in 2% osmium tetroxide for 2 h at room temperature. Afterwards, samples were washed with water every 20 min for 2 h to remove osmium tetroxide and dehydrated in an increasing graded series of acetone. Specimens were then washed twice in propylene oxide and embedded in Spurr low-viscosity resin (Sigma-Aldrich Canada). Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined using a transmission electron microscope at 80 kV (JEM 1230; JEOL, Tokyo, Japan).

2.6. Self-aggregation Assay

All 21 strains of *S. ruminantium* isolates and *S. suis* serotype 2 P1/7 strain plus its isogenic mutant were examined for their ability to self-aggregate as previously described [27,28] with few modifications. Bacteria were grown overnight in THB, washed with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, and resuspended in THB to obtain an optical density of 0.05 (OD₆₀₀). Then, the bacterial suspensions were incubated for an additional 24h at 37°C under 5% CO₂ and static conditions. After incubation, optical densities of the bacterial cultures (OD₆₀₀) were measured before and after vortexing to resuspend the cell aggregates. The percentage of self-aggregation of all strains was determined using the equation: % self-agglutination = ((OD₆₀₀ after vortexing - OD₆₀₀ before vortexing) / OD₆₀₀ after vortexing) x 100.

2.7. Confocal Microscopy

For immunofluorescence analysis, 4 selected *S. ruminantium* strains (1088054, 1546893, GUT-187, *S. suis* serotype 33) and the *S. suis* P1/7 bacterial suspensions of an OD₆₀₀ of 0.8 were incubated with 100 µg/mL of fluorescein isothiocyanate (FITC; Sigma-Aldrich), which fluoresces green, for 45 min at 37°C under 5% CO₂ with agitation [29]. Bacteria were washed three times with LPS-Free PBS and resuspended in either MDBK or NPTr cell culture media. Tenfold dilutions were plated on THA to determine the final concentration of bacteria. MDBK (10⁶ cells) and NPTr (10⁵ cells) were cultured on a 24-well polystyrene tissue culture plate (Falcon) and infected with 1 mL of the different stained strains of *S. ruminantium* and *S. suis* (MOI: 10) suspension. Plates were incubated for 2 h at 37°C under 5% CO₂, followed by three washes with warm LPS-Free PBS to remove non-associated bacteria. Cells were then fixed with paraformaldehyde (4%) for 15 min at room temperature followed by two washes with LPS-Free PBS. Cells nuclei were stained by adding a drop of prolong gold antifade mountant with DAPI solution (ThermoFischer) on the LPS-Free PBS, incubated for 5 min and then washed twice. Samples were observed with an IX-80 confocal microscope integrated into the FV-1000 imagery system and analyzed using the fluoview software (Olympus Canada, Richmond Hill, ON, Canada) [30]. An argon laser at 488 nm and a diode laser at 405 nm, were used as the excitation source for the fluorescent probes [30].

2.8. Biofilm Formation

The biofilm formation capacity of the same 8 selected *S. ruminantium* strains and *S. suis* serotype 2 P1/7 strain was measured as previously described [31]. An additional strain S735 (The Netherlands), the international reference strain of *S. suis* serotype 2 was used as a positive control for this experiment [32]. An overnight culture of each strain was diluted in basal broth medium to obtain an optical density of 0.1 (OD₆₅₅). Porcine and bovine (Sigma-Aldrich) fibrinogen were added to the basal broth medium at a concentration of 2 mg/mL. Samples (200 µL) were added to the wells of a 96-well polystyrene tissue culture plate (Costrar) in quadruplicate for each condition and strain. The plates were incubated for 24 h at 37°C, under 5% CO₂. After incubation, medium and free-floating bacteria were removed by aspiration, and the wells were washed three times with PBS (pH 7.2). The biofilms were stained with 0.04% crystal violet (100 µL) for 10 min. The wells were washed three times with PBS to remove unbound crystal violet dye and dried for

2 h at 37°C. After adding 100 µL of 95% ethanol to each well, the plate was shaken for 10 min to release the stain from the biofilms, and the absorbance at 550 nm (A_{550}) was recorded with a microplate reader. Wells with sterile broth medium served as negative controls.

2.9. Cell Culture and Isolation of Primary Bovine Cells

The Newborn Pig Tracheal cells (NPTr) were grown as described before [29,33]. Briefly, cells were grown at 37°C under 5% CO₂ in Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM; Gibco, Burlington, ON, Canada), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (v/v) (FBS; Gibco), penicillin-streptomycin 100 U/mL and gentamicin 0.04 mg/mL (Gibco). For assays, cells were treated with 0.1% Trypsin in 0.03% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Gibco), suspended in fresh culture medium with antibiotics and distributed in a 24-well culture plate (Falcon, Mississauga, ON, Canada) for 24 h at 37°C under 5% CO₂. After 24 h, the cells were washed once with LPS-free PBS and the culture medium was replaced with fresh antibiotic-free culture medium. The cells were again incubated for 24 h until they reached confluence with a final concentration of 1×10^5 cells/mL.

The Madin-Darby bovine kidney cell line (MDBK) from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA, NBL-1 CCL-22) (CCL-22™ NBL-1) were grown similarly as described above for the NPTr cells. However, cells were grown in Minimum Essential Medium Glutamax (MEM; Gibco), supplemented with 10% heat-inactivated horse serum (v/v) (Gibco), penicillin-streptomycin 100 U/mL and gentamicin 0.04 mg/mL (Gibco), 1% sodium pyruvate 100X (Gibco), 1% Minimum Essential Medium (MEM) amino acid 100X (Gibco). The confluence was achieved with a final concentration of 1×10^6 cells/mL [34].

The porcine aortic endothelial cell (PAEC), line AOC kindly provided by Dr. José Yélamos, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain [35] were grown similarly as described above for the NPTr cells with few modifications. Cells were grown in RPMI-1640 (Gibco), supplemented with 10% fetal bovine serum (v/v) (Gibco), penicillin-streptomycin 100 U/mL, 1% L-glutamine 100X (Gibco). Culture flask and 24-well culture plates were pre-coated with 1% gelatin (Sigma #G-1890, type A swine skin) for 30 min at room temperature followed by two washes with LPS-Free PBS-EDTA. The confluence was achieved with a final concentration of 1×10^5 cells/mL.

The Calf Pulmonary Artery Endothelial Cell line (CPAE; ATCC® CCL-209™) was grown similarly as described above for the NPTr cells in a different cell culture medium. Cells were grown in Minimum Essential Medium Glutamax (MEM; Gibco), supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (v/v) (Gibco), penicillin-streptomycin 100 U/mL, 1% sodium pyruvate 100X (Gibco), 1% Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids (MEM NEAA) 100X (Gibco). The confluence was achieved with a final concentration of 1×10^6 cells/mL.

Peripheral blood was collected from the jugular vein of healthy donors Holstein cows presenting no clinical signs by using sterile blood collection bags (J-520) with citrate phosphate dextrose adenine solution (CPDA-1) as anticoagulant [36]. Blood was transferred under sterile conditions from the blood collection bags into 50 mL centrifuge tubes. Whole blood was centrifuged at $1260 \times g$ for 30 min at room temperature with the break-off. Blood plasma was carefully removed by gentle aspiration and stored at -80°C to maintain the integrity of the complement system. Fresh plasmas were then used for the phagocytosis experiment described below. In the meantime, buffy coats, containing leucocytes and platelets, were harvested, and diluted 1:2.25 (v/v) in LPS-Free PBS-EDTA (2mM). 30 mL of this solution was overlaid on 15 ml Histopaque 1077 (Sigma–Aldrich) and centrifuged for 30 min at $1500 \times g$ at 4°C with the break-off. Mononuclear cells (i.e., monocytes and lymphocytes) were collected from the interface, also called mononuclear ring. The cells were resuspended in 50 mL LPS-Free PBS-EDTA (2mM) and centrifuged for 7 min at $400 \times g$ at 4°C . Consecutive centrifugation with the same parameters were performed four times to remove remaining platelets [35]. The isolated mononuclear cells were resuspended in RPMI-1640 (Gibco) containing 10 % of heat inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco), 20 mM of L-glutamine (Gibco) and 20 mM of HEPES, 100U/mL penicillin G and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (Gibco) [38]. The mononuclear cells were allowed to adhere in T175 flask (Falcon) for 2 h at 37°C in 5% CO_2 . Non-adherent cells were removed by repeated washing with warm LPS-Free PBS. Adherent cells were then incubated for 20 min at 4°C with cold Hanks Balanced Salt Solution (HBSS; Gibco) containing 5 mM EDTA. Cells were then recovered gently with a cell scraper and centrifuged at $400 \times g$ at 4°C for 10 min. Adherent monocytes were allowed to differentiate into monocyte-derived macrophages by incubating in the cell culture medium

described above, 1×10^6 cell/mL in a 24-well culture plate (Starstedt Primaria) for 7 days at 37 °C under 5% CO₂. The medium was replaced every 48 h during that period.

2.10. Adhesion to and Invasion of Epithelial Cells (NPTr and MDBK) and Endothelial Cells (AOC and CPAE) by *S. ruminantium*

Epithelial NPTr and MDBK cells as well as endothelial AOC and CPAE cells were used and cultured until confluence as previously described [33]. Cells were infected with a MOI of 1, corresponding to 1×10^5 CFU/well for NPTr, AOC, CPAE, and 1×10^6 CFU/well for MDBK with the different *S. ruminantium* strains and *S. suis* P1/7 strain and its unencapsulated $\Delta cps2F$ mutant (positive control). These MOI were established as being optimal during standardization tests. Cell culture plates were then centrifuged for 10 min to bring bacteria into close contact with cells and further incubated for 2 h and 4 h at 37°C in 5% CO₂. The adhesion assay, which quantifies total cell-associated bacteria (surface-adherent and intracellular bacteria) was performed as previously described [33]. Briefly, after the incubation times, cells were washed five times with LPS-Free PBS and disrupted with sterile ice-cold deionized water followed by cell scraping from the bottom of the well to recover adhering as well as intracellular bacteria. The bacterial suspensions were plated on THA and incubated for 24 h at 37°C under 5% CO₂. Levels of adhesion were expressed as the total number of CFU recovered per well. For the invasion assay, cells were washed twice instead of five times with LPS-Free PBS by the end of the incubation times. Then 1 mL of fresh culture medium containing 5 µg/mL of penicillin G and 100 µg/mL of gentamicin was added to each well and incubated for an additional 1 h at 37°C under 5% CO₂ to kill extracellular and surface-adherent bacteria. Cells were then washed three times and the last wash was plated on THA to confirm antibiotic activity. Cells were scraped and bacterial CFU numbers were determined as described above. Levels of invasion were expressed as the total number of CFU recovered per well.

2.11. Whole Blood Bactericidal (Killing) Assay

20mL of blood from two Holstein cows of two- to four-years-old were collected from the coccygeal vein using Vacutainer sodium heparin blood collection tubes (Sigma-Aldrich). This whole blood containing leukocytes ($8,4 \times 10^6$ cells/mL on average) [39] were transferred to a

microtube containing around 1×10^6 CFU/mL of the different *S. ruminantium* and *S. suis* strains (MOI = 0,1) and incubated for 2 h, mixing every 20 min. Assay conditions were inspired by the kinetics of *S. suis* killing by murine blood [40] but different MOIs were evaluated in pre-standardization tests in order to select the above indicated experimental conditions. After incubation, cells were lysed by vortexing and vigorous pipetting and appropriate dilutions plated on THA to determine viable bacterial counts. Resistance to bacterial killing by blood leukocytes was compared to incubation of the different bacterial strains in plasma only (obtained by centrifuging whole blood at $1800 \times g$ for 10 min at 4 °C). The percentage of killed bacteria was determined using the following formula: $1 - (\text{bacteria in blood}/\text{bacteria in plasma})/100\%$.

2.12. Phagocytosis Assay of *S. ruminantium* by Bovine Monocytes-Derived Macrophages

S. ruminantium phagocytosis tests were carried out as described previously [29], with some modifications. *S. suis* P1/7 strain and its isogenic mutant $\Delta cps2F$ were also used for comparison purposes. Bacteria were pre-opsionized with 20% of fresh bovine plasma (30 min at 37°C) with agitation (230 rpm) [19,29]. After 7 days of culture for cell differentiation, bovine monocytes-derived macrophages were infected with 1×10^6 CFU/mL of bacterial suspensions (MOI = 10). The infected 24-well cell culture plates were centrifuged and incubated for 30 and 60 minutes at 37°C under 5% CO₂ [38,41]. Preliminary tests were done to standardize the conditions beforehand. Cells were then washed twice with Hanks Balanced Salt Solution (HBSS; Gibco) and culture medium containing 100 µg/mL of gentamicin and 5 µg/mL of penicillin G was added to the cells to eliminate any non-phagocytosed bacteria. The cells were incubated for an additional 2 h at 37°C under 5% CO₂. Following antibiotic treatment, cells were washed three times with HBSS and the last wash was plated on to THA to confirm the effectiveness of the antibiotic treatment. Lysis of the macrophages was carried out by scraping and the CFU count of the bacteria was determined by plating the bacterial suspensions on THA. Levels of phagocytosis were expressed as the total number of CFU recovered per well.

2.13. Statistical Analysis

All data are expressed as means \pm standard errors from at least three independent experiments. SigmaPlot Software (v.11.0) was used for data analysis. Normality of data was verified using the Shapiro-Wilk test. Accordingly, parametric (*t*-test) or non-parametric tests (Mann–Whitney rank sum test), where appropriate, were performed to evaluate statistical differences in the mean of hydrophobicity, self-aggregation, biofilm formation, adhesion and invasion, killing and phagocytosis, between each *S. ruminantium* strain and the *S. suis* serotype 2 P1/7 strain. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$.

3. Results

3.1. *S. ruminantium* genotypic and phenotypic characterization

3.1.1. *S. ruminantium* does not express any classical virulence associated markers identified for *S. suis*

Identification of virulent *S. suis* strains remains a controversial discussion. However, several virulence associated markers have been highlighted such as the extracellular factor (EF, *epf*), the muramidase-released protein (MRP, *mrp*) and the hemolysin suilysin (SLY, *sly*) to try to predict the virulence of a given *S. suis* strain [43-45]. To evaluate their expression or not in *S. ruminantium*, amplification by PCR of these genes was achieved on each *S. ruminantium* isolates. All *S. ruminantium* strains were negative for the PCR of these genes indicating that they lacked the three classical virulence associated markers described in *S. suis*.

3.1.2. *S. ruminantium* expresses a non/low-encapsulated phenotype which is associated with increased surface hydrophobicity

The CPS is known to be a critical virulence factor for *S. suis* infection [47,48]. To evaluate its presence in *S. ruminantium* isolates, cell surface hydrophobicity (an indicator of encapsulation) was performed. As expected, the surface hydrophobicity of *S. suis* serotype 2 P1/7 strain was low (5.4%) compared to its isogenic mutant $\Delta cps2F$ which has been depleted of the gene responsible for the CPS biosynthesis (99.1%) (Figure 1). Similarly, to the non-encapsulated mutant, 14 *S.*

ruminantium strains expressed a high hydrophobicity (>70%) while the other 7 strains left showed an intermediate one (between 30% and 70%) [49].

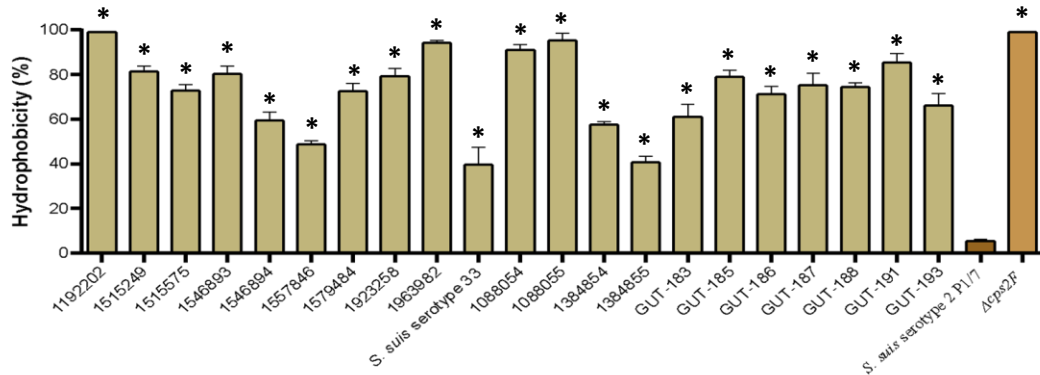


Figure 1: Hydrophobicity assay of *S. ruminantium* isolates. Surface hydrophobicity of 21 strains of *S. ruminantium*, *S. suis* serotype 2 P1/7 and its mutant strain, was determined using n-hexadecane. Data represent the mean \pm SEM (n = 3). * ($p < 0.05$) indicates a significant difference between the corresponding *S. ruminantium* strain or the non-encapsulated mutant strain $\Delta cps2F$ and the *S. suis* serotype 2 P1/7 strain.

Three representative strains of each group (high and intermediate hydrophobicity) on top of *S. suis* P1/7 and its isogenic mutant, were further characterized by electron microscopy to confirm the presence of a capsule. In accordance with previously published micrographs [20,47], wild-type strain P1/7 is surrounded by a thick layer of CPS at its surface, indicative of being well encapsulated (Figure 2G). However, all *S. ruminantium* strains were not surrounded by a dense layer of CPS but rather by either a thin layer or none at all (Figure 2). This is similar to what was observed for the isogenic non-encapsulated mutant $\Delta cps2F$ (Figure 2H) indicating that *S. ruminantium* strains are poorly or non-encapsulated.

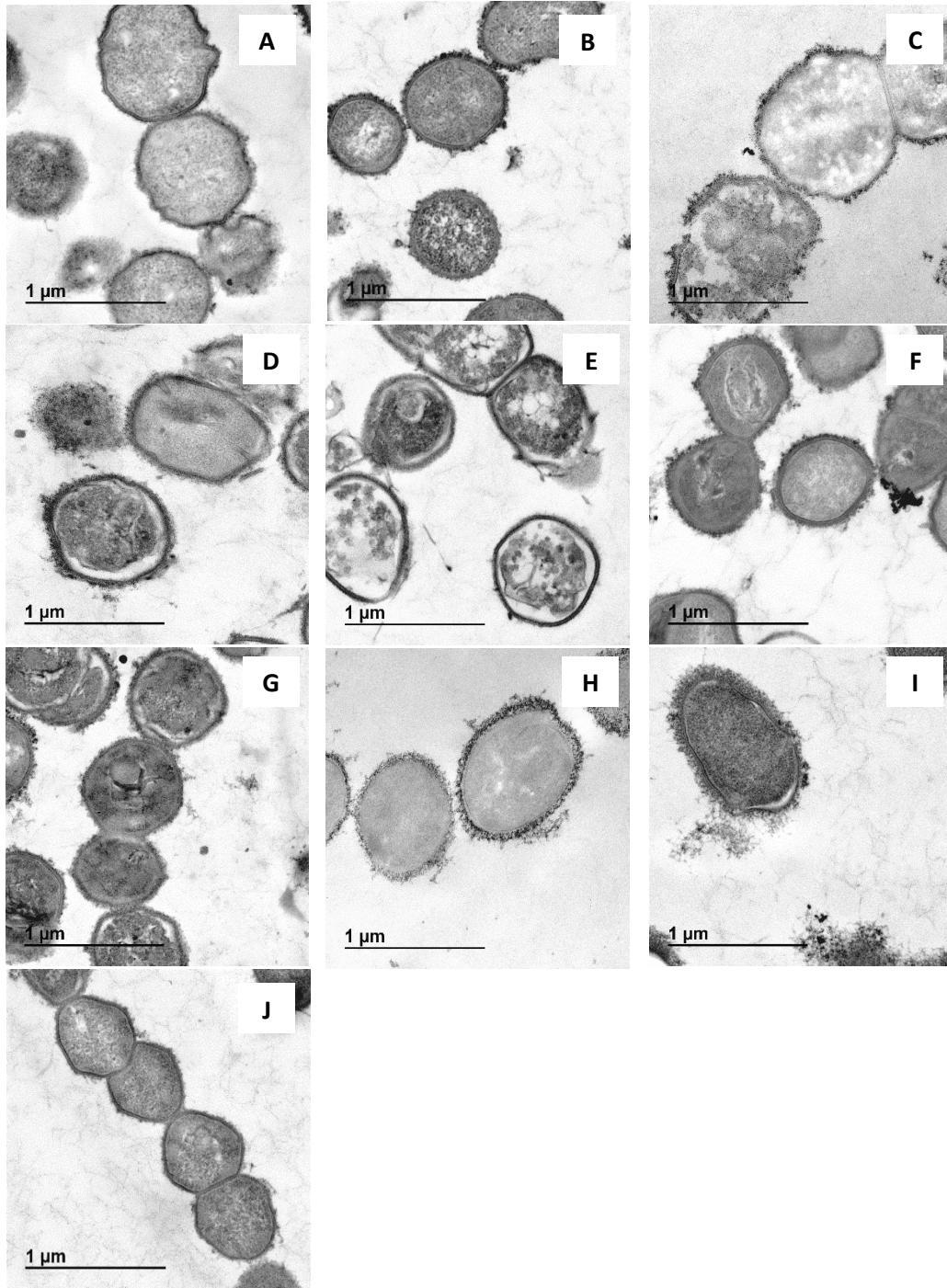


Figure 2: Visualization of *S. ruminantium* capsule by transmission electron microscopy following labelling with polycationic ferritin. (A) 1088054 strain (91% of hydrophobicity); (B) 1384855 strain (41% of hydrophobicity); (C) 1546893 strain (80% of hydrophobicity); (D) 1546894 strain (60% of hydrophobicity); (E) 1557846 strain (49% of hydrophobicity); (F) *S. suis* serotype 33 reference strain (40% of hydrophobicity); (G) GUT-187 *S. ruminantium* reference strain (75% of hydrophobicity); (H) GUT-188 strain (74% of hydrophobicity); (I) *S. suis* serotype 2 p1/7 strain (5% of hydrophobicity); (J) *S. suis* $\Delta cps2F$ mutant strain (99% of hydrophobicity). Bar: 1 μ m.

3.1.3. *S. ruminantium* expresses a self-aggregative phenotype resulting in microcolony formation

Self-aggregation is a property exhibited by several bacteria as a protective mechanism from external stresses such as the host immune system [50]. Hence it can be beneficial for pathogenic bacteria. Moreover, the high cell surface hydrophobicity is known to have some correlation with the self-aggregation phenotype because of the interaction between hydrophobic structures in a hydrophilic environment [50]. Consequently, we investigated the capacity of *S. ruminantium* to express this phenotype by performing a self-aggregation assay. Without any exception, all *S. ruminantium* strains showed > 85% of self-aggregation whereas only 61% were observed for *S. suis* serotype 2 P1/7. Surprisingly, the non-encapsulated *S. suis* serotype 2 $\Delta cps2F$ mutant expressed only 41% of self-aggregation with no significant difference observed with the wild type strain (Figure 3).

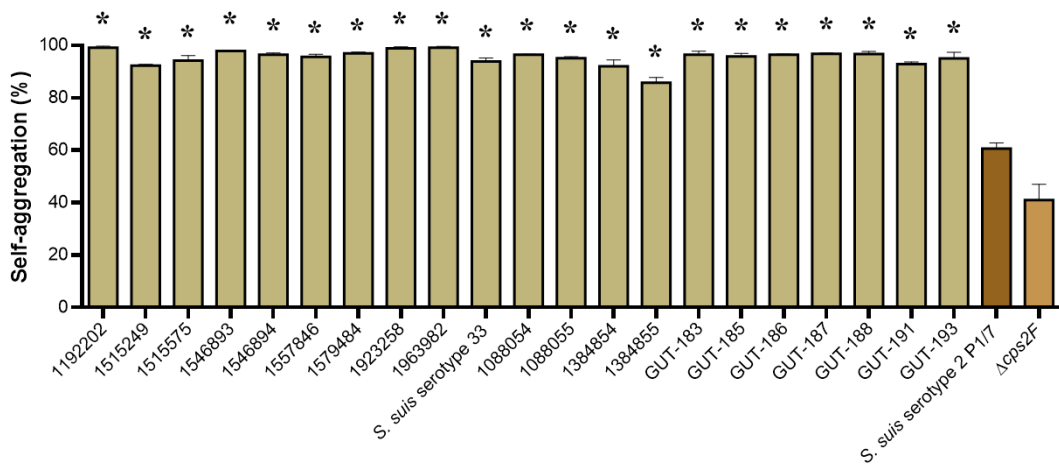


Figure 3: Self-aggregation assay of *S. ruminantium* isolates. Cell-to-cell aggregation of 21 strains of *S. ruminantium*, *S. suis* serotype 2 P1/7 and its mutant strain, was quantified in fluid phase after 24 h of incubation at 37 °C under static conditions. Data represent the mean \pm SEM (n = 3). * ($p < 0.05$) indicates a significant difference between the corresponding *S. ruminantium* strain and the *S. suis* serotype 2 P1/7 strain.

To confirm these results, we selected 4 strains of *S. ruminantium* on top of *S. suis* serotype 2 P1/7 and its isogenic mutant, to visualize their self-aggregation behavior by confocal microscopy. As expected, *S. ruminantium* strains form aggregates of multiple bacteria on and around the bovine epithelial cells unlike *S. suis* serotype 2 P1/7 and *S. suis* serotype 2 $\Delta cps2F$

mutant which both keep on being arranged in isolated pairs and/or short chains of bacteria (Figure 4).

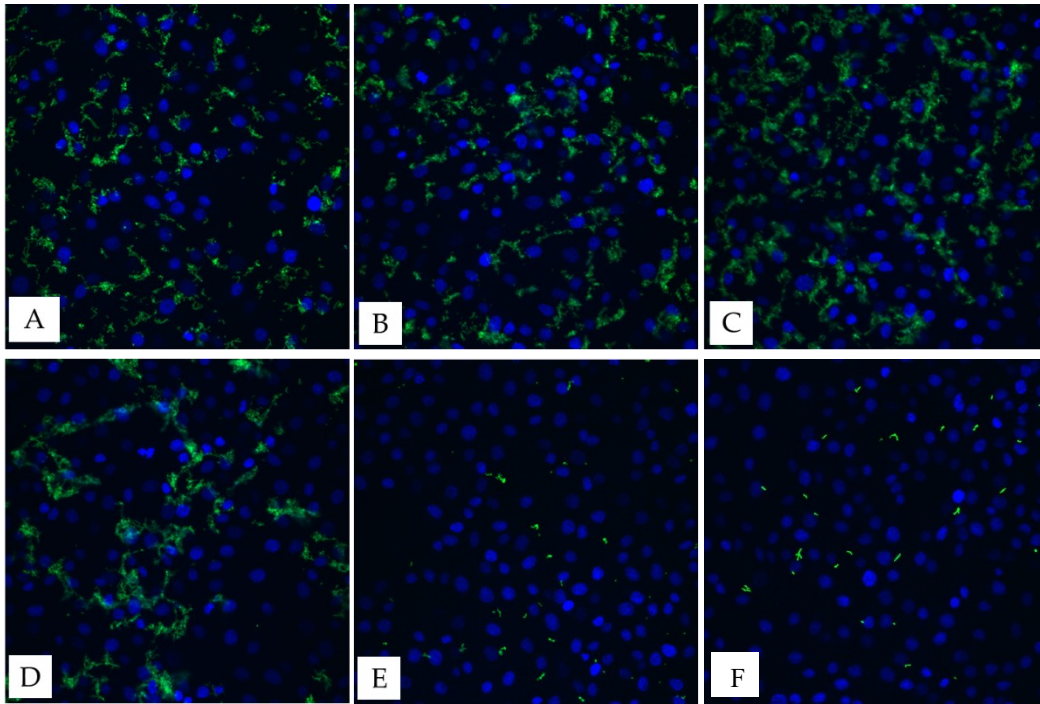


Figure 4: Confocal microscopy showing the self-aggregation phenotype of *S. ruminantium*. Madin-Darby Bovine Kidney cells (MDBK) (MOI:10) were incubated with FITC stained bacteria (green). After a bacteria-cell contact of 2h, cells were fixed and analyzed by confocal microscopy. DAPI was used to stain the nuclei (blue). (A) 1088054 strain; (B) 1546893 strain; (C) *S. suis* serotype 33 reference strain; (D) GUT-187 *S. ruminantium* reference strain; (E) *S. suis* serotype 2 p1/7 strain; (F) *S. suis* $\Delta cps2F$ mutant strain.

3.1.4. *S. ruminantium* forms biofilm to various extent with and without fibrinogen

It has been shown that self-aggregation and microcolony formation are among the first steps in building a biofilm [50]. Based on the previous results, we therefore investigated the capacity of *S. ruminantium* to form biofilm. The capacity of the serotype 2 P1/7 and S735 strains to form biofilm in the absence of fibrinogen was relatively low as it has been previously described in other studies (Figure 5) [32]. On the contrary, *S. ruminantium* strains showed a significantly greater capacity to form a biofilm without fibrinogen except the 1384855 strain which showed minimal biofilm formation similarly to *S. suis* strains. Furthermore, the addition of either porcine or bovine

fibrinogen at the same *in vivo* concentration in blood plasma (approximately 2-2,5 mg/mL) induced and/or enhanced the biofilm formation by *S. ruminantium* strains to various extents with no significant difference observed between the two sources of fibrinogen. However, low to no fibrinogen-induced biofilm was observed for 1088054, 1546893 and GUT187. On the other hand, fibrinogen-induced biofilm formation was present for both *S. suis* strains (positive control) as expected [32].

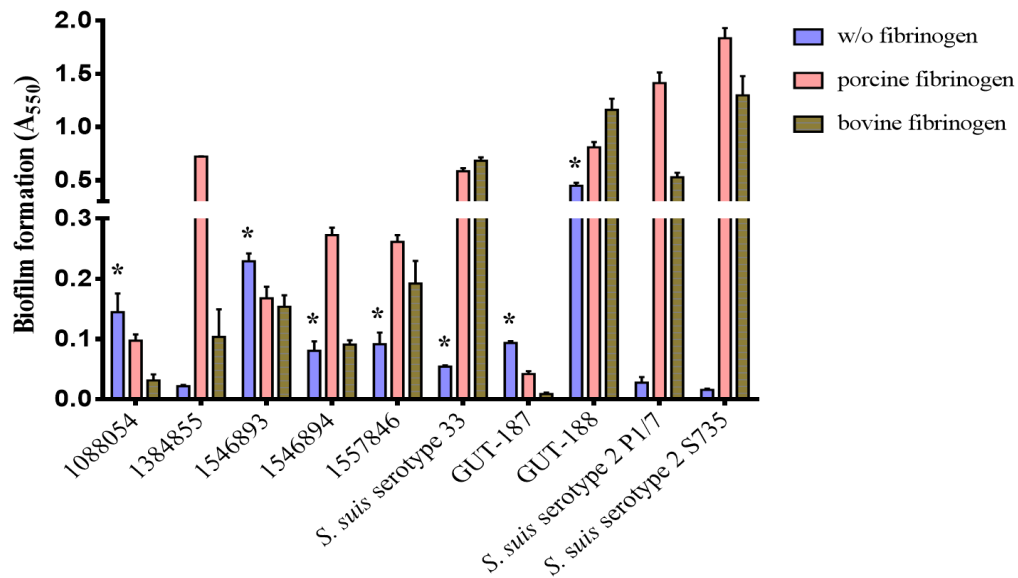


Figure 5: Biofilm formation by *S. ruminantium* in the presence and absence of porcine and bovine fibrinogen. Eight selected strains of *S. ruminantium* on top of *S. suis* serotype 2 P1/7 strain, were grown in a 96-well polystyrene tissue culture plate in the presence or absence of 2 mg/mL of either porcine or bovine fibrinogen. Biofilms were stained with crystal violet after 24 h of incubation at 37 °C. *S. suis* serotype 2 S735 strain was also used as a positive control. Data represent the mean \pm SEM (n = 3). * (p < 0.05) indicates a significant difference between the corresponding *S. ruminantium* strain and the *S. suis* serotype 2 P1/7 strain.

3.2. Interactions between *S. ruminantium* and host cells

3.2.1. Non-encapsulated *S. ruminantium* strongly adheres to and invades epithelial as well as endothelial cells

The CPS has been described to mask bacterial surface adhesins involved in the initial interactions with host cells, including adhesion to and invasion of epithelial cells [48]. Using both

bovine epithelial cells from kidney (MDBK) and swine epithelial cells from the upper respiratory tract (NPTTr), the adhesion and invasion capabilities of 8 selected *S. ruminantium* strains were evaluated and compared to those of *S. suis* serotype 2 P1/7. Adhesion to MDBK cell line of all *S. ruminantium* strains was significantly greater than that of *S. suis* serotype 2 P1/7 regardless of the incubation time (Figure 6A). Moreover, as opposed to a weak invasion of bovine epithelial cells observed for *S. suis* serotype 2 P1/7, *S. ruminantium* strains significantly invaded cells more efficiently at each incubation time (Figure 6B). Similar adhesion and invasion results were observed for the NPTTr cell line except for the 1384855 strain (Figure 6C and 6D). Indeed, the adhesion capacity of this strain was similar to the one of *S. suis* serotype 2 P1/7 despite the incubation time. This suggests that the 1384855 strain might have a cellular tropism toward bovine cells while other *S. ruminantium* strains do not.

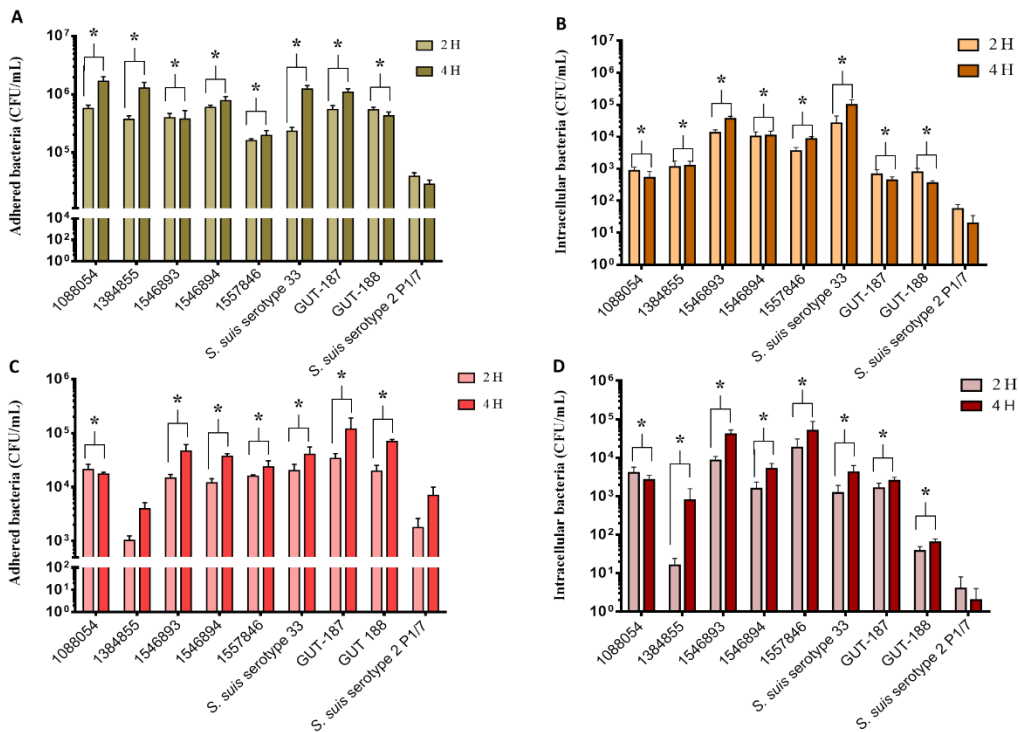


Figure 6: Adhesion to and invasion of Madin-Darby Bovine Kidney cells (MDBK) and Newborn Pig Tracheal cells (NPTTr) by *S. ruminantium*. Adhesion (A & C) and invasion (B & D) of 8 selected strains of *S. ruminantium* and *S. suis* serotype 2 P1/7 strain to MDBK bovine kidney epithelial cells (A & B) and NPTTr porcine tracheal epithelial cells (C & D) after 2 h and 4 h of incubation at an MOI of 1. Data represent the mean \pm SEM (n = 3). * (p < 0.05) indicates a significant difference between the corresponding *S. ruminantium* strain and the *S. suis* serotype 2 P1/7 strain.

S. ruminantium were further investigated by evaluating their attachment to and invasion of calf pulmonary artery endothelial cells (CPAE) and porcine aortic endothelial cells (AOC) with the same methodology as the one used for epithelial cells. Like the interactions with epithelial cells, the adhesion to both endothelial cells lines of all *S. ruminantium* strains were significantly greater than that of *S. suis* serotype 2 P1/7 strain regardless of the incubation time (Figure 7A and 7C). In addition, *S. ruminantium* strains invaded both cells lines more efficiently than *S. suis* serotype 2 P1/7 with a few exceptions (Figure 7B and 7D). Indeed, no differences were observed between the invasion capacity of the strain GUT-188 and *S. suis* serotype 2 P1/7 for the CPAE cells at 2 h of incubation and for the AOC cells at 4 h of incubation.

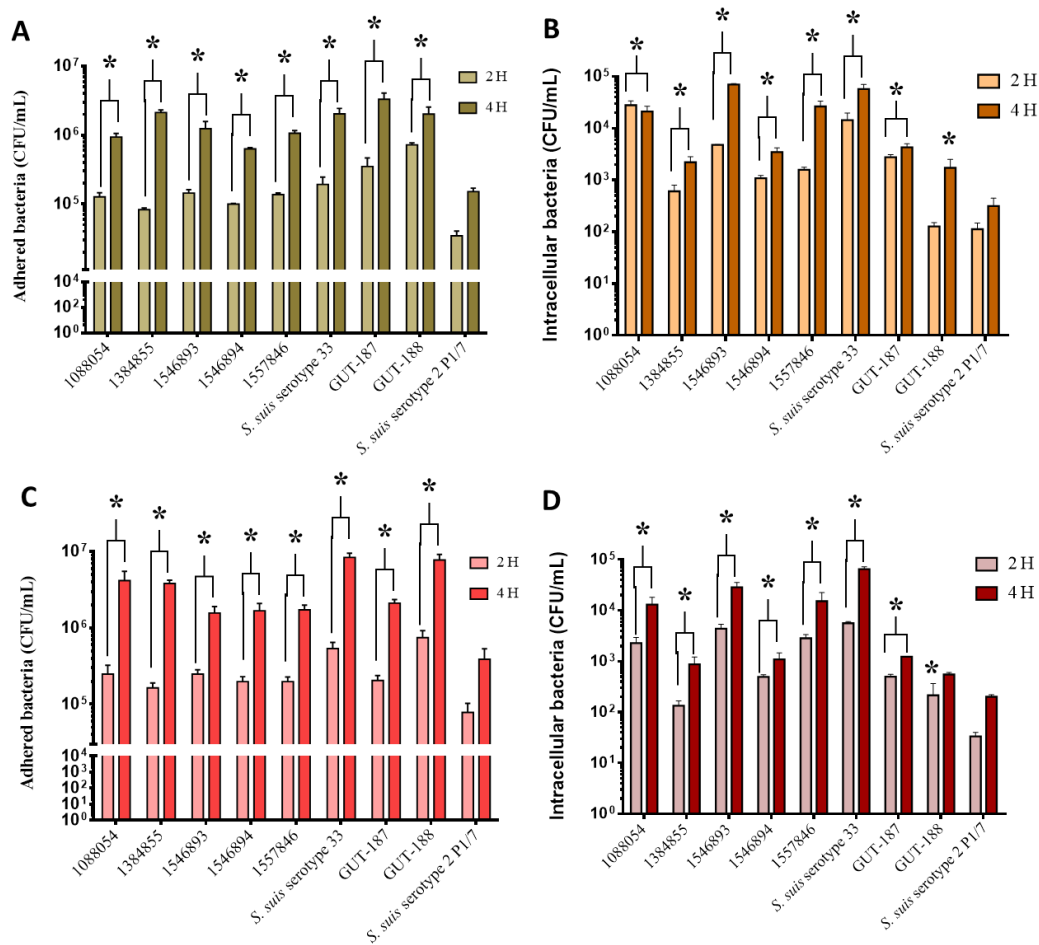


Figure 7: Adhesion to and invasion of Calf Pulmonary Artery Endothelial (CPAE) and Porcine Aortic Endothelial Cells (AOC) by *S. ruminantium*. Adhesion (A & C) and invasion (B & D) of 8 selected strains of *S. ruminantium* and *S. suis* serotype 2 P1/7 strain to CPAE calf pulmonary artery endothelial cells and AOC porcine aortic endothelial cells after

2 h and 4 h of incubation at an MOI of 1. Data represent the mean \pm SEM (n = 3). * (p < 0.05) indicates a significant difference between the corresponding *S. ruminantium* strain and the *S. suis* serotype 2 P1/7 strain.

3.2.2. Non-encapsulated *S. ruminantium* resists to the bactericidal effect of bovine whole blood

Several clinical manifestations, such as arthritis, mastitis and endocarditis, caused by *S. ruminantium* arise from bacterial dissemination in blood [12]. Hence, *S. ruminantium* must be able to resist killing by host blood leukocytes and multiply in this hostile environment using a similar mechanism than *S. suis* [48]. To evaluate this step in the pathogenesis of *S. ruminantium* infection, a bactericidal test with bovine whole-blood was performed. The non-encapsulated *S. suis* serotype 2 $\Delta cps2F$ mutant (used as a positive control) was killed at high rates (68%) compared to the wild-type strain, confirming previous data [51] (Figure 8). Surprisingly, all *S. ruminantium* strains were as resistant as *S. suis* serotype 2 P1/7 to bactericidal killing (between 20% and 50%) despite their non-encapsulated phenotype described above. Moreover, the 1384855 strain not only was resistant to bacterial killing but multiplied in bovine whole blood. These results suggest that *S. ruminantium* must have a different protective mechanism allowing them to persist in whole blood without the presence of CPS.

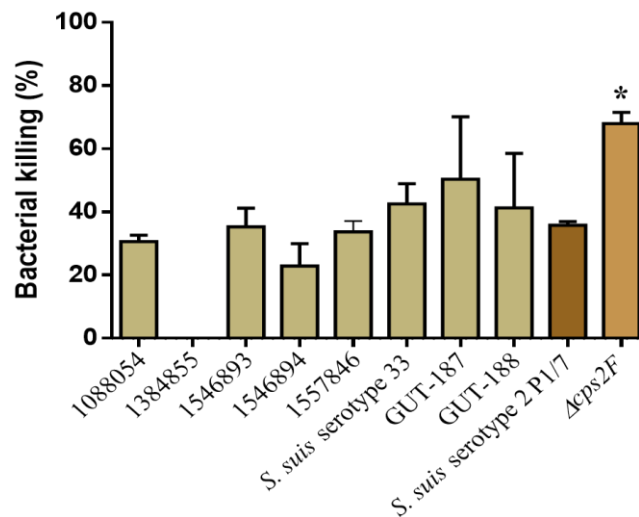


Figure 8: *S. ruminantium* resistance to killing by bovine whole blood. Capacity of 8 selected *S. ruminantium* strains, *S. suis* serotype 2 P1/7 and its mutant strain, to resist the bactericidal effect of bovine whole blood after 2 h of incubation. Percentage of bacterial survival was calculated in comparison to bacteria in plasma alone. Data represent

the mean \pm SEM (n = 3). * ($p < 0.05$) indicates a significant difference between the *S. ruminantium* strains or the non-encapsulated mutant strain $\Delta cps2F$ and *S. suis* serotype 2 P1/7 strain.

3.2.3. Dual phagocytosis resistance and killing of *S. ruminantium* by bovine monocytes-derived macrophages

To survive and even proliferate in host blood, bacteria must overcome the innate immunity by resisting to internalization by phagocytes [48]. To evaluate this function, bovine monocytes-derived macrophages were used after purification. As shown in figure 9, the wild-type serotype 2 P1/7 strain of *S. suis* was relatively resistant to phagocytosis and relatively few bacteria were found inside the cells. On the contrary, its non-encapsulated mutant strain $\Delta cps2F$ was significantly more internalized by bovine monocytes-derived macrophages. These results are comparable to those observed with bone marrow-derived dendritic cells and murine macrophages [25,52]. The anti-phagocytic properties of *S. ruminantium* appeared to be strain dependent. Surprisingly, most of the strains were little internalized similarly to *S. suis* serotype 2 P1/7 strain. However, *S. suis* serotype 33 and the 1088054 strain were significantly more internalized regardless of the incubation time just as the non encapsulated mutant strain $\Delta cps2F$ was.

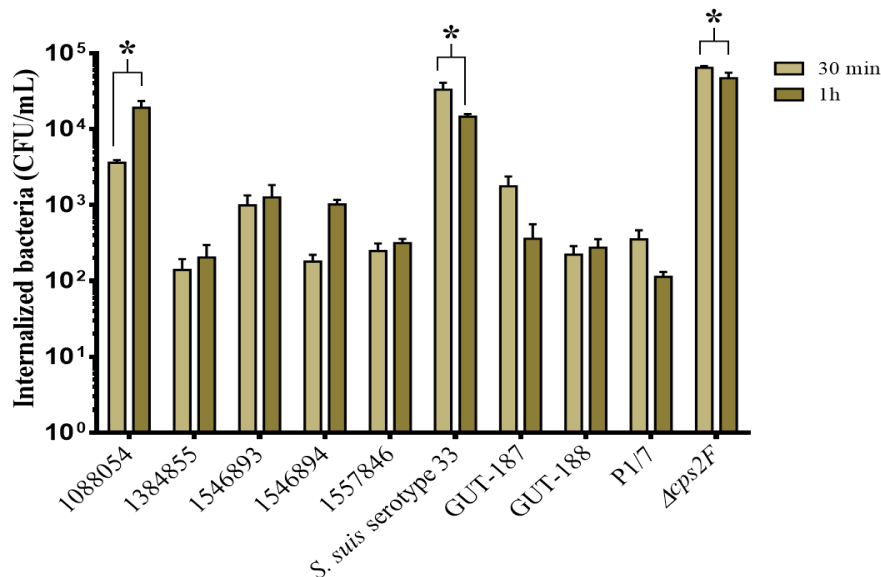


Figure 9: *S. ruminantium* strain-dependent resistance to phagocytosis by bovine monocytes-derived macrophages. Internalization in the presence of fresh bovine plasma of 8 selected *S. ruminantium* strains, *S. suis* serotype 2 P1/7

and its mutant strain, by bovine monocytes-derived macrophages after 30 min and 1 h of incubation. Data represent the mean \pm SEM (n = 3). * ($p < 0.05$) indicates a significant difference between the *S. ruminantium* strains or the non-encapsulated mutant strain $\Delta cps2F$ and *S. suis* serotype 2 P1/7 strain.

4. Discussion

Taxonomic classifications of bacterial species are constantly changing due to the development of new molecular genetic analysis. This is particularly the case for *S. suis* where 6 of its serotypes have been recently re-classified to other bacterial species [5-8]. Among them, the new pathogen species *S. ruminantium*, formerly known as *S. suis* serotype 33, has been proposed and associated with respiratory diseases as well as endocarditis and arthritis in ruminants [11,12]. Although knowledge about its close relative *S. suis* is extensive, information on *S. ruminantium* virulence and pathogenic potential is still scarce. Our results provide for the first time evidence of the pathogenicity and the virulence mechanisms of *S. ruminantium* in ruminants. Indeed, we demonstrated that *S. ruminantium* expresses several phenotypes such as a high cell-surface hydrophobicity, a self-aggregation capacity and biofilm formation allowing the bacteria to escape the host immune system and successfully induce disease.

For successful infections, pathogens express several virulent factors allowing them to survive and replicate in different host tissues during pathogenesis. Many putative virulence factors produced by *S. suis* have been described, including the muramidase-released protein (MRP), the extracellular protein factor (EPF) and the suliyisine (SLY) [51]. Indeed, an association between the expression of these proteins and virulence has been observed in Eurasian strains of *S. suis* [43,53]. However, some European and most Canadian virulent isolates do not produce these 3 factors showing that the absence of these proteins does not necessarily result in lack of virulence [44]. Thus, these proteins have now been considered as virulence markers rather than virulence factors for *S. suis* [48,54]. Interestingly, all *S. ruminantium* isolates used in this study were negative for the presence of those three virulence-associated genes. This result confirms that these factors are mainly useful for *S. suis* serotype 2 and to a lesser extent, serotypes 1 and 14 and indicates that *S. ruminantium* must express other virulence markers implicated in its pathogenesis. Among other putative virulence factors, the CPS is undisputedly considered to be

a critical virulence factor that confers protection for *S. suis* against the host immune system [48,54]. However, we showed by transmission electron microscopy that none of the *S. ruminantium* isolates possessed a thick capsule at its surface which correlates with the high and intermediate cell surface hydrophobicity observed, compared to *S. suis* serotype 2. Similar results were obtained by Okura *et al.* for other *S. ruminantium* isolates implying that unlike *S. suis* serotype 2, *S. ruminantium* strains are non-encapsulated or produce low amounts of capsule [12].

As critical as encapsulation is for *S. suis* pathogenesis, unencapsulation seems to also confer important virulence properties [54]. Indeed, Benga *et al.* suggested that the hydrophilic capsule may hinder hydrophobic structures or components implicated in biofilm formation [24,55,56]. This hypothesis aligns with the study done by Yi *et al.* [57], who reported a direct correlation between biofilm formation by *Neisseria meningitidis* and cell surface hydrophobicity. Moreover, Tanabe *et al.* [58], showed that a capsule deficient mutant of *S. suis* serotype 2 acquired a positive biofilm phenotype. Similarly, we found that all *S. ruminantium* isolates but the strain 1384855 were able to form a biofilm in absence of fibrinogen contrary to *S. suis* serotype 2. However, no correlation could be deduced between the cell surface hydrophobicity and the biofilm formation of each strain. Indeed, despite its high hydrophobicity percentage, the reference strain GUT-187 of *S. ruminantium* produced a similar biofilm level as the strain 1557846 which has an intermediate hydrophobicity percentage. This suggests that biofilm production by *S. ruminantium* is a strain-dependent phenotype just like it has been described for *Streptococcus agalactiae* [59]. The same phenotypic variation was observed between the strains when cultured with either porcine or bovine fibrinogen. For some of them, adding the glycoprotein significantly induced more biofilm formation while no increase was observed for 1088054, 1546893 and GUT-187 strains. Fibrinogen-induced biofilm formation was also observed for *S. suis* strains just like it has been reported by Bonifait *et al.* confirming the accuracy of the experiment [32].

Research on biofilms formed by animal pathogens is scarce. However, biofilm is often a major cause of chronic infections involved in many diseases including those associated with *S. ruminantium* infection such as pneumonia, endocarditis, arthritis, and mastitis [32,60]. Biofilm can be defined as a surface-attached aggregation of bacteria cells embedded in a self-produced matrix composed of polysaccharide as well as protein and DNA [56]. Self-aggregation and

microcolony formation appeared to be among the first steps in building a biofilm. Here, we demonstrated with unanimity that each *S. ruminantium* strains expressed a self-aggregation phenotype leading to microcolony formation visualized by confocal microscopy whereas *S. suis* serotype 2 was still arranged in isolated pairs of bacteria or single chains. Therefore, the ability of *S. ruminantium* to self-aggregate can contribute to biofilm formation and serve as an important virulence determinant in its pathogenesis [32,54,59].

Self-aggregation is one of many phenotypes that contribute to the initial step of several bacterial pathogenesis known as the colonization of host cells [61]. Indeed, a study done by Saldaña *et al.*, demonstrated that *Escherichia coli* adhesion/colonization of epithelial cells was enhanced by the formation of autoaggregants [62]. Similarly, adhesion to both bovine and porcine epithelial and endothelial cells (MDBK, NPTr, CPAE and AOC) by *S. ruminantium* strains were significantly higher than by *S. suis* serotype 2 except for the adhesion capacity to NPTr cells by the strain 1384855. These results reflect the potential positive correlation between the self-aggregation phenotype and the adhesion properties of *S. ruminantium*. However, we cannot exclude the fact that the increased number of bacteria attached to the cells might result from the attachment of bacteria to one another rather than the increased number of bacteria attached to the epithelial cells. Loss of CPS has also been reported to be beneficial to *S. suis* at different steps of its pathogenesis including the adherence and colonization of host cells [58,63]. Indeed, a capsule-deficient *S. suis* serotype 2 mutant adheres better than the parental strain to epithelial cells [62,55]. Therefore, the non-encapsulated phenotype of *S. ruminantium* strains might contribute as well to the high adhesion property observed thanks to the exposition of cell surface adhesins and other structures [24,55,56,58]. Moreover, non-encapsulated *S. suis* serotype 2 mutant strains were able to efficiently invade the epithelial cells whereas the wild-type strain rarely invaded [55]. Aligning with those results, *S. ruminantium* strains demonstrated a highly invasive phenotype to both bovine and porcine epithelial and endothelial cells except for GUT-188 strain's invasion of endothelial cells. Efficient adhesion and invasion of deeper tissue are essential to produce invasive disease such as those associated with *S. ruminantium* infection.

Once in the bloodstream, bacteria must survive the immune clearance to then disseminate and successfully induce disease. It has been demonstrated that *S. suis* survival in blood depends

on the production of a thick CPS [48]. Indeed, all published *in vitro* and *in vivo* studies with isogenic unencapsulated mutant strains have conclusively shown that the absence of CPS correlates with highly increased phagocytosis and killing of these strains with a rapid clearance from circulation [54]. Our study agrees with this consensus by showing that *S. suis* serotype 2 was significantly more resistant to the bactericidal effect of bovine whole blood as well as the phagocytosis by bovine monocytes-derived macrophages compared to its isogenic non-encapsulated mutant. Surprisingly, despite the absence of CPS, *S. ruminantium* strains were as resistant as *S. suis* serotype 2 to the bactericidal effect of whole blood. Furthermore, the strain 1383855 was even able to multiply in this hostile environment. These results suggest that other mechanisms are implicated for *S. ruminantium* survival in blood. Among them, self-aggregation and biofilm formation have been shown to influence pathogenesis by increasing tolerance against antimicrobial agents and promoting bacterial survival and fitness in general. Indeed, they can provide a growth advantage as well as a microenvironment allowing them to be protected from otherwise harsh environmental conditions or host defenses [32,50,59,64]. Biofilm had also been suggested as a protective mechanism against opsonic phagocytosis enhancing the bacterial survival in blood [64]. Moreover, the self-aggregation phenotype can impede phagocytosis by the cells of the host immune system which might explain the phagocytosis resistance observed for the majority of *S. ruminantium* strains. Indeed, the formation of aggregates might prevent the capacity of the host cell immune to mechanically internalize the bacteria attached to one another. However, 1088054 and *S. suis* serotype 33 were as much internalized as the isogenic mutant $\Delta cps2F$ by the monocytes-derived macrophages. Resistance to phagocytosis seems to be multifactorial and does not exclusively rely only on self-aggregation phenotype and biofilm production.

After resisting the immune clearance in the bloodstream, *S. ruminantium* disseminates toward several organs causing various systemic pathologies including endocarditis as the main clinical manifestation [8-12]. Endocarditis has also been reported for its close relative *S. suis* and most of the strains isolated from these lesions have lost their ability to produce the capsule [65-67]. This unencapsulated phenotype increases the ability of the bacteria to adhere to platelets, which is thought to be an important mechanism for the initial colonization of cardiac valves

[65,66]. Moreover, biofilm-positive phenotype has been suggested to enhance the formation of septic vegetations and cause chronic infection [31,32]. Thus, future studies should be carried out to evaluate the biological significance of the non-encapsulated and biofilm formation phenotypes of *S. ruminantium* in the pathogenesis of infective endocarditis.

5. Conclusion

This study revealed for the first time several phenotypic characteristics expressed by the new species *S. ruminantium*, formerly known as *S. suis* serotype 33, which might alter the interactions between the bacteria and the host cells. Indeed, the absence of capsule expression enhances the ability of *S. ruminantium* to adhere and invade host cells allowing the bacteria to cross the epithelial barrier and reach the bloodstream. The initial colonization of host cells by *S. ruminantium* might also be facilitated by its ability to self-aggregate leading to biofilm production. Moreover, the formation of auto-aggregates and biofilm structure seem to promote their blood survival by protecting them from the host immune system, notably by preventing the phagocytosis and the killing by white blood cells. This allows the bacteria to persist and induce chronic infection. Further *in vivo* and *ex-vivo* experiments should be carried out to assess the virulence potential of *S. ruminantium*. This study will help to increase understanding of the pathogenesis of the infection caused by *S. ruminantium* in ruminant diseases.

Author Contributions: Conceptualization, M.G. and A.B.; methodology, A.B., S.L., A.G., M.G.; writing—original draft preparation, A.B. and M.G.; writing—review and editing, A.B. and M.G.; supervision, M.G. and M.S.; project administration, M.G.; funding acquisition, M.G. and M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to MG (grant #-2022-03730) and to MS (Grant #2021-03020).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the University of Montreal (protocol code 1570, December 18th 2020)

Informed Consent Statement: Not applicable

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Sonia Lacouture (laboratory of M.G.) for technical help and advice.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest and the funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Gottschalk, M.; Segura, M. Streptococcosis. In *Diseases of Swine*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2019; pp. 934–950.
2. Gottschalk, M.; Xu, J.; Calzas, C.; Segura, M. Streptococcus suis: A new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Futur. Microbiol.* 2010, 5, 371–391
3. Mai, N.T.H.; Hoa, N.T.; Nga, T.V.T.; Linh, L.D.; Chau, T.T.H.; Sinh, D.X.; Phu, N.H.; Van Chuong, L.; Diep, T.S.; Campbell, J.; et al. Streptococcus suis meningitis in adults in Vietnam. *Clin. Infect. Dis.* 2008, 46, 659–667
4. Goyette-Desjardins, G.; Auger, J.-P.; Xu, J.; Segura, M.; Gottschalk, M. Streptococcus suis, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg. Microbes Infect.* 2014, 3, e45
5. Okura M, Osaki M, Nomoto R, Arai S, Osawa R, Sekizaki T, Takamatsu D hgin(2016) Current taxonomical situation of *Streptococcus suis*. *Pathogens* 5:E45
6. Hill JE, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, Goh SH (2005) Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that Streptococcus suis serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are Streptococcus orisratti. *Vet Microbiol* 107:63–66
7. Nomoto R, Maruyama F, Ishida S, Tohya M, Sekizaki T, Osawa R (2015) Reappraisal of the taxonomy of Streptococcus suis serotypes 20, 22 and 26: Streptococcus parasuis sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:438–443
8. Tohya M, Arai S, Tomida J, Watanabe T, Kawamura Y, Katsumi M, Ushimizu M, Ishida-Kuroki K, Yoshizumi M, Uzawa Y, Iguchi S, Yoshida A, Kikuchi K, Sekizaki T (2017) Defining the taxonomic status of Streptococcus suis serotype 33: the proposal for Streptococcus ruminantium sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:3660–3665
9. Tohya, M., et al., *Complete Genome Sequence of Streptococcus ruminantium sp. nov. GUT-187T (=DSM 104980T =JCM 31869T), the Type Strain of S. ruminantium, and Comparison with Genome Sequences of Streptococcus suis Strains.* *Genome Biol Evol*, 2018. **10**(4): p.1180-1184.
10. Neila-Ibáñez, C., et al., *First Report of Streptococcus ruminantium in Wildlife: Phenotypic Differences with a Spanish Domestic Ruminant Isolate.* *Microbiol Res*, 2022. **13**(1): p. 102-113

11. Gottschalk, M.; Lacouture, S.; Fecteau, G.; DesRochers, A.; Boa, A.; Saab, M.E.; Okura, M. Canada: Isolation of *Streptococcus ruminantium* (*Streptococcus suis*-like) from diseased ruminants in Canada. *Can. Vet. J.* **2020**, *61*, 473–475
12. Okura M, Maruyama F, Ota A, et al. Genotypical and serological diversity of *Streptococcus suis* and the *S. suis*-like bacterium, *Streptococcus ruminantium*, in ruminants. *Vet Res* 2019; 50:94.
13. Higgins R, Gottschalk M, Boudreau M, Lebrun A, Henrichsen J. Description of six new capsular types (29–34) of *Streptococcus suis*. *J Vet Diagn Invest* 1995;7:405–406
14. Hommez J, Wullepit J, Cassimon P, Castryck F, Ceyskens K, Devriese LA (1988) *Streptococcus suis* and other streptococcal species as a cause of extramammary infection in ruminants. *Vet Rec* 123:626–627
15. Higgins R, Gottschalk M, Fecteau G, Sauvageau R, De Guise S, Du Tremblay D (1990) Quebec. Isolation of *Streptococcus suis* from cattle. *Can Vet J* 31:529
16. Okwumabua O, Peterson H, Hsu HM, Bochsler P, Behr M (2017) Isolation and partial characterization of *Streptococcus suis* from clinical cases in cattle. *J Vet Diagn Invest* 29:160–168
17. Komatsu T, Watando E, Inaba N, Sugie K, Okura M, Shibahara T (2018) Bovine vegetative endocarditis caused by *Streptococcus suis*. *J Vet Med Sci* 80:1567–1571
18. Ishida S, Ie Tien HT, Osawa R, Tohya M, Nomoto R, Kawamura Y, Takahashi T, Kikuchi N, Kikuchi K, Sekizaki T (2014) Development of an appropriate PCR system for the reclassification of *Streptococcus suis*. *J Microbiol Methods* 107:66–70
19. Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, Segura M. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suisysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis.* 2011;204: 919–929. pmid:21849289
20. Auger J-P, Santinón A, Roy D, Mossman K, Xu J, Segura M, Gottschalk M (2017) Type I interferon induced by *Streptococcus suis* serotype 2 is strain-independent and may be beneficial for host survival. *Front Immunol* 8:1039
21. Slater JD, Allen AG, May JP, Bolitho S, Lindsay H, Maskell DJ. Mutagenesis of *Streptococcus equi* and *Streptococcus suis* by transposon Tn917. *Vet Microbiol.* 2003;93: 197–206. pmid:12695044
22. Vecht U, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE. Characterization of virulence of the *Streptococcus suis* serotype 2 reference strain Henrichsen S 735 in newborn gnotobiotic pigs. *Vet Microbiol.* 1996;51(1-2):125-136. doi:10.1016/0378-1135(96)00028-4
23. Silva L, Baums CG, Rehm T, Wisselink H, Goethe R, Valentin-Weigand P. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Vet Microbiol.* 2006;115:117–127
24. Laetitia Bonifait, Marcelo Gottschalk, Daniel Grenier, Cell surface characteristics of nontypeable isolates of *Streptococcus suis*, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 311, Issue 2, October 2010, Pages 160–166, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02086.x>
25. Auger JP, Dolbec D, Roy D, Segura M, Gottschalk M. Role of the *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide in the interactions with dendritic cells is strain-dependent but remains critical for virulence. *PLoS One.* 2018;13: e0200453. pmid:30001363
26. Jacques M, Gottschalk M, Foiry B, Higgins R. Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol.* 1990;172:2833–2838
27. Chuzeville, S., Auger, JP., Dumesnil, A. et al. Serotype-specific role of antigen I/II in the initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*. *Vet Res* 48, 39 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0443-4>

28. Bordeleau E, Purcell EB, Lafontaine DA, Fortier LC, Tamayo R, Burrus V (2015) Cyclic di-GMP riboswitch-regulated type IV pili contribute to aggregation of *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 197:819–832
29. Mathieu-Denoncourt A, Letendre C, Auger JP, et al. Limited Interactions between *Streptococcus Suis* and *Haemophilus Parasuis* in In Vitro Co-Infection Studies. *Pathogens*. 2018;7(1):7. Published 2018 Jan 6. doi:10.3390/pathogens7010007
30. Lecours M-P, Segura M, Fittipaldi N, Rivest S, Gottschalk M (2012) Immune Receptors Involved in *Streptococcus suis* Recognition by Dendritic Cells. *PLoS ONE* 7(9): e44746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044746>
31. Grenier D, Grignon L, Gottschalk M. 2009. Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate. *Vet. J.* 179:292–295
32. Bonifait L, Grignon L, Grenier D. Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(15): 4969±4972. <https://doi.org/10.1128/AEM.00558-08> PMID: 18539785
33. Wang Y, Gagnon CA, Savard C, Music N, Srednik M, Segura M, Lachance C, Bellehumeur C, Gottschalk M (2013) Capsular sialic acid of *Streptococcus suis* serotype 2 binds to swine influenza virus and enhances bacterial interactions with virus-infected tracheal epithelial cells. *Infect Immun* 81:4498–4508
34. MADIN, S. H., & DARBY, N. B., Jr (1958). Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 98(3), 574–576. <https://doi.org/10.3181/00379727-98-24111>
35. Carrillo A, Chamorro S, Rodriguez-Gago M, et al. Isolation and characterization of immortalized porcine aortic endothelial cell lines. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;89:91–98
36. Gollnick, N. S., Mitchell, R. M., Baumgart, M., Janagama, H. K., Sreevatsan, S., & Schukken, Y. H. (2007). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine monocyte-derived macrophages is not affected by host infection status but depends on the infecting bacterial genotype. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 120(3-4), 93–105
37. F. Ceciliani, G. Ávila Morales, G. De Matteis, F. Grandoni, R. Furiioso Ferreira, P. Roccabianca, C. Lecchi (2020) Methods in isolation and characterization of bovine monocytes and macrophages. *Methods*.
38. Ramon A. Juste ,Marta Alonso-Hearn,Joseba M. Garrido,Naiara Abendaño,Iker A. Sevilla,Christian Gortazar,José de la Fuente,Lucas Dominguez (2016) Increased Lytic Efficiency of Bovine Macrophages Trained with Killed *Mycobacteria*.
39. Roland, L., Drillich, M., & Iwersen, M. (2014). Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 26(5), 592–598. <https://doi.org/10.1177/1040638714546490>
40. Auger J-P, Fittipaldi N, Benoit-Biancamano M-O, Segura M, Gottschalk M. Virulence studies of different sequence types and geographical origins of *Streptococcus suis* serotype 2 in a mouse model of infection. *Pathogens.* 2016;5: 48
41. Pires, P. S., Santos, R. L., da Paixão, T. A., de Oliveira Bernardes, L. C., de Macêdo, A. A., Gonçalves, L. A., de Oliveira Júnior, C. A., Silva, R. O., & Lobato, F. C. (2017). Intracellular survival of *Clostridium chauvoei* in bovine macrophages. *Veterinary microbiology*, 199, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.027>.

42. Puech, C., Dedieu, L., Chantal, I. et al. Design and evaluation of a unique SYBR Green real-time RT-PCR assay for quantification of five major cytokines in cattle, sheep and goats. *BMC Vet Res* 11, 65 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0382-0>
43. Gottschalk, M., Segura, M., Xu, J., 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim. Health Res. Rev.* 8, 29–45
44. Fittipaldi, N., Fuller, T. E., Teel, J. F., Wilson, T. L., Wolfram, T. J., Lowery, D. E., & Gottschalk, M. (2009). Serotype distribution and production of muramidase-released protein, extracellular factor and suilysin by field strains of *Streptococcus suis* isolated in the United States. *Veterinary microbiology*, 139(3-4), 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.024>
45. Gottschalk M, Lebrun A, Wisselink H, Dubreuil JD, Smith H, Vecht U. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res Rev Can Rech Veterinaire.* 1998;62:75–9.
46. Estrada, A.A., Gottschalk, M., Rendahl, A. et al. Proposed virulence-associated genes of *Streptococcus suis* isolates from the United States serve as predictors of pathogenicity. *Porc Health Manag* 7, 22 (2021). <https://doi.org/10.1186/s40813-021-00201-6>
47. Lecours MP, Fittipaldi N, Takamatsu D, Okura M, Segura M, Goyette-Desjardins G, et al. Sialylation of *Streptococcus suis* serotype 2 is essential for capsule expression but is not responsible for the main capsular epitope. *Microbes and infection / Institut Pasteur.* 2012;14: 941–950
48. N. Fittipaldi, M. Segura, D. Grenier, M. Gottschalk, Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*, *Future Microbiol.* 7 (2011) 259e279
49. Gottschalk, M., Lacouture, S., Bonifait, L., Roy, D., Fittipaldi, N., & Grenier, D. (2013). Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Québec, Canada. *Veterinary microbiology*, 162(2-4), 819–825. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.028>
50. Trunk T, Khalil HS, Leo JC. Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiol.* 2018;4(1):140-164. Published 2018 Mar 1. doi:10.3934/microbiol.2018.1.140
51. Baums, C.G. and Valentin-Weigand, P. (2009) Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Anim. Health Res. Rev.* 10, 65–83
52. Auger, J.P.; Payen, S.; Roy, D.; Dumesnil, A.; Segura, M.; Gottschalk, M. Interactions of *Streptococcus suis* serotype 9 with host cells and role of the capsular polysaccharide: Comparison with serotypes 2 and 14. *PLoS ONE* 2019, 14, e0223864F
53. Vecht, U. et al. (1991) Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect. Immun.* 59, 3156–3162
54. Segura, M., Fittipaldi, N., Calzas, C., & Gottschalk, M. (2017). Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors: Are They All Really Critical?. *Trends in microbiology*, 25(7), 585–599. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.005>
55. Benga L, Goethe R, Rohde M & Valentin-Weigand P (2004) Nonencapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cell Microbiol* 6: 867–881.
56. Benga L, Fulde M, Neis C, Goethe R & Valentin-Weigand P (2008) Polysaccharide capsule and suilysin contribute to extracellular survival of *Streptococcus suis* co-cultivated with primary porcine phagocytes. *Vet Microbiol* 132: 211–219

57. Yi K, Rasmussen AW, Gudlavalleti SK, Stephens DS, Stojiljkovic I. Biofilm formation by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*. 2004;72(10):6132-6138. doi:10.1128/IAI.72.10.6132-6138.2004
58. Tanabe SI, Bonifait L, Fittipaldi N, Grignon L, Gottschalk M & Grenier D (2010) Pleiotropic effects of polysaccharide capsule loss on selected biological properties of *Streptococcus suis*. *Can J Vet Res* 74: 65–70
59. Parker, R. E., Laut, C., Gaddy, J. A., Zadoks, R. N., Davies, H. D., & Manning, S. D. (2016). Association between genotypic diversity and biofilm production in group B *Streptococcus*. *BMC microbiology*, 16, 86
60. Wang, Y., Wang, Y., Sun, L., Grenier, D., & Yi, L. (2018). *Streptococcus suis* biofilm: regulation, drug-resistance mechanisms, and disinfection strategies. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(21), 9121–9129. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9356-z>
61. Nwoko, E. Q. A., & Okeke, I. N. (2021). Bacteria autoaggregation: how and why bacteria stick together. *Biochemical Society transactions*, 49(3), 1147–1157. <https://doi.org/10.1042/BST20200718>
62. Saldaña, Z., Erdem, A.L., Schüller, S., Okeke, I.N., Lucas, M., Sivananthan, A. et al. (2009) The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. *J. Bacteriol.* 191, 3451–3461 <https://doi.org/10.1128/JB.01539-08>
63. Wibawan, I. W., & Lämmle, C. (1994). Relation between encapsulation and various properties of *Streptococcus suis*. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*, 41(7-8), 453–459. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1994.tb00250.x>
64. Donlan, R. M., and J. W. Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:167–193
65. Lakkitjaroen, N. et al. (2011) Loss of capsule among *Streptococcus suis* isolates from porcine endocarditis and its biological significance. *J. Med. Microbiol.* 60, 1669–1676
66. Lakkitjaroen, N. et al. (2014) Capsule loss or death: the position of mutations among capsule genes sways the destiny of *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 354, 46–54
67. Auger, J.P. et al. (2016) *Streptococcus suis* serotype 2 capsule in vivo. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1793–1796

IV/Discussion

Streptococcus suis est un pathogène bactérien et zoonotique majeur responsable de pertes économiques considérables pour l'industrie porcine à l'échelle mondiale. Il s'agit également d'un organisme extrêmement diversifié d'un point de vue phénotypique et génétique avec 29 sérotypes identifiés. Parmi ces sérotypes, le sérotype 2 est le sérotype le plus étudié en raison de sa forte prévalence associée aux cas cliniques porcins et humains. Ceci est d'ailleurs la raison pour laquelle la souche classique P1/7 du sérotype 2 a été utilisée à titre de comparaison dans cette étude. Cependant, le développement de nouvelles analyses moléculaires phylogénétiques a permis de remettre en question la classification de 6 sérotypes de *S. suis* dont le sérotype 33, renommé en tant que nouvelle espèce *Streptococcus ruminantium*. Contrairement à *S. suis*, *S. ruminantium* n'a été isolé présentement que chez des ruminants, d'où le nom scientifique choisi pour représenter l'espèce. La bactérie a été retrouvée aussi bien chez des individus cliniquement sains que malades. En effet, *S. ruminantium* est responsable de diverses manifestations cliniques dont principalement des endocardites et des arthrites. Malgré l'étendue des connaissances sur la pathogénicité de *S. suis*, plusieurs lacunes concernant les caractéristiques biologiques et pathologiques de *S. ruminantium* demeurent. De plus, *S. suis* et *S. ruminantium* sont très difficiles à différencier l'un de l'autre par le biais des tests biochimiques de routine des laboratoires de diagnostic. Or, plusieurs souches de *S. suis* ont également été isolées de ruminants malades avant la mise à jour de la classification. Autrement dit, plusieurs erreurs de diagnostic ont été commises et sous-estiment la prévalence et l'importance étiologique de *S. ruminantium* chez les ruminants. Ainsi, cette étude a permis non seulement d'accroître nos données épidémiologiques de cette nouvelle espèce, mais aussi de caractériser plusieurs souches et d'étudier pour la première fois les premières étapes de la pathogénèse de son infection.

1. L'analyse génétique par PCR est requise pour bien diagnostiquer l'agent étiologique des maladies causées par des streptocoques chez les ruminants

La forte diversité phénotypique associée aux espèces du genre *Streptococcus*, complexifie leur identification en se basant uniquement sur des analyses microbiologiques traditionnelles de type phénotypique et biochimique [189]. L'application de techniques moléculaires a permis de

révolutionner la taxonomie du genre *Streptococcus* incluant celle de *S. suis*. Initialement, l'identification de *S. suis* se basait sur l'analyse par PCR du gène codant pour la glutamate déshydrogénase (*gdh*-PCR) [169-171]. Cependant, cette méthode s'est avérée inefficace pour différencier les souches authentiques de *S. suis* par rapport aux 6 sérotypes nouvellement reclassifiés en d'autres espèces de streptocoques tels que *S. ruminantium* [18]. Or bien que *S. ruminantium* soit associé à plusieurs pathologies chez les ruminants, certaines souches authentiques de *S. suis* ont également été isolées de ruminants malades d'où la nécessité d'utiliser des méthodes diagnostiques performantes pour les différencier [18, 168].

Dans cette optique, 14 isolats de *S. suis* provenant de cas cliniques divers chez des ruminants au travers du Canada, ont été réanalysés à l'aide des nouvelles méthodes d'analyse moléculaires développées. Parmi ces méthodes, la technique de spectrométrie de masse à temps de vol pour la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF MS) s'est avérée être un outil alternatif rapide et rentable pour l'identification de plusieurs espèces du genre *Streptococcus* incluant *S. suis* [190-192]. L'utilisation de MALDI-TOF a permis de mettre en évidence que 9 des isolats correspondraient bel et bien à *S. suis* tandis que 4 d'entre eux appartenaient plutôt à l'espèce *Streptococcus mitis* et 1 autre à l'espèce *Streptococcus oralis* (voir table 1 article scientifique). Ces deux espèces de streptocoques sont connues comme appartenant au groupe de streptocoques viridans (VGS). Il s'agit d'organismes commensaux de la cavité orale, occasionnant sporadiquement des infections systémiques en tant que pathogènes opportunistes [193]. D'après l'étude réalisée par Werinder *et al.* (2021), ces résultats doivent être pris avec précaution puisque des erreurs d'identification ont été relevées par cette méthode lors de l'identification de souches semblables à *S. suis*. Autrement dit, des analyses additionnelles sont nécessaires pour confirmer l'identification de ces espèces.

Actuellement, l'identification des souches authentiques de *S. suis* nécessite l'analyse par PCR du gène codant pour la protéine de recombinaison/réparation de l'ADN (*recN*-PCR) [195]. Ce dernier n'est pas en mesure d'identifier les 6 sérotypes reclassifiés de *S. suis* et permet donc de différencier les *S. suis* authentiques par rapport aux autres espèces y ressemblant. De plus, la séquence en nucléotides de la chaperone-60 (*cpn60*) et le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S sont des outils taxonomiques efficaces pour l'identification des streptocoques à l'échelle de

l'espèce [13, 30, 172-175]. Selon les résultats obtenus dans la table 1 de l'annexe 1, les isolats n'appartiendraient pas à *S. suis* contrairement à ce qui avait été diagnostiqué dans le passé ainsi que les résultats obtenus par MALDI-TOF MS. En effet, tous les isolats se sont avérés négatifs au *recN*-PCR. De plus, le séquençage de l'ARNr 16S et du gène *cpn60*, ont démontré un pourcentage de similitude beaucoup plus élevé entre les isolats et *S. ruminantium* plutôt qu'avec la souche *S. suis* S735 (voir table 2 de l'annexe 1). Ces résultats démontrent que les isolats ne sont pas des souches authentiques de *S. suis* mais sont génétiquement beaucoup plus proches de *S. ruminantium* plutôt que *S. suis*. Avec la description récente de *S. ruminantium*, Okura *et al.* ont également mis au point un nouveau PCR spécifique pour identifier cette nouvelle espèce. Afin de confirmer l'appartenance de ces isolats à *S. ruminantium*, le PCR spécifique pour *S. ruminantium* a été réalisé dans cette étude. Comme suspecte, tous les isolats sont ressortis positifs pour ce PCR confirmant que ces souches appartiennent bel et bien à la nouvelle espèce de *S. ruminantium* (voir table 1 de l'annexe 1). L'analyse sérotypique est largement utilisée pour suivre l'épidémiologie de *S. suis*. Elle a également été réalisée à l'aide d'un PCR multiplex et a démontré que le principal sérotype de *S. suis* associé à ces isolats était celui du sérotype 33 tandis que les autres isolats étaient non typables. Ces résultats s'alignent avec ceux mentionnés dans la littérature et ceux obtenus précédemment puisque le sérotype 33 de *S. suis* fait dorénavant parti de *S. ruminantium*.

Cette étude démontre que plusieurs erreurs d'identification ont été réalisées dans le passé sous-estimant l'importance étiologique de *S. ruminantium* chez les ruminants. Ainsi, afin d'éviter des erreurs diagnostiques lorsque l'on isole des souches semblables à *S. suis* à partir de ruminants, la première étape consiste à les différencier de *S. ruminantium* en effectuant le PCR spécifique. Dans les cas où les résultats sont négatifs, le test *recN*-PCR doit être réalisé pour identifier s'il s'agit de *S. suis* et ensuite effectuer le sérotypage à l'aide du PCR multiplex à deux étapes si le résultat est positif [17, 176].

2. Caractérisation de souches de *S. ruminantium* isolées de ruminants

2.1. *S. ruminantium* ne porte aucun des trois gènes (*mrp*, *epf*, *sly*) codant pour des marqueurs de virulence décrits chez *S. suis*

Les pathogènes ont recours à une variété de stratégies afin d'infecter et d'induire avec succès le développement de diverses maladies malgré la présence des mécanismes de défense de l'hôte. Ces stratégies impliquent l'utilisation de facteurs de virulence produits par les microorganismes tels que des toxines, des protéines et/ou des récepteurs présents à la surface cellulaire, des capsules ... [196]. Plus de 100 facteurs de virulence putatifs ont été décrits jusqu'à présent comme jouant un rôle dans la pathogénèse de l'infection causée par *S. suis* [69, 127]. Cependant, plusieurs contradictions demeurent quant à l'aspect critique de ces facteurs pour la virulence de la bactérie en raison de la grande variabilité observée selon les méthodes expérimentales et les souches utilisées. La détermination des facteurs de virulence critiques chez *S. suis* reste donc un processus difficile et controversé. Cependant, bien qu'accessoires, certains facteurs dont la protéine muramidase-released (MRP), la protéine du facteur extracellulaire (EPF) et la toxine hémolysine suilysine (SLY) ont été largement utilisés comme marqueurs de virulence afin de prédire le potentiel de virulence de certaines souches de *S. suis* dans différents pays [197].

MRP est une protéine de surface de 136 kDa ancrée à la paroi cellulaire et excrétée dans le surnageant lors de la croissance bactérienne [198]. Le facteur extracellulaire (EF) est une protéine de 110 kDa sécrétée dans le milieu extracellulaire [199]. Bien que considérés comme des marqueurs de virulence, leurs fonctions dans la pathogénèse de *S. suis* restent encore nébuleuses à ce jour. Récemment, des études ont mis en évidence la capacité de la protéine MRP à se lier au fibrinogène humain permettant d'augmenter les propriétés antiphagocytaires de *S. suis* menant à une meilleure survie de la bactérie dans le sang. De plus, cette liaison permettrait de promouvoir le développement de méningite en détruisant les jonctions intercellulaires des cellules endothéliales et augmentant de ce fait la perméabilité de la barrière hématoencéphalique [199, 200]. Cependant l'absence de ces protéines n'entraîne pas nécessairement une diminution de la virulence de *S. suis* [69, 127].

La suilysine est une toxine hémolysine de 54 kDa liant le cholestérol de la membrane cellulaire eucaryote. Elle a été démontrée comme jouant un rôle dans plusieurs étapes du processus infectieux de *S. suis*. En effet, sa propriété cytolytique entraîne une destruction des cellules de l'hôte nécessaire à l'invasion de la bactérie [73, 77, 89, 100, 108]. Elle assure également une certaine protection à *S. suis* face à l'opsonophagocytose des cellules dendritiques facilitant

l'étape de dissémination [80]. Finalement, elle serait impliquée dans le déclenchement d'une réponse inflammatoire importante [80, 88, 109-113]. Contrairement à *S. suis* sérotype 2, aucune des souches isolées de *S. ruminantium* ne possède les gènes codant pour ces 3 marqueurs de virulence. Autrement dit, *S. ruminantium* expriment probablement d'autres facteurs de virulence impliqués dans sa pathogénèse. Ces résultats confirment également que ces facteurs seraient principalement utiles pour caractériser les souches de *S. suis* sérotype 2 ainsi que les sérotypes 1 et 14 à une moindre mesure.

2.2. *S. ruminantium* exprime faiblement voire aucune CPS menant à une augmentation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire

De tous les facteurs de virulence putatifs décrits chez *S. suis*, la capsule polysaccharidique est unanimement reconnue en tant que facteur critique pour la virulence de la bactérie [57]. En effet, du fait de sa nature polysaccharidique, elle procure une propriété hydrophile à la surface bactérienne de *S. suis* en masquant les composés hydrophobes de la paroi cellulaire [57]. Ceci lui permet de jouer un rôle de bouclier contre la phagocytose et le "killing" par les cellules immunitaires de l'hôte facilitant la survie de *S. suis* dans le sang [77, 79, 80, 98, 99]. De plus, son faible pouvoir immunogène observé entraîne une diminution de la production de médiateurs inflammatoires [102, 103]. Cette diminution serait potentiellement liée à la non-exposition des composés activateurs de la paroi cellulaire. Finalement l'épaisseur de la capsule serait corrélée positivement à la virulence de la bactérie selon des études *in vivo* [104]. À l'inverse, tous les isolats de *S. ruminantium* analysés dans cette étude n'expriment que de faible quantité voire même aucune capsule polysaccharidique. Ceci est fort probablement corrélé avec les hauts pourcentages d'hydrophobicité observés pour les souches de *S. ruminantium* comparativement à *S. suis* sérotype 2, suite à l'exposition des composés hydrophobes de la surface cellulaire bactérienne.

Ainsi, *S. ruminantium* serait dépourvu d'une capsule polysaccharidique comme suggéré par Okura *et al* [18]. Cependant, il reste difficile de déterminer si ces souches étaient déjà non encapsulées avant l'infection ou si elles auraient perdu leur capacité d'exprimer leur CPS au cours de leur isolation ou de l'infection [10, 51]. Cette même hypothèse a été suggérée pour les

souches non encapsulées de *S. suis* en particulier celles isolées de cas d'endocardites. En effet, malgré le rôle déterminant de la CPS dans la pathogénèse de *S. suis*, certaines bactéries seraient en mesure de réguler l'expression de leur CPS en fonction des conditions environnementales (pH, température, disponibilité des glucoses ou autres carbohydrates) ou des étapes du processus d'infection [32, 57, 127]. D'ailleurs, Auger *et al.* ont mis en évidence la capacité d'une souche non virulente et non encapsulée de *S. suis* issue d'un cas d'endocardite, de rétablir l'expression de sa CPS après plusieurs passages *in vivo* et consécutivement de restaurer sa virulence [202]. Cette modulation se ferait par différents mécanismes dont des insertions/délétions de gènes ou d'autres types de mutations réversibles au sein des gènes impliqués dans la régulation de la synthèse de la CPS [50, 51]. Néanmoins, d'autres études analysant la composition génétique du cluster responsable de la biosynthèse de la CPS chez les souches de *S. ruminantium* sont nécessaires afin d'évaluer cette hypothèse.

2.3. *S. ruminantium* exprime un phénotype d'auto-agrégation menant à la formation de microcolonies

La perte de capsule s'avère également bénéfique pour certaines étapes de la pathogénèse de *S. suis*. En effet, les souches non encapsulées démontrent une plus grande capacité d'adhérence aux cellules mammifères et humaines aussi bien épithéliales, endothéliales et plaquettes que les souches encapsulées [203]. Ceci serait dû à l'exposition des protéines, telles que des adhésines ou des récepteurs, présentes à la surface cellulaire des bactéries qui normalement seraient masquées par la CPS [203-205]. Le caractère hydrophobe de ces protéines faciliterait l'adhérence entre les bactéries et les cellules de l'hôte. De plus, cette surface cellulaire hydrophobe permettrait aux bactéries de s'auto-agrégier formant ainsi des microcolonies [203]. Comme démontré dans cette étude, toutes les souches de *S. ruminantium* expriment un fort pourcentage d'auto-agrégation contrairement à *S. suis* sérotype 2. De plus, elles sont en mesure de former des microcolonies visualisées par microscopie confocale. Ces résultats confirment la corrélation positive mentionnée ci-dessus entre l'augmentation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire bactérienne et l'expression du phénotype d'auto-agrégation. Cependant, cette association n'a pas été observée pour la souche mutante non-encapsulée de *S. suis* sérotype 2. En effet, malgré

l'absence de la CPS, seul un faible pourcentage d'auto-agrégation a été exprimé par la souche mutante. De plus, l'analyse par microscopie confocale a permis de confirmer ce résultat en révélant une organisation en chaînes ou en paires des bactéries. Des résultats similaires ont été décrits dans la littérature pour les espèces *Pediococcus pentosaceus* et *Lactobacillus fermentum* où une corrélation négative définie par une diminution de l'hydrophobicité et une augmentation de l'auto-agrégation a été décrite [206, 207]. Ainsi le phénomène d'auto-agrégation serait en fait beaucoup plus complexe et résulterait plutôt des propriétés physico-chimiques des protéines et/ou des exo-polysaccharides exprimés à la surface cellulaire et nommés auto-agglutinines [207]. Plusieurs classes d'auto-agglutinines ont été décrites dont la protéine M chez *Streptococcus pyogenes* [208, 209]. Chez *S. suis*, les données disponibles indiquent que seul l'antigène I/II serait possiblement impliqué dans la capacité d'auto-agrégation pour le sérotype 9 spécifiquement [129].

Bien que largement répandu dans le monde bactérien aussi bien chez les espèces environnementales que pathogéniques, le mécanisme d'auto-agrégation est encore mal défini. Certaines études ont mis en évidence son rôle protecteur face aux conditions environnementales stressantes et aux réponses immunitaires de l'hôte [207, 209]. De plus, l'auto-agrégation fait souvent partie des premières étapes dans la formation de biofilm, un autre facteur de virulence important.

2.4. *S. ruminantium* est capable de produire du biofilm en présence et en absence de fibrinogène

Les biofilms jouent un rôle important dans plusieurs maladies en assurant une protection contre divers stress environnementaux ou le système immunitaire de l'hôte ainsi qu'en procurant une résistance bactérienne face aux antibiotiques. Ils sont également impliqués dans plusieurs étapes de la pathogénèse faisant d'eux un facteur de virulence important [209]. De plus, ils représentent une communauté structurée de cellules bactériennes enrobées d'une matrice polymérique auto-produite et attachée à une surface biotique ou abiotique. Sa formation débute par le passage de la bactérie d'un état planctonique à un état d'attachement à une surface. L'auto-agrégation et la formation de microcolonies bactériennes peuvent contribuer à cette

formation selon 2 procédés différents. La bactérie peut individuellement s'attacher au substrat par l'expression d'adhésines de surface puis déclencher le recrutement d'autres cellules et s'y lier à l'aide des auto-agglutinines pour ensuite mener à la formation de microcolonies. Le mécanisme alternatif consiste en l'auto-agrégation des bactéries en solution suivi de l'attachement de l'agrégat à la surface initiant alors la formation de biofilm [209].

Notre étude a mis en évidence la capacité de la majorité des souches de *S. ruminantium* à produire du biofilm en absence de fibrinogène contrairement à *S. suis* sérotype 2. Autrement dit, le phénotype d'auto-agrégation observé pourrait contribuer à la formation de biofilm. Cependant, la souche 1384855 bien que pouvant aussi s'auto-agréguer, n'est pas en mesure de produire du biofilm en absence de fibrinogène. Ceci a également été décrit chez *Bordetella holmesii*, où l'absence d'une protéine BipA résultait en l'incapacité pour la bactérie de former du biofilm malgré sa forte auto-agrégation [210]. Ainsi, l'auto-agrégation ne promeut pas toujours la formation de biofilm [209]. Chez *S. suis*, la présence de fibrinogène a été décrit comme associée à la capacité de la bactérie de former des biofilms [211]. Ceci a d'ailleurs été confirmé dans cette étude (figure 5 de l'article scientifique). Similairement, l'ajout de fibrinogène a induit une production accrue de biofilm par certaines souches de *S. ruminantium* indépendamment de l'origine porcine ou bovine de la glycoprotéine. Néanmoins, une production similaire a été observée chez les autres souches de *S. ruminantium* suggérant que la capacité de former des biofilms est un phénomène complexe et dépendant de la souche bactérienne. De plus, l'absence d'expression de la CPS participerait également au mécanisme de production de biofilm chez *S. suis* en facilitant l'attachement des bactéries aux surfaces suite à l'exposition des composés hydrophobes de leur paroi cellulaire [203]. En effet, Tanabe *et al.* ont démontré qu'un mutant déficient en CPS de *S. suis* a acquis la capacité de former du biofilm [212]. Ainsi, l'absence de CPS et le phénotype d'auto-agrégation joueraient tous deux un rôle dans la formation de biofilm par *S. ruminantium*.

3. Premières étapes de la pathogénèse de l'infection causée par *S. ruminantium*

3.1. Colonisation : Meilleure adhérence et invasion des cellules épithéliales et endothéliales par *S. ruminantium* comparativement à *S. suis* sérotype 2

Les interactions entre un pathogène bactérien et son hôte potentiel sont initiées par l'étape de colonisation. Chez *S. suis*, cette première étape serait médiée par diverses protéines dont plus de 30 ont été énumérées à ce jour selon les différents types cellulaires étudiés (humains et porcins) [32]. *S. suis* serait également capable d'envahir et de traverser la barrière épithéliale soit par le biais de la toxine SLY cytolytique, soit par un autre mécanisme encore nébuleux tels que l'endocytose [76]. Cette étape reste encore controversée dans la littérature [69]. Basé sur la proximité phylogénétique entre *S. suis* et *S. ruminantium* ainsi que sur la similarité des signes cliniques occasionnés par ces deux pathogènes, l'adhésion et l'invasion sont également supposées comme premières étapes dans la pathogénèse de cette nouvelle bactérie et ont donc été évaluées dans cette étude. Dans cette étude (figures 6 et 7 de l'article scientifique), l'adhésion aux cellules épithéliales et endothéliales bovines et porcines à 2h et 4h d'incubation, était significativement plus importante pour les souches de *S. ruminantium* comparativement à celle de *S. suis* sérotype 2. Ces résultats seraient une conséquence des caractéristiques phénotypiques de *S. ruminantium* décrites précédemment. En effet, il a été démontré chez *S. suis* sérotype 2 à l'aide d'une souche mutante, que l'absence de capsule augmenterait la capacité d'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales comparativement à la souche sauvage encapsulée [203, 205, 213]. Ce phénomène serait lié de nouveau à l'exposition de la surface cellulaire hydrophobe et des possibles adhésines facilitant l'attachement des bactéries [203-205, 212]. L'auto-agrégation a également été décrite dans la littérature comme un phénotype impliqué dans la colonisation des cellules de l'hôte [214]. Néanmoins, l'augmentation de la quantité de bactéries adhérees aux cellules pourrait être secondaire à la liaison des bactéries les unes aux autres plutôt qu'à l'augmentation du nombre de bactéries directement attachées aux cellules de l'hôte. Ainsi, on ne peut exclure hors de tout doute que la meilleure capacité d'adhérence observée pour *S. ruminantium* soit en fait attribuée à la formation d'auto-agrégats.

Pareillement à l'adhésion, l'invasion des cellules épithéliales et endothéliales porcines et bovines à 2h et 4h d'incubation était significativement plus élevée pour les souches de *S. ruminantium* contrairement à *S. suis* sérotype 2 (voir figures 6 et 7 de l'article scientifique). Ces résultats s'alignent avec ceux de la littérature dans lesquels un mutant non encapsulé de *S. suis* sérotype 2 exprime une meilleure invasion des cellules épithéliales que la souche parentale encapsulée [204, 205]. Ainsi, l'absence de capsule serait bénéfique pour la pathogénèse de l'infection causée par *S. ruminantium* en facilitant la colonisation de son hôte. Des études additionnelles sont nécessaires pour identifier les mécanismes par lesquelles cette bactérie envahit les cellules.

3.2. Survie dans le sang : Meilleure survie à l'effet bactéricide du sang entier et à la phagocytose de *S. ruminantium* comparativement à *S. suis* sérotype 2 malgré quelques exceptions

Une fois la barrière épithéliale traversée, *S. suis* se rend dans la circulation sanguine afin de se disséminer vers plusieurs organes et entraîner une septicémie [2]. Cette étape nécessite la survie de la bactérie face à plusieurs mécanismes de défense de l'hôte tels que l'effet bactéricide du sang médié par diverses substances antimicrobiennes et la phagocytose par les cellules immunitaires innées. Tout comme *S. suis*, *S. ruminantium* est responsable de plusieurs pathologies dont l'étape de dissémination par le sang est requise pour leur développement. On a donc décidé d'évaluer la résistance de *S. ruminantium* au « killing » du sang entier bovin et à la phagocytose par les macrophages bovins dérivés de monocytes (figures 8 et 9 respectivement de l'article scientifique). Étonnamment, les souches de *S. ruminantium* étaient tout aussi résistantes au « killing » du sang que la souche de *S. suis* sérotype 2. De plus, plusieurs souches étaient également capables de résister à la phagocytose par les macrophages à la fois après 30 minutes et 1 heure d'infection. Ceci est contraire aux résultats décrits dans la littérature pour lesquels l'absence de la CPS chez n'importe quelle souche mutante de *S. suis* est corrélée avec une augmentation du killing et de la phagocytose menant à l'élimination des bactéries de la circulation sanguine [69]. Ce consensus a été observé pour la souche mutante non encapsulée de *S. suis* sérotype 2 utilisée comme contrôle, mais pas pour la majorité des souches de *S.*

ruminantium malgré leur absence de CPS. D'ailleurs, la souche 1384855 était même en mesure de se multiplier dans cet environnement hostile. Ces résultats suggèrent que d'autres mécanismes sont impliqués dans la survie de *S. ruminantium* à l'effet bactéricide du sang et de la phagocytose par les cellules immunitaires innées afin de compenser l'absence de CPS. L'auto-agrégation a été décrite comme mécanisme pouvant augmenter la résistance des bactéries à la phagocytose. En effet, la formation d'agrégats offrirait supposément une certaine protection mécanique du fait de leur taille comme c'est le cas pour certains parasites [215]. De plus, bien que mal définie encore, la formation de biofilm pourrait contribuer à la survie de la bactérie en procurant une certaine protection contre l'opsonophagocytose [216]. Cependant, les souches 1088054 et *S. suis* sérotype 33 appartenant à *S. ruminantium*, étaient aussi sensibles que le mutant non encapsulé $\Delta cps2F$ de *S. suis* sérotype 2 face à la phagocytose. Autrement dit, la résistance à la phagocytose par *S. ruminantium* serait un processus multifactoriel et dépendant des souches.

V/Conclusions et perspectives

Conclusions générales

Les travaux présentés dans ce mémoire sont les premiers à se concentrer sur les caractéristiques génotypiques et phénotypiques, et la pathogénèse de l'infection causée par *S. ruminantium*. Notamment cette étude a démontré que :

- ✓ L'arrivée de nouveaux outils de diagnostic ont permis de clarifier et d'affiner la classification de *S. suis*. Ceci a permis de mettre en évidence plusieurs erreurs involontaires commises dans le passé d'identification de souches de *S. suis* isolées de ruminants malades. Il est donc primordial d'utiliser les nouvelles analyses moléculaires de PCR disponibles afin de diagnostiquer adéquatement *S. ruminantium*
- ✓ *S. ruminantium* présente des caractéristiques génotypiques et phénotypiques différentes de *S. suis* sérotype 2 :
 - Aucune souche de *S. ruminantium* analysées dans cette étude ne possèdent les gènes codant pour les marqueurs de virulence MRP, EPF et SLY
 - Toutes les souches de *S. ruminantium* sont dépourvues de CPS entraînant une augmentation du pourcentage d'hydrophobicité de la surface cellulaire
 - Toutes les souches de *S. ruminantium* analysées dans cette étude sont capables de faire de l'auto-agrégation menant à la formation de microcolonies
 - Les souches de *S. ruminantium* analysées dans cette étude sont capables de produire du biofilm :
 - En absence de fibrinogène à l'exception de la souche 1384855
 - En présence de fibrinogène porcin et bovin dont la présence entraine même une augmentation de la quantité de biofilm produite par certaines souches
- ✓ Les mécanismes impliqués dans la pathogénèse de l'infection causée par *S. ruminantium* diffèrent de ceux utilisés par *S. suis* sérotype 2. Notamment, nous avons constaté :
 - Une meilleure capacité d'adhésion et d'invasion de toutes les souches de *S. ruminantium* aux cellules épithéliales et endothéliales bovines et porcines (MDBK, NPTr, CPAE, AOC) causée par le phénotype d'auto-agrégation et l'absence de CPS

permettant d'exposer les adhésines et autres structures hydrophobes exprimées à la surface cellulaire.

- Une meilleure survie à l'effet bactéricide du sang et à la phagocytose par les cellules macrophages bovins dérivés des monocytes pour la majorité des souches de *S. ruminantium*, causée par le phénotype d'auto-agrégation et la capacité de formation de biofilm.

Perspectives

Ce projet de maîtrise est une première étape pour combler les lacunes dans les connaissances sur *S. ruminantium*. Plusieurs études additionnelles sont nécessaires afin de mieux comprendre son épidémiologie, sa pathogénicité et sa virulence. Pour ce faire, quelques pistes d'investigation ont été listées ci-dessous :

1. Approfondir nos connaissances actuelles sur les phénotypes de *S. ruminantium* en :
 - Identifiant les auto-agglutinines exprimées à la surface des bactéries et potentiellement impliquées dans le mécanisme d'auto-agrégation observé
 - Précisant la capacité de production de biofilm par l'appareil micro fluidique et par visualisation par microscopie électronique à transmission ou confocale
 - Réalisant une analyse génotypique ciblée par PCR des gènes *cps* impliqués dans la biosynthèse de la capsule polysaccharidique afin d'évaluer si le phénotype de non-encapsulation provient de l'absence des gènes ou du manque de leur expression
2. Étendre nos connaissances actuelles sur la pathogénèse de *S. ruminantium* en :
 1. *In vitro*
 - Étudiant la capacité d'adhésion de *S. ruminantium* aux plaquettes des ruminants dans un contexte de développement d'endocardites
 - Comparant la résistance aux antibiotiques des souches de *S. ruminantium* entre la forme planctonique et biofilm
 - Analysant l'expression des cytokines pro-inflammatoires par RT-qPCR et par ELISA afin de décrire la réponse inflammatoire induite par *S. ruminantium*
 - Évaluant la survie intracellulaire de *S. ruminantium* une fois phagocyté par les cellules immunitaires de l'hôte
 - Évaluant la cytotoxicité potentielle de *S. ruminantium* envers les cellules de l'hôte
 2. *In vivo*
 - Évaluant à l'aide d'un modèle murin le potentiel de virulence de *S. ruminantium*

- Utilisant un modèle d'étude *ex vivo* avec des valves cardiaques bovines afin de mettre en évidence leur colonisation par *S. ruminantium* comme première étape requise au développement d'endocardites

Bibliographie

1. Staats, J.J., et al., *Streptococcus suis: past and present*. Vet Res Commun, 1997. **21**(6): p. 381-407.
2. Gottschalk, M., et al., *Streptococcus suis: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen?* Future Microbiol, 2010. **5**(3): p. 371-91.
3. Arends, J.P. and H.C. Zanen, *Meningitis caused by Streptococcus suis in humans*. Rev Infect Dis, 1988. **10**(1): p. 131-7.
4. Lun, Z.R., et al., *Streptococcus suis: an emerging zoonotic pathogen*. Lancet Infect Dis, 2007. **7**(3): p. 201-9.
5. Yu, H., et al., *Human Streptococcus suis outbreak, Sichuan, China*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(6): p. 914-20.
6. Hui, A.C., et al., *Bacterial meningitis in Hong Kong: 10-years' experience*. Clin Neurol Neurosurg, 2005. **107**(5): p. 366-70.
7. Mai, N.T., et al., *Streptococcus suis meningitis in adults in Vietnam*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(5): p. 659-67.
8. Suankratay, C., et al., *Streptococcus suis meningitis in Thailand*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2004. **35**(4): p. 868-76.
9. Gottschalk, M. and M. Segura. Streptococcosis. In: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson GW, eds. Diseases of Swine. 11th ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2019:934–950.
10. Muckle, A., et al. *Isolation of Streptococcus suis from 2 lambs with a history of lameness*. Can Vet J, 2014. **55**(10): p. 946-949.
11. Muckle, A., et al., *Isolation of Streptococcus suis from the urine of a clinically ill dog*. Can Vet J, 2010. **51**(7): p. 773–774.
12. Okwumabua, O., et al., *Isolation and partial characterization of Streptococcus suis from clinical cases in cattle*. J Vet Diagn Invest, 2017. **29**(2): p. 160–168.
13. Hill, J.E., et al., *Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that Streptococcus suis serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are Streptococcus orisratti*. Vet Microbiol, 2005. **107**(1-2): p. 63-9.
14. Nomoto, R., et al., *Reappraisal of the taxonomy of Streptococcus suis serotypes 20, 22 and 26: Streptococcus parasuis sp. nov.* Int J Syst Evol Microbiol, 2015. **65**(Pt 2): p. 438-43
15. Tohya, M., et al., *Defining the taxonomic status of Streptococcus suis serotype 33: the proposal for Streptococcus ruminantium sp. nov.* Int J Syst Evol Microbiol, 2017. **67**(9): p. 3660-3665.
16. Tohya, M., et al., *Complete Genome Sequence of Streptococcus ruminantium sp. nov. GUT-187T (=DSM 104980T =JCM 31869T), the Type Strain of S. ruminantium, and Comparison with Genome Sequences of Streptococcus suis Strains*. Genome Biol Evol, 2018. **10**(4): p.1180-1184.
17. Neila-Ibáñez, C., et al., *First Report of Streptococcus ruminantium in Wildlife: Phenotypic Differences with a Spanish Domestic Ruminant Isolate*. Microbiol Res, 2022. **13**(1): p. 102-113.
18. Okura, M., et al. *Genotypic diversity of Streptococcus suis and the S. suis-like bacterium Streptococcus ruminantium in ruminants*. Vet Res, 2019. **50**(1): p. 94.
19. Goyette-Desjardins, G., et al., *Streptococcus suis, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing*. Emerg Microbes Infect, 2014. **3**(6): p. e45.
20. Hommez, J., et al., *Identification and characterization of Streptococcus suis*. Vet Microbiol, 1986. **11**(4): p. 349-55.
21. Devriese, L.A., et al., *Characteristics of different Streptococcus suis ecovars and description of a simplified identification method*. Vet Microbiol, 1991. **26**(1-2): p. 141-50.

22. Higgins, R. and M. Gottschalk, *An update on Streptococcus suis identification*. J Vet Diagn Invest, 1990. **2**(3): p. 249-52.
23. Baele, M., et al., *The gram-positive tonsillar and nasal flora of piglets before and after weaning*. J Appl Microbiol, 2001. **91**(6): p. 997-1003.
24. Wertheim, H.F., et al., *Streptococcus suis: an emerging human pathogen*. Clin Infect Dis, 2009. **48**(5): p. 617-25.
25. Jansen, E.J., *Meningoencephalitis bij varkens door streptococcen*. Tijdschr Diergeneesk., 1951. **76**: p. 815-832.
26. Demoor, C.E., *Septicaemic infections in pigs, caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designated R, S, and T*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1963. **29**: p. 272-80.
27. Elliott, S.D., *Streptococcal infection in young pigs. I. An immunochemical study of the causative agent (PM streptococcus)*. J Hyg (Lond), 1966. **64**(2): p. 205-12.
28. Kilpper-Bälz, R. and K.H. Schleifer, *Streptococcus suis sp. nov., nom. rev.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1987. **37**(2): p. 160-162.
29. Chatellier, S., et al., *Phylogenetic diversity of Streptococcus suis strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison*. Int J Syst Bacteriol, 1998. **48**(Pt 2): p. 581–589.
30. Tien le, H.T., et al., *Reappraisal of the taxonomy of Streptococcus suis serotypes 20, 22, 26, and 33 based on DNA-DNA homology and sodA and recN phylogenies*. Vet Microbiol, 2013. **162**(2-4): p. 842-9.
31. Higgins, R., et al., *Description of six new capsular types (29-34) of Streptococcus suis*. J Vet Diagn Invest, 1995. **7**(3): p. 405-6.
32. Segura, M., et al., *Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by Streptococcus suis: fighting against nonspecific defenses*. FEBS Lett, 2016. **590**(21): p. 3772-3799.
33. Vecht, U., et al., *Differences in virulence between two strains of Streptococcus suis type II after experimentally induced infection of newborn germ-free pigs*. Am J Vet Res, 1989. **50**(7): p. 1037-43.
34. Brehony, C., K.A. Jolley, and M.C. Maiden, *Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease*. FEMS Microbiol Rev, 2007. **31**(1): p. 15-26.
35. King, S.J., et al., *Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen Streptococcus suis: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(10): p. 3671-80.
36. Obert, C.A., et al., *Assessment of molecular typing methods to determine invasiveness and to differentiate clones of Streptococcus pneumoniae*. Infect Genet Evol, 2007. **7**(6): p. 708-16.
37. Athey, T.B., et al., *Population Structure and Antimicrobial Resistance Profiles of Streptococcus suis Serotype 2 Sequence Type 25 Strains*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0150908.
38. Athey, T.B., et al., *Complex Population Structure and Virulence Differences among Serotype 2 Streptococcus suis Strains Belonging to Sequence Type 28*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0137760.
39. Baig, A., et al., *Whole genome investigation of a divergent clade of the pathogen Streptococcus suis*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 1191.
40. Fittipaldi, N., et al., *Lineage and virulence of Streptococcus suis serotype 2 isolates from North America*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(12): p. 2239-44.
41. Zheng, H., et al., *Eight Novel Capsular Polysaccharide Synthesis Gene Loci Identified in Nontypeable Streptococcus suis Isolates*. Appl Environ Microbiol, 2015. **81**(12): p. 4111-9.
42. Wei, Z., et al., *Characterization of Streptococcus suis isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007*. Vet Microbiol, 2009. **137**(1-2): p. 196-201.
43. Gottschalk, M., et al., *Characterization of Streptococcus suis isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Québec, Canada*. Vet Microbiol, 2013. **162**(2-4): p. 819–825.

44. Higgins, R., and M. Gottschalk, *Distribution of Streptococcus suis capsular types in 2000*. Can Vet J, 2001. **42**(3): p. 223.
45. Messier, S., et al., *Distribution of Streptococcus suis capsular types from 2001 to 2007*. Can Vet J, 2008. **49**(5): p. 461–462.
46. Qiu, X., et al., *Novel Capsular Polysaccharide Loci and New Diagnostic Tools for High-Throughput Capsular Gene Typing in Streptococcus suis*. Appl Environ Microbiol, 2016. **82**(24): p. 7102–7112.
47. Zheng, H., et al., *Genotyping and investigating capsular polysaccharide synthesis gene loci of non-serotypeable Streptococcus suis isolated from diseased pigs in Canada*. Vet Res, 2017. **48**(1): p. 10.
48. Huang, J., et al., *Identification of six novel capsular polysaccharide loci (NCL) from Streptococcus suis multidrug resistant non-typeable strains and the pathogenic characteristic of strains carrying new NCLs*. Transbound Emerg Dis, 2019. **66**(2): p. 995–1003.
49. Pan, Z., et al., *Novel variant serotype of Streptococcus suis isolated from piglets with meningitis*. Appl Environ Microbiol, 2015. **81**(3): p. 976–985.
50. Lakkitjaroen, N., et al., *Loss of capsule among Streptococcus suis isolates from porcine endocarditis and its biological significance*. J Med Microbiol, 2011. **60**(Pt 11): p. 1669–1676.
51. Lakkitjaroen, N., et al., *Capsule loss or death: The position of mutations among capsule genes sways the destiny of Streptococcus suis*. FEMS Microbiol Lett, 2014. **354**(1): p. 46–54.
52. Dee, S.A., et al., *Effect of management practices on the Streptococcus suis carrier rate in nursery swine*. J Am Vet Med Assoc, 1993. **203**(2): p. 295-9.
53. Thanawongnuwech, R., et al., *Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to Streptococcus suis infection*. Vet Pathol, 2000. **37**(2): p. 143-52.
54. Ferrando, M.L., et al., *Host-pathogen Interaction at the Intestinal Mucosa Correlates With Zoonotic Potential of Streptococcus suis*. J Infect Dis, 2015. **212**(1): p. 95-105.
55. Warneboldt, F., et al., *Clearance of Streptococcus suis in Stomach Contents of Differently Fed Growing Pigs*. Pathogens, 2016. **5**(3).
56. Gruening, P., et al., *Structure, regulation, and putative function of the arginine deiminase system of Streptococcus suis*. J Bacteriol, 2006. **188**(2): p. 361-9.
57. Gottschalk, M. and M. Segura, *The pathogenesis of the meningitis caused by Streptococcus suis: the unresolved questions*. Vet Microbiol, 2000. **76**(3): p. 259-72.
58. Madsen, L.W., et al., *Experimental infection of conventional pigs with Streptococcus suis serotype 2 by aerosolic exposure*. Acta Vet Scand, 2001. **42**(2): p. 303-6.
59. Berthelot-Herault, F., et al., *Experimental airborne transmission of Streptococcus suis capsular type 2 in pigs*. Vet Microbiol, 2001. **82**(1): p. 69-80.
60. Varela, N.P., et al., *Antimicrobial resistance and prudent drug use for Streptococcus suis*. Anim Health Res Rev, 2013. **14**(1): p. 68-77.
61. Li, L.L., et al., *Antimicrobial resistance, serotypes, and virulence factors of Streptococcus suis isolates from diseased pigs*. Foodborne Pathog Dis, 2012. **9**(7): p. 583-8.
62. Segura, M., *Streptococcus suis vaccines: candidate antigens and progress*. Expert Rev Vaccines, 2015. **14**(12): p. 1587-608.
63. Goyette-Desjardins, G., et al., *Protection against Streptococcus suis Serotype 2 Infection Using a Capsular Polysaccharide Glycoconjugate Vaccine*. Infect Immun, 2016. **84**(7): p. 2059-2075.
64. Huang, Y.T., et al., *Streptococcus suis infection*. J Microbiol Immunol Infect, 2005. **38**(5): p. 306-13.
65. Willenburg, K.S., D.E. Sentochnik, and R.N. Zadoks, *Human Streptococcus suis Meningitis in the United States*. New England Journal of Medicine, 2006. **354**(12): p. 1325-1325.

66. Kerdsin, A., et al., *Clonal dissemination of human isolates of Streptococcus suis serotype 14 in Thailand*. J Med Microbiol, 2009. **58**(Pt 11): p. 1508-13.
67. Wilson, S.M., et al., *Interactions between Streptococcus suis serotype 2 and cells of the myeloid lineage in the palatine tonsil of the pig*. Vet Immunol Immunopathol, 2007. **117**(1-2): p. 116-23.
68. Salles, M.W., et al., *Changes in the leucocyte subpopulations of the palatine tonsillar crypt epithelium of pigs in response to Streptococcus suis type 2 infection*. Vet Immunol Immunopathol, 2002. **87**(1-2): p. 51-63.
69. Fittipaldi, N., et al., *Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent Streptococcus suis*. Future Microbiol, 2012. **7**(2): p. 259-79.
70. Musyoki, A.M., et al., *Structural and functional analysis of an anchorless fibronectin-binding protein FBPS from Gram-positive bacterium Streptococcus suis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(48): p. 13869-13874.
71. Li, W., et al., *A novel fibronectin-binding protein of Streptococcus suis serotype 2 contributes to epithelial cell invasion and in vivo dissemination*. Vet Microbiol, 2013. **162**(1): p. 186-94.
72. Zhang, H., et al., *Identification of a novel collagen type capital I, Ukrainian-binding protein from Streptococcus suis serotype 2*. Vet J, 2013. **197**(2): p. 406-14.
73. Lalonde, M., et al., *Interactions between Streptococcus suis serotype 2 and different epithelial cell lines*. Microbiology, 2000. **146**(Pt 8): p. 1913-21.
74. Gottschalk, M., et al., *Adherence of Streptococcus suis capsular type 2 to porcine lung sections*. Can J Vet Res, 1991. **55**(3): p. 302-4.
75. Wu, T., et al., *The orphan response regulator RevSC21 controls the attachment of Streptococcus suis serotype-2 to human laryngeal epithelial cells and the expression of virulence genes*. FEMS Microbiol Lett, 2009. **292**(2): p. 170-81.
76. Benga, L., et al., *Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of Streptococcus suis in epithelial cells*. Cell Microbiol, 2004. **6**(9): p. 867-81.
77. Chabot-Roy, G., et al., *Phagocytosis and killing of Streptococcus suis by porcine neutrophils*. Microb Pathog, 2006. **41**(1): p. 21-32.
78. Benga, L., et al., *Polysaccharide capsule and suilysin contribute to extracellular survival of Streptococcus suis co-cultivated with primary porcine phagocytes*. Vet Microbiol, 2008. **132**(1-2): p. 211-9.
79. Lecours, M.P., et al., *Characterization of porcine dendritic cell response to Streptococcus suis*. Vet Res, 2011. **42**: p. 72.
80. Lecours, M.P., et al., *Critical role for Streptococcus suis cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells*. J Infect Dis, 2011. **204**(6): p. 919-29.
81. Houde, M., et al., *Streptococcus suis capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition*. Infect Immun, 2012. **80**(2): p. 506-17.
82. Lecours, M.P., et al., *Sialylation of Streptococcus suis serotype 2 is essential for capsule expression but is not responsible for the main capsular epitope*. Microbes Infect, 2012. **14**(11): p. 941-50.
83. Segura, M., M. Gottschalk, and M. Olivier, *Encapsulated Streptococcus suis inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis*. Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 5322-30.
84. Faulkner, L., et al., *The mechanism of superantigen-mediated toxic shock: not a simple Th1 cytokine storm*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6870-7.
85. Paterson, R.L. and N.R. Webster, *Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome*. J R Coll Surg Edinb, 2000. **45**(3): p. 178-82.

86. De Nardo, D., *Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation*. Cytokine, 2015. **74**(2): p. 181-9.
87. Sun, Y., et al., *Enolase of Streptococcus Suis Serotype 2 Enhances Blood-Brain Barrier Permeability by Inducing IL-8 Release*. Inflammation, 2016. **39**(2): p. 718-26.
88. Vadeboncoeur, N., et al., *Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by Streptococcus suis serotype 2*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003. **35**(1): p. 49-58.
89. Charland, N., et al., *Streptococcus suis serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells*. Infect Immun, 2000. **68**(2): p. 637-43.
90. Dominguez-Punaro, M.C., et al., *Streptococcus suis serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection*. J Immunol, 2007. **179**(3): p. 1842-54.
91. Engelhardt, B. and L. Sorokin, *The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(4): p. 497-511.
92. Tenenbaum, T., et al., *Strain-dependent disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier by Streptococcus suis in vitro*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2005. **44**(1): p. 25-34.
93. Tenenbaum, T., et al., *Polar bacterial invasion and translocation of Streptococcus suis across the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro*. Cell Microbiol, 2009. **11**(2): p. 323-36.
94. Schwerk, C., et al., *In vitro transcriptome analysis of porcine choroid plexus epithelial cells in response to Streptococcus suis: release of pro-inflammatory cytokines and chemokines*. Microbes Infect, 2011. **13**(11): p. 953-62.
95. Wewer, C., et al., *Transcellular migration of neutrophil granulocytes through the blood-cerebrospinal fluid barrier after infection with Streptococcus suis*. J Neuroinflammation, 2011. **8**: p. 51.
96. Rivest, S., *Molecular insights on the cerebral innate immune system*. Brain Behav Immun, 2003. **17**(1): p. 13-9.
97. Smith, H.E., et al., *Identification and characterization of the cps locus of Streptococcus suis serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor*. Infect Immun, 1999. **67**(4): p. 1750-6.
98. Charland, N., et al., *Streptococcus suis serotype 2 mutants deficient in capsular expression*. Microbiology, 1998. **144**(Pt 2): p. 325-32.
99. Tanabe, S., et al., *Pleiotropic effects of polysaccharide capsule loss on selected biological properties of Streptococcus suis*. Can J Vet Res, 2010. **74**(1): p. 65-70.
100. Segura, M. and M. Gottschalk, *Streptococcus suis interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity*. Infect Immun, 2002. **70**(8): p. 4312-22.
101. Baums, C.G. and P. Valentin-Weigand, *Surface-associated and secreted factors of Streptococcus suis in epidemiology, pathogenesis and vaccine development*. Anim Health Res Rev, 2009. **10**(1): p. 65-83.
102. Graveline, R., et al., *TLR2-dependent recognition of Streptococcus suis is modulated by the presence of capsular polysaccharide which modifies macrophage responsiveness*. Int Immunol, 2007. **19**(4): p. 375-89.
103. Segura, M., J. Stankova, and M. Gottschalk, *Heat-killed Streptococcus suis capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages*. Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4646-54.
104. Quessy, S., et al., *Increase of capsular material thickness following in vivo growth of virulent Streptococcus suis serotype 2 strains*. FEMS Microbiol Lett, 1994. **115**(1): p. 19-26.
105. Palmer, M., *The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins*. Toxicon, 2001. **39**(11): p. 1681-9.

106. Billington, S.J., B.H. Jost, and J.G. Songer, *Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis*. FEMS Microbiol Lett, 2000. **182**(2): p. 197-205.
107. Gottschalk, M.G., S. Lacouture, and J.D. Dubreuil, *Characterization of Streptococcus suis capsular type 2 haemolysin*. Microbiology, 1995. **141**(Pt 1): p. 189-95.
108. Norton, P.M., et al., *Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of Streptococcus suis is enhanced by the presence of suilysin*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1999. **26**(1): p. 25-35.
109. Segura, M., et al., *Proinflammatory cytokine and chemokine modulation by Streptococcus suis in a whole-blood culture system*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006. **47**(1): p. 92-106.
110. Vanier, G., et al., *Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by Streptococcus suis serotype 2*. Infect Immun, 2004. **72**(3): p. 1441-9.
111. Vanier, G., et al., *Porcine brain microvascular endothelial cell-derived interleukin-8 is first induced and then degraded by Streptococcus suis*. Microb Pathog, 2009. **46**(3): p. 135-43.
112. Lun, S., et al., *Role of suilysin in pathogenesis of Streptococcus suis capsular serotype 2*. Microb Pathog, 2003. **34**(1): p. 27-37.
113. Vollmer, W., D. Blanot, and M.A. de Pedro, *Peptidoglycan structure and architecture*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(2): p. 149-67.
114. Allen, A.G., et al., *Generation and characterization of a defined mutant of Streptococcus suis lacking suilysin*. Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2732-5.
115. Neuhaus, F.C. and J. Baddiley, *A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(4): p. 686-723.
116. Schneewind, O. and D. Missiakas, *Lipoteichoic acids, phosphate-containing polymers in the envelope of gram-positive bacteria*. J Bacteriol, 2014. **196**(6): p. 1133-42.
117. Fittipaldi, N., et al., *D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of Streptococcus suis*. Infect Immun, 2008. **76**(8): p. 3587-94.
118. Fan, H.-j., *Advances in pathogenesis of Streptococcus suis serotype 2*. Journal of Integrative Agriculture, 2017. **16**(12): p. 2834-2847.
119. Kengatharan, K.M., et al., *Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 305-315.
120. Mattsson, E., et al., *Peptidoglycan and teichoic acid from Staphylococcus epidermidis stimulate human monocytes to release tumour necrosis factor- α , interleukin-1/3 and interleukin-6*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1993. **7**(3): p. 281-287.
121. Gisch, N., et al., *Structural analysis and immunostimulatory potency of lipoteichoic acids isolated from three Streptococcus suis serotype 2 strains*. J Biol Chem, 2018.
122. Hashimoto, M., et al., *Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in Staphylococcus aureus*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3162-9.
123. Melnyk, J.E., et al., *Peptidoglycan Modifications Tune the Stability and Function of the Innate Immune Receptor Nod2*. J Am Chem Soc, 2015. **137**(22): p. 6987-90.
124. Sukhithasri, V., et al., *Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions*. Microbiol Res, 2013. **168**(7): p. 396-406.
125. Fittipaldi, N., et al., *Significant contribution of the pgdA gene to the virulence of Streptococcus suis*. Mol Microbiol, 2008. **70**(5): p. 1120-35.
126. Gottschalk, M., R. Higgins, and S. Quessy, *Dilemma of the virulence of Strptococcus suis strains*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(12): p. 4202-3.
127. Segura, M., et al., *Critical Streptococcus suis Virulence Factors: Are They All Really Critical?* Trends Microbiol, 2017. **25**(7): p. 585-599.

128. Auger, J.P., et al., *The bias of experimental design, including strain background, in the determination of critical Streptococcus suis serotype 2 virulence factors*. PLoS One, 2017. **12**(7): p. e0181920.
129. Chuzeville, S., et al., *Serotype-specific role of antigen I/II in the initial steps of the pathogenesis of the infection caused by Streptococcus suis*. Vet Res, 2017. **48**(1): p. 39.
130. Italiani, P. and D. Boraschi, *New Insights Into Tissue Macrophages: From Their Origin to the Development of Memory*. Immune Netw, 2015. **15**(4): p. 167-76.
131. Mogensen, T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(2): p. 240-73, Table of Contents.
132. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
133. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 637-50.
134. Tang, D., et al., *PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity*. Immunol Rev, 2012. **249**(1): p. 158-75.
135. Jakubzick, C.V., G.J. Randolph, and P.M. Henson, *Monocyte differentiation and antigen-presenting functions*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(6): p. 349-362.
136. Yona, S. and S. Jung, *Monocytes: subsets, origins, fates and functions*. Curr Opin Hematol, 2010. **17**(1): p. 53-9.
137. Boyette, L.B., et al., *Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets*. PLoS One, 2017. **12**(4): p. e0176460.
138. Jakubzick, C., et al., *Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes*. Immunity, 2013. **39**(3): p. 599-610.
139. Auffray, 50C., et al., *Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior*. Science, 2007. **317**(5838): p. 666-70.
140. Karlmark, K.R., F. Tacke, and I.R. Dunay, *Monocytes in health and disease - Minireview*. Eur J Microbiol Immunol (Bp), 2012. **2**(2): p. 97-102.
141. Yona, S., et al., *Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis*. Immunity, 2013. **38**(1): p. 79-91.
142. Epelman, S., K.J. Lavine, and G.J. Randolph, *Origin and functions of tissue macrophages*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 21-35.
143. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 723-37.
144. Stout, R.D. and J. Suttles, *Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(3): p. 509-13.
145. Haldar, M. and K.M. Murphy, *Origin, development, and homeostasis of tissue-resident macrophages*. Immunol Rev, 2014. **262**(1): p. 25-35.
146. Steinman, R.M., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 271-96.
147. Lipscomb, M.F. and B.J. Masten, *Dendritic cells: immune regulators in health and disease*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 97-130.
148. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
149. Savina, A. and S. Amigorena, *Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells*. Immunol Rev, 2007. **219**: p. 143-56.
150. Satpathy, A.T., et al., *Re(de)fining the dendritic cell lineage*. Nat Immunol, 2012. **13**(12): p. 1145-54.

151. Amulic, B., et al., *Neutrophil function: from mechanisms to disease*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 459-89.
152. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
153. Shah, B., N. Burg, and M.H. Pillinger, *Chapter 11 - Neutrophils*, in *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology (Tenth Edition)*, G.S. Firestein, et al., Editors. 2017, Elsevier. p. 169-188.e3.
154. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
155. Gordon, S. and A. Pluddemann, *Tissue macrophages: heterogeneity and functions*. BMC Biol, 2017. **15**(1): p. 53.
156. Brazeau, C., et al., *In vitro phagocytosis and survival of Streptococcus suis capsular type 2 inside murine macrophages*. Microbiology, 1996. **142**(Pt 5): p. 1231-7.
157. Williams, A.E., *Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of Streptococcus suis type 2 isolates*. Microb Pathog, 1990. **8**(3): p. 189-96.
158. Segura, M.A., P. Cleroux, and M. Gottschalk, *Streptococcus suis and group B Streptococcus differ in their interactions with murine macrophages*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1998. **21**(3): p. 189-95.
159. de Greeff, A., et al., *Involvement of NF-kappaB and MAP-kinases in the transcriptional response of alveolar macrophages to Streptococcus suis*. Vet Microbiol, 2010. **141**(1-2): p. 59-67.
160. Meijerink, M., et al., *Immunomodulatory effects of Streptococcus suis capsule type on human dendritic cell responses, phagocytosis and intracellular survival*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35849.
161. Lecours, M.P., et al., *Immune receptors involved in Streptococcus suis recognition by dendritic cells*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44746.
162. Letendre, C., et al., *Streptococcus suis Serotype 2 Infection Impairs Interleukin-12 Production and the MHC-II-Restricted Antigen Presentation Capacity of Dendritic Cells*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1199.
163. Lecours, M.P., et al., *Immune-responsiveness of CD4(+) T cells during Streptococcus suis serotype 2 infection*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 38061.
164. Dutkiewicz, J., et al., *Streptococcus suis: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part I - Epidemiology*. Ann Agric Environ Med, 2017. **24**(4): p. 683-695.
165. Cruz Colque, J.I., et al., *Streptococci and enterococci associated with tonsils of cattle*. Lett Appl Microbiol, 1993. **16**(2): p. 72-74.
166. Ishigaki, K., et al., *A case of Streptococcus suis endocarditis, probably bovine-transmitted, complicated by pulmonary embolism and spondylitis*. Kansenshogaku Zasshi, 2009. **83**(5): p. 544-548.
167. Higgins, R., et al., *Quebec. Isolation of Streptococcus suis from cattle*. Can Vet J, 1990. **31**(7): p. 529.
168. Komatsu, T., et al., *Bovine vegetative endocarditis caused by Streptococcus suis*. J Vet Med Sci, 2018. **80**(10): p. 1567-1571.
169. Okwumabua, O., et al., *A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for Streptococcus suis based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **218**(1): p. 79-84.
170. Ishida, S., et al., *Development of an appropriate PCR system for the reclassification of Streptococcus suis*. J Microbiol Methods, 2014. **107**: p. 66-70.
171. Okura, M., et al., *Current taxonomical situation of Streptococcus suis*. Pathogen, 2016. **5**(3): p. 45.

172. Glazunova, O.O., et al., *Partial recN gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus Streptococcus*. Int J Syst Evol Microbiol, 2010. **60**(Pt 9): p. 2140–2148.
173. Tien Le, H.T., et al., *Phenotypic and PCR-based identification of bacterial strains isolated from patients with suspected Streptococcus suis infection in northern Thailand*. Jpn J Infect Dis, 2012. **65**(2): p. 171–174.
174. Dorsch, M. and E. Stackebrandt, *Some modifications in the procedure of direct sequencing of PCR amplified 16S rDNA*. J Microbiol Methods, 1992. **16**(4): p. 271–279.
175. Poyart, C., et al., *Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(1): p. 41–47.
176. Okura, M., et al., *Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of Streptococcus suis*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(5): p. 1714–1719.
177. Huang, J., et al., *Evolution and diversity of the antimicrobial resistance associated mobilome in Streptococcus suis: a probable mobile genetic elements reservoir for other Streptococci*. Front Cell Infect Microbiol, 2016. **6**: p. 118.
178. Huang, J., et al., *Comparative genomic analysis of the ICESa2603 family ICEs and spread of erm(B)- and tet(O)-carrying transferable 89 K-subtype ICEs in swine and bovine isolates in China*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 55.
179. Kabelitz, T., et al., *The Role of Streptococcus spp. in Bovine Mastitis*. Microorganisms, 2021. **9**(7): p. 1497.
180. Cheng, W. N., and S. G., Han, S. G., *Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review*. Asian-Australas J Anim Sci, 2020. **33**(11): p. 1699–1713.
181. Rato, M. G., et al., *Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis*. Vet Microbiol, 2013. **161**(3-4): p. 286–294.
182. Pringle, S. D., et al., *Infective endocarditis caused by Streptococcus agalactiae*. Int J Cardiol, 1989. **24**(2): p. 179–183.
183. Kessel, S. and C. E. Wittenberg, *[Joint infection in a young patient caused by Streptococcus uberis, a pathogen of bovine mastitis--a case report]*. Zeitschrift fur Orthopadie und Unfallchirurgie, 2008. **146**(4): p. 507–509.
184. Chenier, S., et al., *Streptococcus dysgalactiae cellulitis and toxic shock like syndrome in a Brown Swiss cow*. J Vet Diagn Invest, 2008. **20**(1): p. 99–103.
185. Rutherford, S.J., et al., *Sources of Streptococcus dysgalactiae in English and Welsh sheep flocks affected by infectious arthritis (joint ill)*. Vet Rec, 2014. **174**(23): p. 579.
186. Jordal, S., et al., *New tricks from an old cow: infective endocarditis caused by Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(2): p. 731–734.
187. Buczinski, S., et al., *The diagnostic criteria used in bovine bacterial endocarditis: A meta-analysis of 460 published cases from 1973 to 2011*. Vet J, 2012. **193**(2): p. 349-357.
188. Maillard, R., et al., *Endocarditis in cattle caused by Bartonella bovis*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(9): p. 1383–1385.
189. Moreno LZ, Matajira CEC, Gomes VTM, et al., *Molecular and antimicrobial susceptibility profiling of atypical Streptococcus species from porcine clinical specimens*. Infect Genet Evol, 2016. **44**: p. 376-381.
190. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS, *MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis*. Front Microbiol., 2015. **6**: p. 791.
191. Pérez-Sancho M, Vela AI, García-Seco T, Gottschalk M, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF, *Assessment of MALDI-TOF MS as alternative tool for Streptococcus suis identification*. Front Public Health, 2015. **3**: 202.

192. Pérez-Sancho M, Vela AI, García-Seco T, González S, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF, *Usefulness of MALDI-TOF MS as a Diagnostic Tool for the Identification of Streptococcus Species Recovered from Clinical Specimens of Pigs*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0170784.
193. Kilian M, Mikkeksen L, Henrichsen J., *Taxonomic study of viridans streptococci: description of Streptococcus gordonii sp. nov. and emended descriptions of Streptococcus sanguis (White and Niven 1946), Streptococcus oralis (Bridge and Sneath 1982), and Streptococcus mitis (Andrewes and Horder 1906)*. Int J Syst Evol Microbiol, 1989. **39**(4): p. 471–484.
194. Werinder A, Aspán A, Söderlund R, Backhans A, Sjölund M, Guss B, Jacobson M, *Whole-Genome Sequencing Evaluation of MALDI-TOF MS as a Species Identification Tool for Streptococcus suis*. J Clin Microbiol, 2021. **59**(11): p. e0129721.
195. Ishida S, le Tien HT, Osawa R, Tohya M, Nomoto R, Kawamura Y, Takahashi T, Kikuchi N, Kikuchi K, Sekizaki T, *Development of an appropriate PCR system for the reclassification of Streptococcus suis*. J Microbiol Methods, 2014. 107: p. 66–70.
196. Peterson JW, *Bacterial Pathogenesis*. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 7.
197. Guo G, Kong X, Du D, Wei D, Yu Y, Zhang W, *Genome-wide association study identifies the virulence-associated marker in Streptococcus suis serotype 2*. Infect Genet Evol, 2021. **92**: p. 104894.
198. Li Q, Fu Y, Ma C, He Y, Yu Y, Du D, Yao H, Lu C, Zhang W, *The non-conserved region of MRP is involved in the virulence of Streptococcus suis serotype 2*. Virulence, 2017. **8**(7): p. 1274-1289.
199. Vecht U, Wisselink HJ, Jellema ML, Smith HE, *Identification of two proteins associated with virulence of Streptococcus suis type 2*. Infect Immun, 1991. **59**(9): p. 3156-3162.
200. Wang J, Kong D, Zhang S, Jiang H, Zheng Y, Zang Y, Hao H, Jiang Y, *Interaction of fibrinogen and muramidase-released protein promotes the development of Streptococcus suis meningitis*. Front Microbiol, 2015. **6**: p.1001.
201. Pian Y, Wang P, Liu P, Zheng Y, Zhu L, Wang H, Xu B, Yuan Y, Jiang Y, *Proteomics identification of novel fibrinogen-binding proteins of Streptococcus suis contributing to antiphagocytosis*. Fron Cell Infec Microbiol, 2015. **5**: p. 19.
202. Auger JP, Meekhanon N, Okura M, Osaki M, Gottschalk M, Sekizaki T, Takamatsu D, *Streptococcus suis Serotype 2 Capsule In Vivo*. Emerg Infect Dis, 2016. **22**(10): p. 1793-6.
203. Bonifait L, Gottschalk M, Grenier D, *Cell surface characteristics of nontypeable isolates of Streptococcus suis*. FEMS Microbiol Lett, 2010. **311**(2): p. 160-6.
204. Benga L, Goethe R, Rohde M, Valentin-Weigand P, *Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of Streptococcus suis in epithelial cells*. Cell Microbiol, 2004. **6**(9): p. 867-81.
205. Benga L, Fulde M, Neis C, Goethe R, Valentin-Weigand P, *Polysaccharide capsule and suilysin contribute to extracellular survival of Streptococcus suis co-cultivated with primary porcine phagocytes*. Vet Microbiol, 2008. **132**(1-2): p. 211-9.
206. Zhang H, Wang Q, Liu H, Kong B, Chen Q, *In vitro growth performance, antioxidant activity and cell surface physiological characteristics of Pediococcus pentosaceus R1 and Lactobacillus fermentum R6 stressed at different NaCl concentrations*. Food Funct, 2020. **11**: p. 6376–6386.
207. Nwoko EQA, Okeke IN, *Bacteria autoaggregation: how and why bacteria stick together*. Biochem Soc Trans, 2021. **49**(3): p. 1147-1157.
208. Smeesters PR, McMillan DJ, Sriprakash KS, *The streptococcal M protein: a highly versatile molecule*. Trends Microbiol, 2010. **18**(6): p. 275-82.
209. Trunk T, Khalil HS, Leo JC, *Bacterial autoaggregation*. AIMS Microbiol, 2018. **4**(1): p. 140-164.

210. Hiramatsu Y, Saito M, Otsuka N, Suzuki E, Watanabe M, Shibayama K, Kamachi K, *BipA Is Associated with Preventing Autoagglutination and Promoting Biofilm Formation in Bordetella holmesii*. PLoS One, 2016. **11**(7): p. e0159999.
211. Bonifait L, Grignon L, Grenier D, *Fibrinogen induces biofilm formation by Streptococcus suis and enhances its antibiotic resistance*. Appl Environ Microbiol, 2008; **74**(15): p. 4969-4972.
212. Tanabe SI, Bonifait L, Fittipaldi N, Grignon L, Gottschalk M, Grenier D, *Pleiotropic effects of polysaccharide capsule loss on selected biological properties of Streptococcus suis*. Can J Vet Res, 2010. **74**: p. 65–70.
213. Auger JP, Payen S, Roy D, Dumesnil A, Segura M, Gottschalk M, *Interactions of Streptococcus suis serotype 9 with host cells and role of the capsular polysaccharide: Comparison with serotypes 2 and 14*. PLoS One, 2019. **14**(10): p. e0223864.
214. Saldaña Z, Erdem AL, Schüller S, Okeke IN, Lucas M, Sivananthan A, Phillips AD, Kaper JB, Puente JL, Girón JA, *The Escherichia coli common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic E. coli*. J Bacteriol, 2009. **191**(11): p. 3451-61.
215. Galdiero F, Romano Carratelli C, Nuzzo I, Bentivoglio C, Galdiero M, *Phagocytosis of bacterial aggregates by granulocytes*. Eur J Epidemiol, 1988. **4**(4): p. 456-60.
216. Donlan RM, Costerton JW, *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 167-93.

Annexe

Isolation of *Streptococcus ruminantium* (*Streptococcus suis*-like) from diseased ruminants in Canada

Marcelo Gottschalk^{1*}, Sonia Lacouture¹, Gilles Fecteau¹, André Desrochers¹, Anaïs Boa¹, Matthew E. Saab² and Masatochi Okura³

¹ Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 Sicotte St., Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada; Gottschalk, Lacouture, Fecteau, Desrochers, Boa

² Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, Prince Edward Island C1A 4P3; Saab

³ National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Japan; Okura

Publié chez : The Canadian Veterinary Journal, 2020 May; 61(5): 473–475.

Rôle de la candidate dans la conception de l'article

J'ai contribué activement à la réalisation des travaux de laboratoire.

Streptococcus suis is one of the most important swine bacterial pathogens and it has also been isolated from a large variety of animal species, as well as from humans (1). There are several reports on the isolation of *S. suis* from ruminants (1,2). Although 35 serotypes for *S. suis* had originally been described, 6 (serotypes 20, 22, 26, 32, 33, and 34) have been re-classified to other bacterial species. Among these, *S. suis* serotype 33 has been recently classified as a new species, *Streptococcus ruminantium* (3). The reference strain of *S. suis* serotype 33 was originally isolated from a lamb with arthritis (1). Biochemically, *S. suis* and *S. ruminantium* are very similar and they are not easily differentiated by biochemical tests routinely performed in a diagnostic laboratory. Many of these *S. suis*-like strains are also positive for the glutamate dehydrogenase gene using polymerase chain reaction (PCR) (*gdh*-PCR), which was widely used in the past to identify *S. suis* (4). To discriminate between *S. suis* and *S. suis*-like isolates, a PCR targeting the DNA repair protein gene (*recN*-PCR) was developed to identify “true” *S. suis* isolates (4). This PCR does not recognize other *S. suis*-like isolates, such as those belonging to serotypes 20, 22, 26, 32, 33, and 34. In addition, a PCR specific for *S. ruminantium* has recently been described (2).

In this report, we studied 14 clinical isolates from ruminants from 2 farms in Saskatchewan, 1 farm in Prince Edward Island and 4 farms in Québec. Ten of these isolates were recovered from diseased cattle, while 4 of the isolates originated from sheep (Table 1). All isolates were originally identified as *S. suis* using traditional biochemical tests. These isolates were from cases of arthritis (sometimes with septic osteomyelitis lesions), pneumonia, endocarditis, and mastitis or from purulent abscesses. One isolate was recovered from a bulk tank milk sample (Table 1). Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) identified 9 of the isolates as *S. suis*, 4 as *Streptococcus mitis*, and 1 as *Streptococcus oralis*. Serotyping using a multiplex PCR assay was performed at the reference laboratory for *S. suis* at the University of Montreal. Five of the isolates were identified as *S. suis* serotype 33 and all others were considered to be untypable (5). All the isolates were negative with the *S. suis*-specific *recN*-PCR, but were positive with the newly described *S. ruminantium* PCR (Table 1). Isolates were further identified by 16S rRNA and chaperonin-60 (*cpn60*) gene sequencing (6). The sequence analysis with both genes confirmed that all of the isolates were *S. ruminantium* (Table 2).

Complete whole genome sequencing was performed on 5 (3 untypable and 2 serotype 33) selected isolates (Table 2). Analysis of the capsule gene clusters confirmed the 2 serotype 33 isolates, whereas the untypable isolates possessed capsule gene clusters different from those of *S. suis* serotype 33.

Antimicrobial susceptibility testing was performed by determining the minimum inhibitory concentrations (MIC) (7). Results showed that all strains were susceptible to penicillin, ampicillin, ceftiofur, enrofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and florfenicol. Most isolates, however, were highly resistant to chlortetracycline and oxytetracycline.

Streptococcus ruminantium has been recently described in ruminants as a cause of pneumonia, endocarditis, and arthritis, among other pathological conditions (2). It can also be present in tonsils of clinically healthy cattle (2). Many of the *S. suis* isolates previously reported from ruminants may correspond to *S. ruminantium* (8). However, it should be taken into consideration that legitimate typable *S. suis* have also been isolated from diseased ruminants (2,9,10). *Streptococcus ruminantium* isolates may have either a positive or a negative result with *S. suis* serotype 33-specific primers as tested by multiplex PCR. It is unknown whether *S. ruminantium* (or *S. suis* serotype 33) can be isolated from diseased pigs. There are no reports describing the isolation of *S. suis* serotype 33 in pigs that were confirmed by molecular techniques. *Streptococcus suis* serotype 33 isolates from swine previously reported by our laboratory were serotyped with antisera using the co-agglutination test (11). The previously tested isolates that were still available for testing were recently serotyped using a multiplex PCR assay. These isolates were either untypable or belonged to other serotypes; they were all negative for the *S. ruminantium* PCR (unpublished results). This suggests that the serotype 33 reaction previously observed by co-agglutination was non-specific.

In the present report, we have described the isolation of *S. ruminantium* from clinical samples of ruminants in Canada. *Streptococcus suis* or “*S. suis*-like” isolates recovered from ruminants must be confirmed using molecular testing, including the *S. ruminantium* specific PCR. Isolates that are negative for *S. ruminantium* should be tested using the *recN*-PCR for *S. suis* and positive isolates should then be serotyped using the multiplex PCR assay.

Table 1. Identification of *Streptococcus ruminantium* isolates by MALDI-TOF and PCR.

Strain	Animal species	Isolate from	MALDI-TOF ID	Serotyping by PCR	<i>S. ruminantium</i> -specific PCR	<i>recN</i> PCR
1963982	Bovine	Joint	<i>S. mitis</i>	UT	+	-
1923258	Bovine	Lungs	<i>S. suis</i>	UT	+	-
1579484	Bovine	Joint	<i>S. suis</i>	33	+	-
1557846	Bovine	Joint	<i>S. suis</i>	UT	+	-
1546893	Bovine	Joint	<i>S. oralis</i>	UT	+	-
1546894	Bovine	Joint	<i>S. mitis</i>	UT	+	-
1515249	Bovine	Abscess	<i>S. suis</i>	UT	+	-
1515575	Bovine	Abscess	<i>S. mitis</i>	UT	+	-
1088055	Ovine	Abscess	<i>S. mitis</i>	33	+	-
1384855	Ovine	Joint	<i>S. suis</i>	33	+	-
1192202	Bovine	Milk (bulk tank)	<i>S. suis</i>	33	+	-
1088054	Ovine	Lung	<i>S. suis</i>	33	+	-
1384854	Ovine	Heart	<i>S. suis</i>	UT	+	-
876483	Bovine	Milk (mastitis)	<i>S. suis</i>	UT	+	-

UT - Untypable.

Table 2. Sequencing analysis of 16S rRNA and *cps60* gene sequences of *Streptococcus ruminantium* isolates included in this report.

Strain	16s rRNA gene sequencing (% similarity)		<i>cps60</i> gene sequencing (% similarity)		Isolates analyzed by WGS
	<i>S. suis</i> S735 ^T (Accession no. NC_018526.1)	<i>S. ruminantium</i> GUT187 ^T (Accession no. AP018400.1)	<i>S. suis</i> S735 ^T (Accession no. CP003736.1)	<i>S. ruminantium</i> GUT187 ^T (Accession no. AP018400.1)	
1963982	95.0	100	83.3	99.7	No
1923258	95.0	99.8	83.5	99.4	No
1579484	95.0	100	83.4	98.9	No
1557846	95.0	99.6	83.4	99.0	Yes
1546893	95.1	99.8	83.4	99.6	Yes
1546894	95.0	100	83.5	98.7	Yes
1515249	95.1	100	83.4	99.6	No
1515575	95.1	100	83.4	99.4	No
1088055	95.4	100	84.0	99.0	Yes
1384855	95.4	100	84.0	99.6	Yes
1192202	95.9	99.6	83.4	99.0	No
1088054	95.1	99.8	83.5	99.0	No
1384854	95.1	99.8	83.4	98.3	No
876483	95.1	99.8	83.4	98.7	No

References

1. Gottschalk M, Segura M. Streptococcosis. In: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson GW, eds. Diseases of Swine. 11th ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2019:934–950.
2. Okura M, Maruyama F, Ota A, et al. Genotypical and serological diversity of *Streptococcus suis* and the *S. suis*-like bacterium, *Streptococcus ruminantium*, in ruminants. *Vet Res* 2019;50:94.
3. Tohya M, Sekizaki T, Miyoshi-Akiyama T. Complete genome sequence of *Streptococcus ruminantium* sp. nov. GUT-187T (=DSM 104980T=JCM 31869T), the type strain of *S. ruminantium*, and comparison with genome sequences of *Streptococcus suis* strains. *Genome Biol Evol* 2018;10:1180–1184.
4. Ishida S, Tien le HT, Osawa R, et al. Development of an appropriate PCR system for the reclassification of *Streptococcus suis*. *J Microbiol Methods* 2014;107:66–70.
5. Okura M, Lachance C, Osaki M, et al. Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 2014;52:1714–1719.
6. Hill JE, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, Goh SH. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet Microbiol* 2005;107:63–69.
7. VET01S. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 3rd ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2015.
8. Okwumabua O, Peterson H, Hsu HM, Bochsler P, Behr M. Isolation and partial characterization of *Streptococcus suis* from clinical cases in cattle. *J Vet Diagn Invest* 2017;29:160–168.
9. Komatsu T, Watando E, Inaba N, Sugie K, Okura M, Shibahara T. Bovine vegetative endocarditis caused by *Streptococcus suis*. *J Vet Med Sci* 2018;80:1567–1571.
10. Higgins R, Gottschalk M, Fecteau G, Sauvageau R, De Guise S, Du Tremblay D. Quebec. Isolation of *Streptococcus suis* from cattle. *Can Vet J* 1990;31:529.

11. Gottschalk M, Lacouture S. Canada: Distribution of *Streptococcus suis* (from 2012 to 2014) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (from 2011 to 2014) serotypes isolated from diseased pigs. Can Vet J 2015;56:1093–1094.