

Université de Montréal

Interactions entre *Streptococcus suis* sérotype 2 et *Haemophilus parasuis* avec des cellules porcines lors des co-infections bactériennes

par Annabelle Mathieu-Denoncourt

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

Août 2017

©, Annabelle Mathieu-Denoncourt, 2017

## RÉSUMÉ

*Streptococcus suis* et *Haemophilus parasuis* sont des colonisateurs des voies respiratoires supérieures du porc. Ils sont toutefois les causes les plus importantes de mortalité dans les élevages à travers le monde puisqu'ils entraînent des maladies inflammatoires telles les septicémies, l'arthrite, la méningite et la pneumonie chez les porcelets suite au sevrage. Puisqu'ils empruntent la même route d'infection, produisent des maladies inflammatoires similaires et colonisent une majorité des animaux et compte tenu que les infections mixtes sont considérées comme étant la principale cause de maladie dans les animaux d'élevage, des interactions entre ces deux agents pourraient exister. En vue d'explorer les interactions entre *S. suis* sérotype 2 et *H. parasuis* de différents niveaux de virulence et leurs interactions avec les cellules porcines lors des premières étapes de l'infection, des cellules épithéliales de la trachée et des macrophages alvéolaires porcins primaires ont été infectés *in vitro* avec ces deux agents. Il a été possible d'observer qu'une souche peu virulente s'associe davantage aux cellules de l'hôte qu'une souche virulente, en induisant aussi généralement une plus forte réponse inflammatoire. Bien qu'il s'associe autant que la souche virulente de *H. parasuis* aux cellules épithéliales, *S. suis* induit une réponse inflammatoire généralement plus faible que *H. parasuis*. Contrairement à ce qui était attendu, les interactions entre *S. suis* et *H. parasuis* semblent limitées lors des premières étapes d'infection.

**Mots-clefs :** *Streptococcus suis* sérotype 2, *Haemophilus parasuis*, co-infections, cellules porcines, macrophages alvéolaires, cellules épithéliales, inflammation, phagocytose, cytotoxicité

## ABSTRACT

*Streptococcus suis* and *Haemophilus parasuis* are colonizers of the upper respiratory tract of healthy pigs. However, they are also the most important cause of mortality in pig farms around the world by causing inflammatory diseases such as septicemia, arthritis, meningitis and pneumonia among weaned piglets. They use the same route of infection, cause similar inflammatory diseases and colonize a majority of animals. Because mixed infections are considered as the primary cause of disease in livestock, interactions between *S. suis* and *H. parasuis* could occur. In order to investigate the interactions between *S. suis* serotype 2 and *H. parasuis* of different level of virulence and their interactions with cells during the first steps of infection, tracheal epithelial cells and primary alveolar macrophages were infected *in vitro* with those bacteria. It has been possible to observe that a low virulent *H. parasuis* strain adheres more to host cells than the virulent strain, and induces a stronger inflammatory response. Although it adheres as much as the virulent *H. parasuis* strain, *S. suis* serotype 2 induces a lower inflammatory response than *H. parasuis*. Contrary to what we expected, the interactions between *S. suis* serotype 2 and *H. parasuis* seem, in general, limited during the first steps of the infection.

**Keywords :** *Streptococcus suis* serotype 2, *Haemophilus parasuis*, co-infections, pig cells, alveolar macrophages, epithelial cells, inflammation, phagocytosis, cytotoxicity

# TABLE DES MATIÈRES

Résumé .....	ii
Abstract .....	iii
Table des matières .....	iv
Liste des tableaux .....	vii
Liste des figures .....	viii
Liste des sigles et abréviations .....	xii
Remerciements .....	xv
<b>I INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>II RECENSION DE LA LITTÉRATURE .....</b>	<b>5</b>
<b>1. <i>Streptococcus suis</i> .....</b>	<b>6</b>
1.1 Histoire et épidémiologie .....	6
1.2 Caractéristiques de la bactérie .....	8
1.3 Transmission et susceptibilité .....	10
1.4 Pathogenèse de <i>S. suis</i> .....	11
1.4.1 Colonisation .....	11
1.4.2 Survie dans le sang et dissémination .....	12
1.4.3 Inflammation systémique .....	14
1.4.4 Passage au SNC et méningite .....	14
<b>2. <i>Haemophilus parasuis</i> .....</b>	<b>18</b>
2.1 Histoire et épidémiologie .....	18
2.2 Caractéristiques de la bactérie .....	19
2.3 Transmission et susceptibilité .....	20
2.4 Pathogenèse de <i>H. parasuis</i> .....	21
2.4.1 Colonisation et pneumonie .....	21
2.4.2 Dissémination, inflammation et méningite .....	23

<b>3. Les cellules épithéliales de la trachée</b>	<b>26</b>
3.1 Généralités	26
3.2 Interactions de <i>S. suis</i> avec les cellules épithéliales	26
3.2.1 Adhésion de <i>S. suis</i> aux cellules épithéliales	27
3.2.1.1 Rôle de la CPS de <i>S. suis</i> sur son adhésion aux cellules épithéliales	27
3.2.1.2 Rôle des protéines bactériennes dans l'adhésion de <i>S. suis</i> aux cellules épithéliales	28
3.2.1.3 Rôle de la suilysine	30
3.2.2 Invasion des cellules épithéliales par <i>S. suis</i>	31
3.2.3 Modulation de l'expression de médiateurs de l'inflammation	34
3.3 Interactions de <i>H. parasuis</i> avec les cellules épithéliales	35
3.3.1 Adhésion et invasion des cellules épithéliales par <i>H. parasuis</i>	35
3.3.2. Modulation de l'expression de médiateurs de l'inflammation	37
<b>4. Macrophages et macrophages alvéolaires</b>	<b>39</b>
4.1 Généralités et origine	39
4.2 Phagocytose et activation	40
4.3 Interaction de <i>S. suis</i> avec les macrophages et les macrophages alvéolaires porcins	41
4.3.1 Adhésion aux macrophages	41
4.3.2 Résistance à la phagocytose	42
4.3.3 Induction de l'expression de médiateurs de l'inflammation	46
4.4 Interaction de <i>H. parasuis</i> avec les macrophages et les macrophages alvéolaires porcins	50
4.4.1 Adhésion aux macrophages	50
4.4.2 Résistance à la phagocytose	51
4.4.3 Modulation de l'activation	52
4.4.4 Induction de l'expression de médiateurs de l'inflammation	52
<b>5. Co-infections</b>	<b>55</b>
5.1 Interactions entre virus et bactéries	56
5.2 Interactions entre bactéries	56
5.3 Interactions entre <i>S. suis</i> et <i>H. parasuis</i>	58

<b>III</b>	<b>MATÉRIEL, MÉTHODE ET RÉSULTATS .....</b>	<b>63</b>
	Article I : Limited interactions between <i>Streptococcus suis</i> and <i>Haemophilus parasuis</i> in <i>in vitro</i> co-infection studies .....	64
<b>IV</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>94</b>
<b>V</b>	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>115</b>
<b>VI</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>118</b>
<b>VII</b>	<b>ANNEXES.....</b>	<b>i</b>
	Figures supplémentaires .....	ii
	Article II : Recruitment of Factor H to the <i>Streptococcus suis</i> Cell Surface is Multifactorial .....	xii
	Article III : Bias of experimental design in determining <i>Streptococcus suis</i> virulence factors .....	liii

## LISTE DES TABLEAUX

### Article scientifique I

Table I	<i>Streptococcus suis</i> serotype 2 and <i>Haemophilus parasuis</i> strains used in this study .....	83
Table 2	Porcine-specific primer sequences used in the study for pro-inflammatory cytokine detection by real-time quantitative RT-qPCR .....	83

### Article scientifique II

Table 1	Bacterial strains and plasmids used in this study.....	XXXII
Table 2	Oligonucleotide primers used in this study .....	XXXIV

### Article scientifique III

Table 1	Strains and plasmids used in this study .....	lxxii
Table 2	Oligonucleotide primers used for the construction of the <i>S. suis</i> dipeptidyl peptidase IV (dppIV) and autolysin (atl) mutants used in this study .....	lxxiii
Table 3	Comparison of the experimental design used in the previous and present studies to evaluate the role of the dipeptidyl peptidase IV and autolysin as virulence factors for <i>S. suis</i> serotype 2 .....	lxxiv

## LISTE DES FIGURES

### Recension de la littérature

Figure 1	Hypothèse de la pathogenèse de <i>Streptococcus suis</i> .....	17
Figure 2	Hypothèse de la pathogenèse de <i>Haemophilus parasuis</i> .....	25
Figure 3	Résumé des interactions de <i>S. suis</i> et <i>H. parasuis</i> avec les cellules épithéliales.	38
Figure 4	La capsule polysaccharidique de <i>S. suis</i> prévient sa phagocytose par les macrophages .....	44
Figure 5	Voie de signalisation MyD88 dépendante des récepteurs Toll-Like .....	48
Figure 6	Résumé des interactions de <i>S. suis</i> et <i>H. parasuis</i> avec les macrophages.....	54

### Article scientifique I

Figure 1	Adhesion to and invasion of neonatal porcine tracheal epithelial cells by <i>S. suis</i> or <i>H. parasuis</i> strains of different virulence .....	84
Figure 2	Adhesion of <i>S. suis</i> and <i>H. parasuis</i> strains of different virulence to neonatal porcine tracheal epithelial cells either alone or in simultaneous or sequential co-infections.....	85
Figure 3	Normalized relative expression of IL-6 and IL-8 by neonatal porcine tracheal epithelial cells during single and simultaneous co-infections with <i>S. suis</i> and <i>H. parasuis</i> .....	86
Figure 4	Normalized IL-6 and IL-8 relative expression by primary alveolar macrophages after single and simultaneous co-infections with <i>S. suis</i> and <i>H. parasuis</i> .....	87
Figure 5	Association of <i>H. parasuis</i> to primary alveolar macrophages assessed by FACS. ....	88



Figure 6 Phagocytosis of <i>H. parasuis</i> by primary alveolar macrophages as assessed by the antibiotic-protection assay.....	89
---	----

### Figures supplémentaires

Figure S1 Photo d'une culture mixte de <i>S. suis</i> et <i>H. parasuis</i> sur gélose chocolat.....	ii
Figure S2 Croissance de <i>S. suis</i> et <i>H. parasuis</i> en co-culture sur géluses.....	iii
Figure S3 Croissance bactérienne en milieu de culture cellulaire lors d'infections simples et mixtes de cellules épithéliales de la trachée de porcelet nouveau-né...	iv
Figure S4 Cytotoxicité induite par les co-infections avec <i>S. suis</i> et <i>H. parasuis</i> .....	v
Figure S5 Association totale de <i>S. suis</i> et <i>H. parasuis</i> aux cellules épithéliales de la trachée de porcelet à différents temps.....	vi
Figure S6 Association totale de <i>S. suis</i> et <i>H. parasuis</i> aux cellules épithéliales de la trachée de porcelet avec différentes multiplicités d'infection, après 120 min d'incubation.....	vii
Figure S7 Saturation des récepteurs lors de co-infections de cellules épithéliales de la trachée avec <i>S. suis</i> et <i>H. parasuis</i> en utilisant des faibles ou fortes multiplicités d'infection lors des prétraitements .....	viii
Figure S8 Expression relative normalisée de l'IL-6 par les cellules épithéliales de la trachée de porcelet infectées avec <i>S. suis</i> ou <i>H. parasuis</i> comparée au milieu.....	ix
Figure S9 Expression relative normalisée de l'IL-8 par les cellules épithéliales de la trachée de porcelet infectées avec <i>S. suis</i> et <i>H. parasuis</i> comparée au milieu.....	x
Figure S10 Expression relative normalisée du CCL5 par les cellules épithéliales de la trachée de porcelet infectées avec <i>S. suis</i> ou <i>H. parasuis</i> comparée au milieu.....	xi

## Article scientifique II

Figure 1 Western blot showing factor H binding protein (Fhbp) expression in <i>S. suis</i> wild-type strain P1/7 and complemented $\Delta f h b p$ mutant but not in the isogenic $\Delta f h b p$ mutant. ....	xxxvi
Figure 2 Effect of factor H on cell adhesion and invasion by <i>S. suis</i> wild-type strain P1/7.....	xxxvii
Figure 3 Effect of the deletion of <i>f h b</i> and <i>f h b p</i> on the <i>S. suis</i> adhesion to A549 and hBMEC cells in the presence or absence of factor H.....	xxxix
Figure 4 Deposition of factor H to the <i>S. suis</i> cell surface: role of Fhb and Fhbp.....	xli
Figure 5 Deposition of factor H to the <i>S. suis</i> cell surface: role of capsular polysaccharide (CPS) and its sialic acid moiety.....	xlii
Figure 6 Factor-I cofactor assay showing C3b degradation by <i>S. suis</i> strains.....	xliii
Figure 7 Phagocytosis of <i>S. suis</i> strains by THP-1 human macrophages in presence of complement-rich serum.....	xliv
Figure 8 Killing of <i>S. suis</i> by swine whole blood cells.....	xl

## Article scientifique III

Figure 1 The <i>S. suis</i> serotype 2 dipeptidyl peptidase IV and autolysin are not involved in adhesion to fibronectin, regardless of the sequence type (ST) of the strain used.....	lxxv
Figure 2. The <i>S. suis</i> serotype 2 dipeptidyl peptidase IV is not involved in adhesion to porcine tracheal epithelial cells, regardless of the sequence type (ST) of the strain used, unlike the autolysin.....	lxxvi
Figure 3 The dipeptidyl peptidase IV is not involved in <i>S. suis</i> serotype 2 biofilm formation, while implication of the autolysin is dependent on the sequence type (ST) of the strain used.....	lxxvii

Figure 4 The *S. suis* serotype 2 dipeptidyl peptidase IV and autolysin are not implicated in host virulence in a C57BL/6 mouse model of infection, regardless of the sequence type (ST) of the strain, with the exception of a minor role for the autolysin of the ST25 strain.....lxxviii

Figure 5 The autolysin of the ST25 strain, but not the dipeptidyl peptidase IV, hinders bacterial survival in the blood.....lxxix

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	Analyse de la variance unilatérale
ARN	Acide ribonucléique
BBB	Barrière hématoencéphalique
BSA	Albumine sérique de boeuf
CCLX	Chimiokine à motif CC
cDNA	ADN complémentaire
CDT	<i>Cytolethal distending toxin</i>
CFU	Unités formatrices de colonies
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CPS	Capsule polysaccharidique
CXCL	Chimiokine à motif CXC
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNase	Désoxyribonucléase
EDTA	Ethylène-diamine-tétraacétique acide édétique
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	Sérum de boeuf fétal
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
Gbo3	<i>Globotriaosylceramide</i>
Hypox	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
INF	Interféron
LacCer	Lactosylceramide
LDH	Lactate déshydrogénase
LPS	Lipopolysaccharides
LOS	Lipooligosaccharides

LTA	Acide lipotéichoïque
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDL	Microdomaine lipidique
MFI	Intensité de fluorescence moyenne
MLST	Typage par séquence multilocus
MMP-9	Métalloprotéinase 9
MOI	Multiplicité d'infection
NAD	Nicotinamide adénine di nucléotide
NPTr	Cellules épithéliales de la trachée de porcelet nouveau-né
OD	Densité optique
OmpP2	<i>Outer membrane protein P2</i>
PAM	Macrophage alvéolaire porcin
PB	Tampon de perméabilisation
PBMEC	Cellules endothéliales microvasculaires du cerveau
PBS	Tampon phosphate salin
PCPEC	Cellule épithéliale du plexus choroïdien
PCR	Amplification en chaîne par polymérase
PI-K3	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PPIA	Peptidylprolyl Isomérase A
PPRSV	Virus du syndrome reproductif et respiratoire porcin
RNAse	Ribonucléase
RPM	Rotations par minute
RT-qPCR	Amplification quantitative en chaîne par transcription inverse
SA	Acide syalique
SAO	<i>Surface antigen one</i>
SIV	Virus de l'influeza porcin
SLA	Complexe majeur d'histocompatibilité porcin
SLY	Suilysine
SNC	Système nerveux central
SOD	<i>Superoxyde dismutase</i>

ST	Type allélique
THA	<i>Todd Hewitt Broth Agar</i>
THB	<i>Todd Hewitt Broth</i>
TLR	Récepteur <i>Toll-like</i>
TNF	Facteur de nécrose tumoral
6PGD	6-phosphogluconate déshydrogénase
VtaA	Autotransporteur trimérique associé à la virulence

## REMERCIEMENTS

J'aimerais exprimer ma reconnaissance et ma gratitude envers toutes les personnes et les institutions qui ont participé à l'accomplissement de ce projet de maîtrise, et en particulier :

- À mon directeur, Dr Marcelo Gottschalk, qui m'a accueillie dans son laboratoire, et épaulée tout au long de ma maîtrise. Merci pour la confiance que vous m'avez portée, les opportunités d'en apprendre toujours davantage lors de cours et séminaires, le soutien financier, ainsi que pour vos nombreux conseils et encouragements. Ils m'ont permis de donner le meilleur de moi-même et de livrer un travail de qualité dont je suis fière.
- À ma co-directrice, Dre Mariela Segura, qui, avec sa patience, sa grande disponibilité et ses explications imagées et structurées, m'a été d'une aide indispensable tout au long de ma maîtrise. Merci énormément pour vos nombreux encouragements et votre gentillesse.
- À ma co-directrice, Dre Virginia Aragon, pour ses conseils et ses précisions, qui ont été d'une grande aide.
- À Sonia Lacouture, assistante de recherche du laboratoire de Dr Gottschalk, toujours prête à répondre à mes questions et m'aider à trouver des solutions à de nombreux problèmes. Tes blagues et tes histoires rocambolesques ont rendu ces deux années bien agréables !
- Un merci spécial à Corinne Letendre et Dr Paul Lemire, qui ont eu la générosité et la patience de m'enseigner les subtilités de l'art du FACS.
- Merci à David Roy (le meilleur superviseur de stage), qui m'a montré patiemment les rudiments de la recherche (on est parti de loin !) et à Jean-Philippe Auger, mon gourou du qPCR. Merci pour les discussions scientifiques, les innombrables conseils et l'aide immense que vous m'avez apporté. Un grand merci à Audrey, Léa, Agustina et à Sarah, pour votre amitié, vos nombreux encouragements et votre sourire. Merci à tous les

membres et anciens membres des laboratoires du Dr Gottschalk et de Dre Segura. J'ai passé de merveilleux moments en votre compagnie; vous m'avez apporté énormément tant au niveau scientifique qu'humain.

- Merci à ma famille et mes amis, qui m'ont encouragée et aidée tout au long de mon cheminement. Merci Justine d'avoir été ma correctrice personnelle et à Frédérick pour le support moral, la patience et la motivation.
- Merci aux organismes qui ont subventionné mes travaux, soient le GRÉMIP, le CRIPA et la Faculté de Médecine Vétérinaire. Merci aux membres de ces organismes, aux Dr Mario Jacques et Dr Philippe Fravalo qui ont siégé sur mon comité conseil, et à tous les professeurs, étudiants et membres du personnel du GREMIP qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet pour leur aide, leur disponibilité et leurs judicieux conseils.



# **I INTRODUCTION**

*Streptococcus suis* est une bactérie pathogène d'importance chez le porc, menant à diverses maladies inflammatoires telles que la méningite, l'endocardite et l'arthrite (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012). Il cause en de rares occasions la pneumonie (Feng *et al*, Virulence, 2014). *Haemophilus parasuis* est aussi une bactérie pathogène d'importance chez le porc. Il est l'agent étiologique de la maladie de Glässer, une maladie inflammatoire caractérisée par une polysérosite, l'arthrite, la méningite et, parfois, la pneumonie (Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013). Bien qu'elles soient des bactéries faisant partie de la flore bactérienne normale du porc et qu'elles soient présentes sur une majorité des animaux (souches non ou peu virulentes), ces deux bactéries sont la cause la plus fréquente de mortalité dans les élevages et mènent ainsi à des pertes économiques importantes (Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013; Goyette-Desjardins *et al*, Emerg Microbes Infect, 2014). *S. suis* et *H. parasuis* empruntent la même voie d'entrée principale dans l'hôte, soit le tractus respiratoire supérieur (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012; Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013). Ils provoquent la maladie surtout chez les jeunes porcelets quelque temps après le sevrage, lorsque l'immunité passive prodiguée par la mère diminue, mais aussi chez les animaux provenant d'élevages dont les conditions de salubrité et environnementales le permettent ou ayant un profil de santé à risque (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012; Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013). Aucun vaccin efficace et universel n'est encore disponible contre ces deux agents.

Il est de plus en plus accepté que les infections mixtes soient la cause la plus fréquente de maladie chez les animaux d'élevage (Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011). Une interaction entre ces bactéries pourrait donc survenir lors des premières phases d'infection leur

permettant de produire la maladie (Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011). Mais, bien que l'on retrouve ces bactéries chez un pourcentage élevé d'animaux, qu'elles atteignent fortement les animaux au même stade de développement, et qu'elles produisent des maladies inflammatoires similaires du tractus respiratoire, très peu d'informations sont connues sur l'interaction entre *S. suis* et *H. parasuis* et sur l'influence qu'une espèce bactérienne pourrait avoir sur l'autre espèce bactérienne lors d'infections simultanées des cellules de l'hôte. Dans une optique de prévention efficace ou de traitement, l'étude de ces interactions pourrait permettre de mieux comprendre la pathogénèse bactérienne lors d'infections polymicrobiennes du tractus respiratoire porcin et ainsi de cibler les étapes importantes pour l'installation de l'infection mixte.

Les premières étapes de l'infection par *S. suis* et *H. parasuis* prenant place dans le tractus respiratoire porcin, les cellules épithéliales de la trachée et les macrophages alvéolaires porcins forment donc les premières barrières auxquelles ils devront faire face. L'étude *in vitro* d'une co-infection par *S. suis* et *H. parasuis* de ces cellules permettrait donc de visualiser les interactions entre ces deux bactéries et avec ces cellules lors de la co-infection.

Nous avons émis comme hypothèse qu'une co-infection avec *S. suis* et *H. parasuis* modifierait les interactions de ces pathogènes avec des cellules porcines, avec, entre autres, une inhibition de la phagocytose de souches peu virulentes de *H. parasuis* par les macrophages alvéolaires grâce à la capsule polysaccharidique de *S. suis* (Houde *et al*, Infect Immun, 2012), une augmentation de l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales et une augmentation de la réponse inflammatoire au niveau du système respiratoire supérieur

(cellules épithéliales) ou inférieur (macrophages alvéolaires). L'objectif général du projet est donc d'étudier *in vitro* l'effet d'une co-infection par *S. suis* et *H. parasuis* sur leurs interactions avec des cellules épithéliales de la trachée et les macrophages alvéolaires porcins. Pour ce faire, l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales ainsi que leur activation et celle de macrophages alvéolaires, observées lors des co-infections avec les deux espèces bactériennes (souches virulentes et peu virulentes), ont été comparées avec les interactions observées lors des infections individuelles. De plus, l'inhibition potentielle de la phagocytose de *H. parasuis* due à la présence au préalable de *S. suis* a aussi été étudiée.

## **II RECENSION DE LA LITTÉRATURE**

# 1. *Streptococcus suis*

## 1.1 Histoire et épidémiologie

*Streptococcus suis* (*S. suis*) a été rapporté pour la première fois en 1954, lorsqu'il a été isolé lors d'une épidémie chez des porcelets atteints de méningites, de septicémies et d'arthrite (Wertheim *et al*, Clin Infect Dis, 2009). *S. suis* a depuis été associé à diverses maladies chez le porc telles des endocardites, des méningites, des polysérosites, des avortements spontanés et des abcès (Staats *et al*, Vet Res Commun, 1997; Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012; Gottschalk & Segura, Vet Microbiol, 2000). *S. suis* est également un agent opportuniste lors de pneumonies (Feng *et al*, Virulence, 2014). *S. suis* s'est ensuite répandu à travers le monde et est maintenant considéré comme l'une des principales causes de mortalité dans les élevages porcins, surtout lors des dernières décennies (Gottschalk *et al*, Anim Health Res Rev, 2007; Feng *et al*, Virulence, 2014). Les porcs peuvent être des porteurs asymptomatiques de *S. suis* et près de 100 % des fermes sont positives pour cette bactérie (Goyette-Desjardins *et al*, Emerg Microbes Infect, 2014).

Principalement retrouvé chez le porc, l'hôte naturel et le réservoir principal de la bactérie, *S. suis* a aussi été isolé du tube digestif de chats, de chiens, de cerfs, de bovins et de chevaux (Wertheim *et al*, Clin Infect Dis, 2009; Staats *et al*, Vet Res Commun, 1997). Chez le porc, *S. suis* est surtout retrouvé dans les voies respiratoires supérieures, notamment dans les amygdales palatines et les cavités nasales (Goyette-Desjardins *et al*, Emerg Microbes Infect,

2014). Il peut aussi faire partie de la flore génitale et digestive du porc (Goyette-Desjardins *et al*, *Emerg Microbes Infect*, 2014).

*S. suis* est un agent zoonotique en émergence. En effet, près de 15 ans après sa découverte, *S. suis* a été associé à un premier cas d'infection humaine au Danemark, avec, par la suite, une augmentation de plus en plus importante de ces cas (Wertheim *et al*, *Clin Infect Dis*, 2009). Les premiers cas identifiés étaient associés aux professions impliquant le contact avec les animaux ou la manipulation et/ou la consommation de sous-produits ou de viande contaminés (Gottschalk *et al*, *Anim Health Res Rev*, 2007; Wangsomboonsiri *et al*, *J Infect*, 2008; Goyette-Desjardins *et al*, *Emerg Microbes Infect*, 2014). *S. suis* pourrait aussi être transmis à l'Homme par contact sur des lésions cutanées (Wertheim *et al*, *Clin Infect Dis*, 2009; Gottschalk *et al*, *Future Microbiol*, 2010). Cependant, les cas d'infection à *S. suis* se sont répandus à la population générale et deux épidémies ont touché la Chine en 1998 et en 2005, avec, depuis, un nombre grandissant de cas isolés d'infection à *S. suis* chez l'Homme en Asie du Sud-Est (Fittipaldi *et al*, *Future Microbiol*, 2012; Feng *et al*, *Virulence*, 2014; Goyette-Desjardins *et al*, *Emerg Microbes Infect*, 2014). Un taux de mortalité d'environ 20 % parmi les quelques 200 individus touchés en 2005 a été observé (Lun *et al*, *Lancet Infect Dis*, 2007). *S. suis* est la première cause de méningites bactériennes chez les adultes au Vietnam, la deuxième en Thaïlande et une des principales causes de méningites à Hong Kong (Fittipaldi *et al*, *Future Microbiol*, 2012).

Aucun vaccin efficace contre *S. suis* n'est disponible à ce jour, une meilleure compréhension de ses facteurs de virulence et de ses antigènes protecteurs étant requise pour

produire un vaccin universel efficace tant au niveau du bétail que pour l'Homme (Segura M, Expert Rev Vaccines, 2015).

## 1.2 Caractéristiques de la bactérie

*S. suis* est une bactérie encapsulée anaérobie facultative et à Gram positif (Wangsomboonsiri *et al*, J Infect, 2008). De forme ovoïde et non motile, *S. suis* est  $\alpha$ -hémolytique sur gélose au sang (Feng *et al*, Virulence, 2014). Il est présent individuellement, en paires ou en courtes chainettes (Wertheim *et al*, Clin Infect Dis, 2009). Trente-cinq sérotypes de *S. suis* ont initialement été établis selon la composition de sa capsule polysaccharidique (CPS). Il existe aussi des souches non-typables non-encapsulées ou pouvant appartenir à de nouveaux sérotypes encore non décrits (Gottschalk *et al*, Vet Microbiol, 2013). Plus récemment, de nouveaux gènes capsulaires ont été identifiés pour *S. suis* et pourraient permettre la caractérisation et le classement de ces souches de *S. suis* non-typables par la sérotypie conventionnelle (Zheng *et al*, Vet Res, 2017). Par ailleurs, la taxonomie basée sur l'analyse génétique plutôt que sur la sérotypie conventionnelle, suggère que les sérotypes 20, 22, 26, 32, 33 et 34 appartiennent en fait à d'autres espèces bactériennes, soit *S. parasuis* (20, 22, 26), *S. orisratti* (32, 34) et *S. acidominimus* (33) (Okura *et al*, Pathogens, 2016). Bien que les sérotypes 1/2, 5, 9 et 14 aient été la cause d'épisodes endémiques chez le porc en Amérique du Nord et en Europe (Gottschalk *et al*, Vet Microbiol, 2013), le sérotype 2 est considéré comme le plus virulent et le plus souvent isolé dans les cas de maladie chez le porc. Le sérotype 2 est divisé en types alléliques (ou ST pour « Sequence Type ») selon la méthode du « multi-locus sequence typing » (MLST) impliquant sept gènes de ménage (Goyette-



Desjardins *et al*, Emerg Microbes Infect, 2014). Des souches d'un même sérotype peuvent mener à différents signes cliniques (Staats *et al*, Vet Res Commun, 1997). Il est à noter que les souches de ce sérotype ne sont pas toutes virulentes et ceci est souvent corrélé avec leur appartenance aux ST (Goyette-Desjardins *et al*, Emerg Microbes Infect, 2014). Les souches de sérotype 2 provenant de l'Europe et de l'Asie sont en général plus virulentes que celles provenant de l'Amérique du Nord (Gottschalk *et al*, Vet Microbiol, 2013). En Asie, les ST1, ST7, ST28 et ST104 sont les principaux ST isolés de cas cliniques, tandis qu'en Amérique du Nord, on retrouve les ST25 et ST28 principalement (Goyette-Desjardins *et al*, Emerg Microbes Infect, 2014).

Bien que peu connus, nombreux sont les facteurs de virulence employés par *S. suis* afin de parvenir à causer la méningite. On compte parmi eux la très peu immunogénique et anti-phagocytaire CPS et la suilysine (SLY), une hémolysine formant des pores toxique pour les cellules épithéliales et endothéliales, mais aussi pour les macrophages (He *et al*, Mol Med Rep, 2014). La SLY est couramment utilisée comme un marqueur de la virulence des souches de *S. suis*; elle n'est cependant pas produite par toutes les souches de *S. suis* et les souches ST1 et ST7, associées à une forte virulence en Asie, produisent en général cette hémolysine (Goyette-Desjardins *et al*, Emerg Microbes Infect, 2014; Tenenbaum *et al*, Future Microbiol, 2016). Les souches ST25 et ST28 isolées surtout en Amérique du Nord et étant considérées moins virulentes, ne produisent en général pas cette toxine (Goyette-Desjardins *et al*, Emerg Microbes Infect, 2014).

### 1.3 Transmission et susceptibilité

Puisqu'il se retrouve principalement dans les voies respiratoires supérieures, *S. suis* se transmet le plus souvent par contact oral ou nasal avec un autre animal colonisé, et ceci de manière verticale ou horizontale, respectivement, de la truie aux porcelets ou entre les animaux d'un même troupeau (Wertheim *et al*, Clin Infect Dis, 2009). Un porcelet peut aussi être infecté à la naissance si la truie était colonisée ou avait une infection au niveau génital (Staats *et al*, Vet Res Commun, 1997). *S. suis* peut contaminer l'eau et les fèces dans la porcherie, pouvant donc mener à la propagation de l'infection dans le troupeau (Staats *et al*, Vet Res Commun, 1997). Les conditions dans la porcherie telles la ventilation, la densité d'animaux et la vaccination, ainsi que le profil de santé d'un animal sont des facteurs qui peuvent influencer l'infection des animaux par *S. suis* (Staats *et al*, Vet Res Commun, 1997). Bien que près de 100 % des animaux soient porteurs de *S. suis*, le taux d'incidence de maladie causée par cette bactérie est de moins de 5 %, avec un taux de mortalité de 20 % parmi les animaux touchés lorsqu'aucun traitement (métaphylaxie) n'est administré (Gottschalk *et al*, Anim Health Res Rev, 2007). Les souches de *S. suis* isolées de porcs malades sont généralement sensibles à la pénicilline, à la gentamicine et à la triméthoprim-sulfaméthoxazole, avec beaucoup d'isolats résistants à la tétracycline (Wertheim *et al*, Clin Infect Dis, 2009). Un troupeau ou un même animal est souvent colonisé par plusieurs souches de *S. suis* pouvant provenir de différents sérotypes (Gottschalk *et al*, Anim Health Res Rev, 2007).

Le porc peut être atteint à tout âge, mais la susceptibilité du porcelet est maximale au sevrage, à environ 6 semaines d'âge lorsque l'immunité passive contenue dans le lait maternel n'est plus active, puis diminue avec le temps alors que l'immunité du porcelet est mature (Staats *et al*, Vet Res Commun, 1997).

#### **1.4 Pathogenèse de *S. suis***

La pathogenèse de *S. suis* se produit en plusieurs étapes. *S. suis* doit d'abord coloniser les amygdales du porc. Ensuite, il doit atteindre la circulation sanguine, y survivre, se multiplier, pour se disséminer afin de produire l'inflammation. Finalement, il pourra atteindre le système nerveux central (SNC) et produire la méningite (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012). Pour ce faire, *S. suis* fait appel à de nombreux facteurs de virulence, compilés dans la revue de Fittipaldi publiée dans le journal *Future Microbiology* en 2012.

##### **1.4.1 Colonisation**

La première étape de la pathogenèse de *S. suis* est donc une étape de colonisation qui se produit par l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales de la muqueuse respiratoire. Les amygdales du porc contiennent plusieurs cryptes et invaginations propices à cette colonisation et pouvant permettre à la bactérie d'y survivre pour de longues périodes de temps (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012). Plusieurs molécules d'adhésion aux cellules ou à la matrice extracellulaire sont présentes à la surface de *S. suis* lui permettant ces interactions avec les cellules épithéliales. Le recrutement de protéines de la matrice extracellulaire ou du

sérum, telles le plasminogène et la fibronectine, pourrait faciliter ses interactions avec les cellules épithéliales respiratoires (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012; Doran *et al*, Acta Neuropathologica, 2016). La production d'un biofilm par *S. suis* pourrait aussi permettre la colonisation (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012). Un biofilm est un amas structuré de cellules bactériennes entouré d'une matrice polymérique et attaché à une surface (Jacques *et al*, Anim Health Res Rev, 2010). Le biofilm protège les bactéries du système immunitaire et des antibiotiques et permet une meilleure survie dans les voies respiratoires (Jacques *et al*, Anim Health Res Rev, 2010). Ils sont impliqués lors d'infections chroniques (Jacques *et al*, Anim Health Res Rev, 2010) Il est à noter qu'un biofilm peut être composé de plusieurs espèces bactériennes. *S. suis* est capable de traverser ou de briser la barrière épithéliale à l'aide de facteurs solubles cytotoxiques et de déjouer les mécanismes de la défense immunitaire innée pour atteindre et circuler dans le sang (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012). Les interactions de *S. suis* avec les cellules épithéliales seront discutées plus en détails dans une prochaine section.

#### **1.4.2 Survie dans le sang et dissémination**

La CPS de *S. suis* lui confère une protection contre la phagocytose par les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques ce qui lui permet de persister dans la circulation sanguine (Chabot-Roy *et al*, Microb Pathog, 2006; Houde *et al*, Infect Immun, 2012). Cette CPS confère aussi des propriétés protectrices contre le complément, les anticorps opsonisants et le *killing*, en plus d'être non-immunogénique (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012; Doran *et al*, Acta Neuropathologica, 2016). La CPS de *S. suis* est composée de différents

sucres, dont l'acide sialique (SA), qui pourrait être responsable de l'association de la bactérie aux cellules de l'hôte comme les monocytes (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012). Il pourrait donc se lier à ceux-ci pour voyager dans le sang. Les interactions de *S. suis* avec les macrophages seront vues plus en détails dans une prochaine section.

La présence de la CPS de *S. suis* diminue aussi la production de l'oxyde nitrique, un agent antimicrobien, par les phagocytes (Houde *et al*, Infect Immun, 2012). Les dérivés réactifs de l'oxygène peuvent endommager le matériel génétique, l'ARN et les protéines bactériennes. Pour contrer ces effets, *S. suis* produit une *superoxyde dismutase* (SOD), une métalloenzyme antioxydante, qui aide à sa survie dans les phagosomes (Tang *et al*, Vet Microbiol, 2012) et possède à sa surface une *adenosine synthase* produisant et relâchant dans le milieu extracellulaire de l'adénosine qui pourrait inhiber les activités oxydatives des neutrophiles et permettre la survie de *S. suis* dans le sang (Liu *et al*, J Infect Dis, 2014). En plus d'être toxique pour les cellules du sang, la SLY permettrait d'interférer avec l'internalisation et le *killig* de *S. suis* (Chabot-Roy *et al*, Microb Pathog, 2006).

*S. suis* peut contrer la déposition du complément qui permet l'opsonisation des bactéries favorisant la phagocytose de celles-ci (Lecours *et al*, J Infect Dis, 2011). La SLY diminuerait cette déposition en activant le complément dans le milieu extracellulaire, le rendant ainsi moins disponible à la déposition sur la bactérie (Lecours *et al*, J Infect Dis, 2011).

### **1.4.3 Inflammation systémique**

*S. suis* survit en circulation, produit une septicémie, et se dissémine ainsi pour atteindre les organes cibles afin de produire de l'inflammation exagérée (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012). *S. suis* induit une forte production de médiateurs de l'inflammation et la production systémique de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, INF- $\gamma$ , CCL2 et CCL5 a été montrée comme responsable de la mort subite des animaux (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012). Une charge bactérienne et une inflammation accrues peuvent donc compromettre l'hôte sévèrement et entraîner la mort par choc septique. Si la mort de l'animal ne survient pas, *S. suis* pourrait utiliser la méthode du « Cheval de Troie modifiée » en adhérant aux macrophages circulants pour atteindre et traverser la barrière hémato-encéphalique (BBB) et ainsi causer la méningite (Doran *et al*, Acta Neuropathologica, 2016).

### **1.4.4 Passage au SNC et méningite**

Pour produire la méningite, *S. suis* doit traverser la BBB formée majoritairement de cellules endothéliales microvasculaires du cerveau (PBMEC) afin d'atteindre le cerveau où il causera de l'inflammation. La bactérie peut adhérer aux PBMEC et les envahir (Vanier *et al*, Infect Immun, 2004). Les souches non-typables non-encapsulées adhèrent mieux aux PBMEC que les souches de sérotype 2 encapsulées (Benga *et al*, J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2005). Un mutant non-encapsulé adhère et envahit plus, mais aussi plus rapidement, les PBMEC que la souche parentale encapsulée, ce qui suggère que la CPS camoufle des protéines exposées à la surface et des molécules impliquées dans l'adhésion et l'invasion des

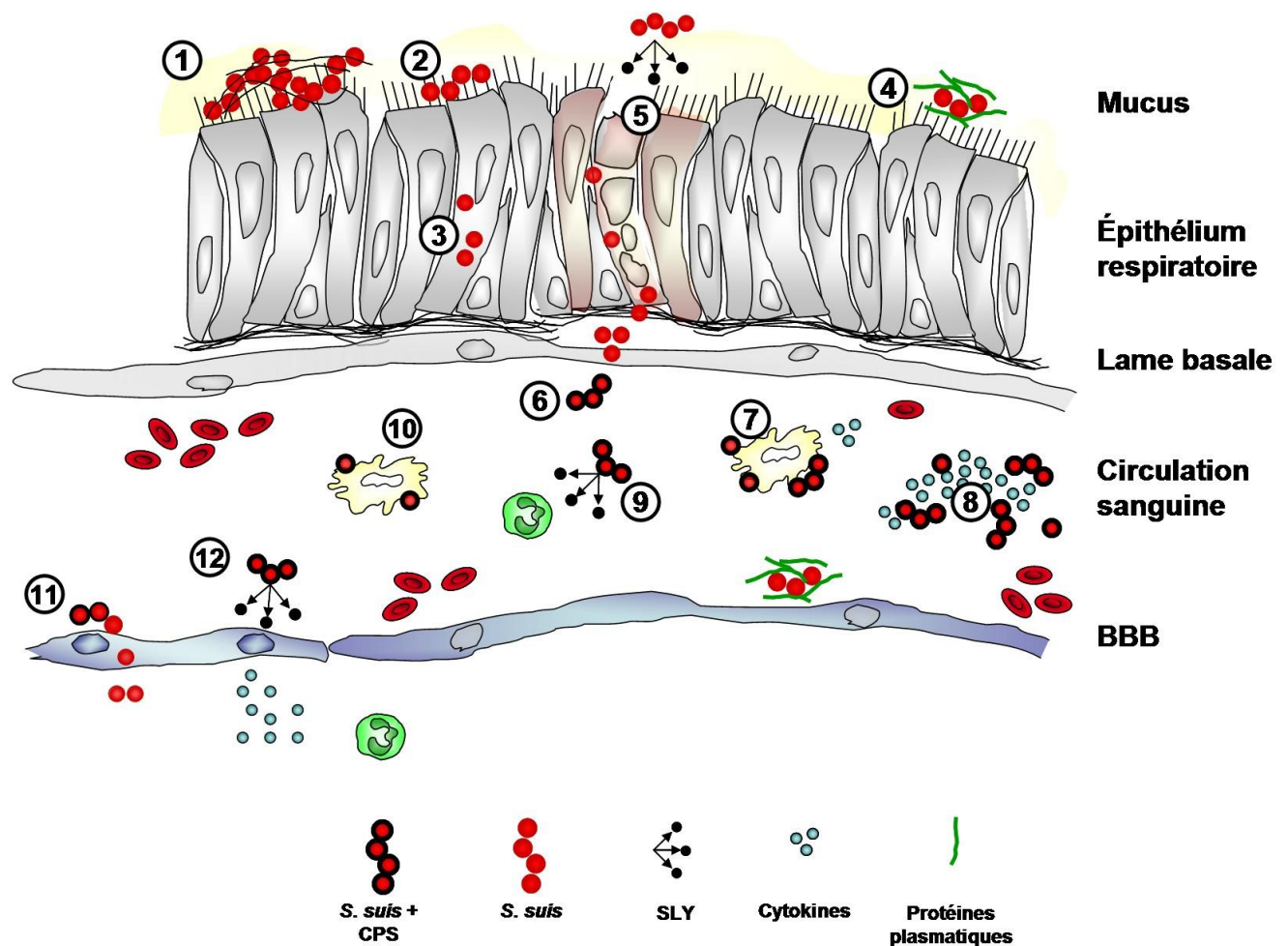
cellules de l'hôte (Vanier *et al*, Infect Immun, 2004; Benga *et al*, J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2005). Les composants de la paroi bactérienne, particulièrement les acides lipotéichoïques (LTA), ont aussi un rôle dans l'adhésion et l'invasion des PBMEC par *S. suis* (Vanier *et al*, Can J Vet Res, 2007). La D-alanylation du LTA qui modifie la charge de surface de la bactérie facilite l'adhésion de *S. suis* aux PBMEC (Fittipaldi *et al*, Infect Immun, 2008). Les protéines liant la fibronectine pourraient aussi faciliter l'adhésion aux PBMEC en recrutant la fibronectine comme pont liant la bactérie et les cellules (Vanier *et al*, Can J Vet Res, 2007; Esgleas *et al*, Microbiology, 2008). La SLY est cytotoxique pour les PBMEC, ce qui pourrait permettre la rupture de la BBB et le passage au cerveau (Vanier *et al*, Infect Immun, 2004).

La CPS interfère avec la production de cytokines par les PBMEC en cachant les composantes de la paroi bactérienne du milieu extracellulaire, alors que *S. suis* induit la production d'IL-6 et d'IL-8, mais pas d'IL-1 $\beta$  ou de TNF- $\alpha$ , par ces cellules (Vanier *et al*, Microb Pathog, 2009). La SLY induit aussi la production de ces cytokines par les PBMEC (Vanier *et al*, Microb Pathog, 2009). *S. suis* pourrait donc faciliter son passage à travers la BBB en induisant une cytotoxicité envers les PBMEC et en stimulant la production de médiateurs de l'inflammation (IL-6) et chémo-attractant (IL-8) qui modifierait la perméabilité de la barrière (Vanier *et al*, Microb Pathog, 2009). Une inflammation de la BBB causerait une plus grande perméabilité et l'infiltration de la bactérie au SNC (Doran *et al*, Acta Neuropathologica, 2016).

Suite à la rupture de la BBB, il y a une accumulation de neutrophiles dans le liquide cébrospinal, corrélant avec les hauts niveaux d'IL-8 observés (Wewer *et al*, J Neuroinflammation, 2011; Zheng *et al*, Vet Pathol, 2009; Sprenger *et al*, Clin Immunol Immunopathol, 1996). L'inflammation qui s'en suit entraîne des lésions aux couches externes du cerveau, à la moelle épinière ainsi qu'aux méninges, particulièrement à la dure mère (Zheng *et al*, Vet Pathol, 2009). Les neutrophiles pourraient donc avoir un rôle lors de l'infection à *S. suis*.

Outre la méningite qui est la manifestation la plus prévalente d'une infection à *S. suis*, l'arthrite, l'endocardite, la pneumonie, la septicémie, l'avortement spontané ainsi que la mort spontanée peuvent survenir chez l'animal malade (Gottschalk *et al*, Anim Health Res Rev, 2007). La Figure 1 résume l'hypothèse de la pathogenèse de *S. suis*.





**Figure 1 Hypothèse de la pathogenèse de *Streptococcus suis*.** 1) *S. suis* peut coloniser les cellules épithéliales du tractus respiratoire et former un biofilm en réduisant l'expression de la CPS. 2) Il adhère aux cellules épithéliales et peut les 3) envahir pour traverser la barrière. 4) Le recrutement de protéines plasmatiques tel le fibrinogène permet d'interagir avec les cellules épithéliales et de la barrière hémato-encéphalique (BBB). 5) Certaines souches de *S. suis* relâchent de la suilysine (SLY) toxique pour les cellules épithéliales pouvant déstabiliser la barrière 6) *S. suis* survie dans le sang à l'aide de sa capsule (CPS) qui permet d'éviter le complément et la phagocytose. 7) *S. suis* induit une septicémie avec un le relâchement de cytokines pro-inflammatoires par les cellules phagocytaires, provoquant une 8) réponse inflammatoire. 9) La SLY réduit la mort cellulaire par les neutrophiles en présence du complément. 10) *S. suis* pourrait aussi adhérer aux monocytes et voyager en circulation par ce moyen. 11) *S. suis* adhère et envahit les cellules de la BBB pour la traverser. 12) La SLY est toxiques pour les cellules de la BBB et induit la production de cytokines pro-inflammatoires et chémoattractantes pour les neutrophiles. L'inflammation, l'afflux de neutrophiles et la toxicité causent des dommages tissulaires au cerveau menant à la méningite. (Adaptée de Doran *et al*, Acta Neuropathol, 2016).

## **2. *Haemophilus parasuis***

### **2.1 Histoire et épidémiologie**

L'infection à *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*) chez le porc a été décrite pour la première fois par Glässer en 1910, la bactérie ne fût cependant isolée qu'en 1922 (Oliveira & Pijoan, Vet Microbiol, 2004). Bien que *H. parasuis* soit une bactérie qui colonise tôt les porcelets et qu'elle fasse partie de leur flore normale (Sack & Baltes, Vet Microbiol, 2009), elle peut parfois envahir son hôte et causer une polysérosite appelée « maladie de Glässer », responsable d'importantes pertes économiques dans l'industrie porcine (Olvera *et al*, Vet J, 2007). *H. parasuis* est considéré, au même titre que *S. suis*, comme l'une des plus importantes causes de mortalité dans les élevages, surtout parmi les porcelets (Olvera *et al*, Vet J, 2007). Les nouvelles méthodes de production et l'émergence de virus immunosuppresseurs ont augmenté le nombre de cas de maladie de Glässer dans les troupeaux (Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013). La maladie de Glässer se traduit par de l'arthrite, des méningites et une polysérosite sérofibrineuse dues à une réaction inflammatoire exagérée (Cerde-Cuellar & Aragon, Vet J, 2008; Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013; Oliveira et Pijoan, Vet Microbiol, 2004). Les infections à *H. parasuis* sont très répandues à travers le monde.

*H. parasuis* est retrouvé exclusivement chez les porcs, au niveau du système respiratoire supérieur (Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013). Des vaccins commerciaux ou des autovaccins dirigés contre la souche de *H. parasuis* retrouvée au sein d'un troupeau sont disponibles. Les vaccins commerciaux ne sont pas totalement efficaces puisqu'ils ne confèrent

pas toujours de protection contre tous les sérotypes et les souches non-typables de *H. parasuis* (MacInnes & Desrosiers, Can J Vet Res, 1999; Olvera *et al*, Vet J, 2007; Oliveira & Pijoan, Vet Microbiol, 2004). Une meilleure connaissance des facteurs de virulence à travers les sérotypes et les souches non-typables sera nécessaire pour y parvenir.

## 2.2 Caractéristiques de la bactérie

*H. parasuis* est une bactérie à Gram négatif de la famille des *Pasteurellaceae* (Sack & Baltes, Vet Microbiol, 2009). Non-motile, *H. parasuis* est une bactérie pléomorphe en forme de bâtonnet (Oliveira & Pijoan, Vet Microbiol, 2004). Sa croissance dépend de la présence de nicotinamide adénine di-nucléotide (NAD) (Oliveira & Pijoan, Vet Microbiol, 2004). *H. parasuis* possède le plus souvent une CPS, mais elle n'est pas présente sur toutes les souches et sa production est augmentée lorsque la bactérie subit un passage *in vivo*, même chez les souches non-virulentes (Oliveira & Pijoan, Vet Microbiol, 2004; Olvera *et al*, Vet Res, 2009). Les souches non-encapsulées tendent à être plus polymorphiques que les souches encapsulées, dont la forme est plutôt coccobacillaire (Oliveira & Pijoan, Vet Microbiol, 2004). On retrouve 15 sérotypes de *H. parasuis*. Originellement, les sérotypes 1, 5, 10, 12, 13 et 14 ont été décrits comme causant la mort en quelques jours et ils ont été considérés comme très virulents, alors que les 2, 4 et 5 étaient considérés comme étant moins virulents (Oliveira & Pijoan, Vet Microbiol, 2004). Les sérotypes 3, 6, 7, 8, 9 et 11, ont originellement été considérés comme non-virulents (Oliveira & Pijoan, Vet Microbiol, 2004). Cependant, il est accepté qu'il n'y a pas de corrélation entre sérotype et virulence. Les sérotypes 4 et 5, ainsi que les souches non-typables, sont les plus souvent isolés de porcs malades dans plusieurs pays tels le Japon,

l'Allemagne, les États-Unis et l'Espagne, tandis que les sérotypes 5 et 13 ainsi que 4 et les souches non-typables sont plus prévalents en Australie et en Amérique du Nord, respectivement (Oliveira & Pijoan, Vet Microbiol, 2004). Cependant, les souches d'un même sérotype sont très hétérogènes entre elles et un grand nombre (15 à 40 %) de souches isolées sont non-typables (Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2014; MacInnes & Desrosiers, Can J Vet Res, 1999). L'introduction de la méthode de PCR a permis la classification de la plupart de ces souches non-typables (Lacourture *et al*, Can Vet J, 2017).

Les souches associées à la virulence sont historiquement associées à un phénotype non-encapsulé, mais, étant donné la modulation de la production de la CPS par cette bactérie, la difficulté de détection et les propriétés anti-phagocytaires qu'elle confère, cette information reste mitigée (Olvera *et al*, Vet Res, 2009).

### **2.3 Transmission et susceptibilité**

*H. parasuis* se transmet par contact avec un animal colonisé, souvent de la truie aux porcelets ou par un animal d'un même troupeau (Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013). *H. parasuis* est une bactérie que l'on retrouve normalement dans la flore commensale du porc et est résidente du tractus respiratoire supérieur au niveau de la muqueuse nasale et de la trachée (MacInnes & Desrosiers, Can J Vet Res, 1999; Oliveira & Pijoan, Vet Microbiol, 2004; Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013). Un même animal peut être colonisé par plusieurs souches de *H. parasuis* à la fois, pouvant même appartenir à différents sérotypes (MacInnes & Desrosiers, Can J Vet Res, 1999). Les souches encapsulées sont associées à la

colonisation des voies respiratoires et sont capables de former un biofilm facilitant la colonisation (Oliveira & Pijoan, Vet Microbiol, 2004; Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013; Bello-Orti *et al*, Vet Res, 2014). Lorsqu'elle est impliquée dans la production de maladie, elle touche surtout les porcelets de 6 à 8 semaines d'âge, après le sevrage, qui ont moins d'anticorps maternels en circulation contre *H. parasuis* (Oliveira *et al*, J Swine Health Prod, 2004).

## **2.4 Pathogenèse de *H. parasuis***

### **2.4.1 Colonisation et pneumonie**

*H. parasuis* colonise donc les voies respiratoires supérieures du porc et peut briser la barrière épithéliale pour parvenir à disséminer systématiquement dans le sang (Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013; Costa-Hurtado *et al*, Vet Res, 2012). Il peut causer la pneumonie s'il atteint les poumons (Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013; Costa-Hurtado *et al*, Vet Res, 2012). Il peut produire un biofilm qui pourrait être utile à la colonisation des voies respiratoires, tel que démontré par des études *in vitro* et par des études de capture sélective de séquences transcrites (SCOTS) dans des poumons nécrosés de porc infectés avec *H. parasuis* (Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013; Jin *et al*, Vet Microbiol, 2006; Jin *et al*, Environ Microbiol, 2008)

Pour déstabiliser et passer la barrière épithéliale, *H. parasuis* produirait une réaction inflammatoire augmentant la perméabilité et la capacité d'invasion des cellules épithéliales, en

plus d'induire l'apoptose des cellules épithéliales (Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013). Ceci pourrait lui permettre de se rendre en circulation (Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013). Les interactions de *H. parasuis* avec les cellules épithéliales seront décrites plus en détails dans une prochaine section. Des souches de *H. parasuis* ont montré une capacité à dégrader les immunoglobulines de type A (IgA) du mucus respiratoire qui prennent part à la défense innée dans les muqueuses en liant la bactérie et en bloquant ses adhésines (Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2014).

Lorsqu'elles arrivent aux poumons, les souches virulentes de *H. parasuis* parviennent à déjouer l'immunité innée en bloquant leur phagocytose par les macrophages alvéolaires porcins (PAM) (Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2014). Les interactions de *H. parasuis* avec les PAM seront vues plus en détails dans une prochaine section. L'inhibition de sa phagocytose, un retard dans l'activation des macrophages pulmonaires, la multiplication bactérienne, suivis d'une forte production de médiateurs de l'inflammation aux poumons seraient à l'origine des pneumonies et des dommages au parenchyme pulmonaire (Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013; Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2014). En effet, *H. parasuis* induit l'expression d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules épithéliales, ayant des effets pro-inflammatoires et chémoattractants pour les neutrophiles respectivement (Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2014). Les mécanismes impliqués dans le déclenchement de la pneumonie sont encore peu connus (Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2014).

### **2.4.2 Dissémination, inflammation et méningite**

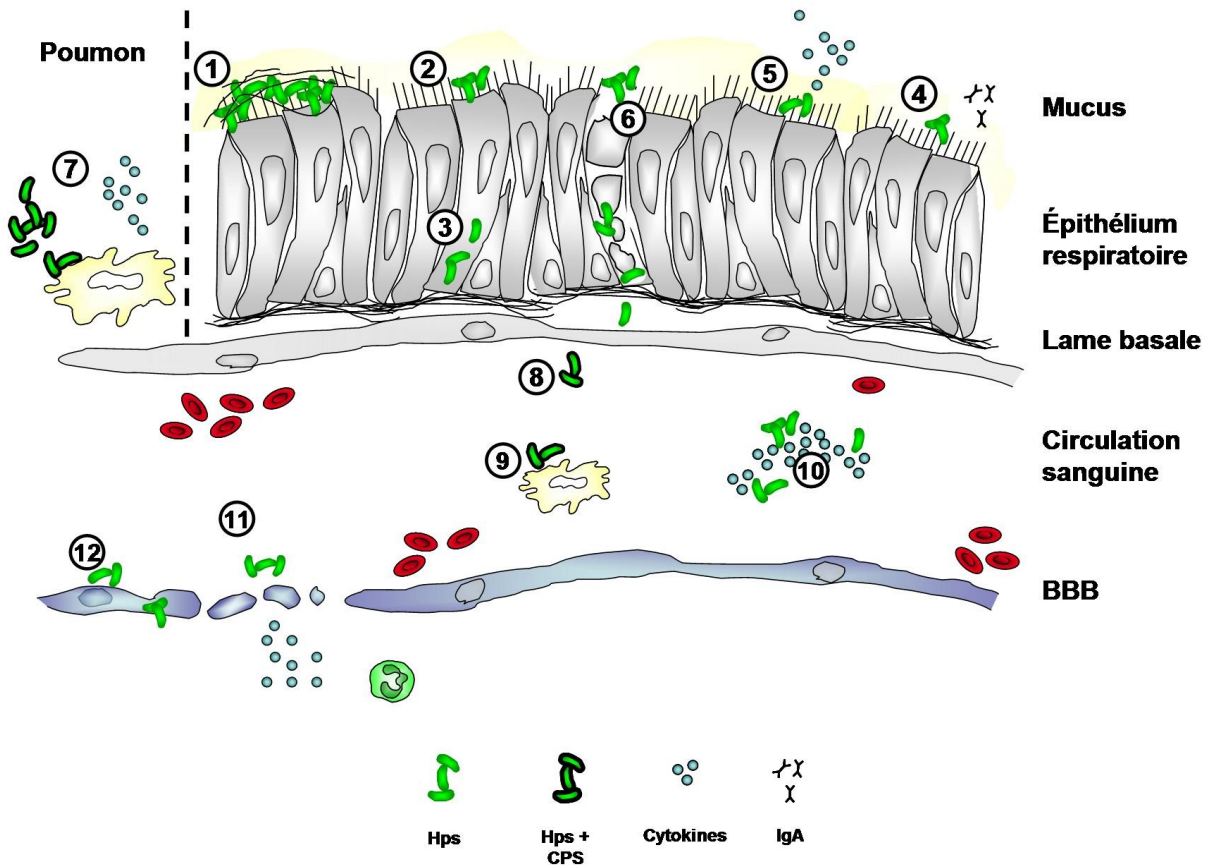
Lorsqu'elles parviennent à la circulation sanguine, les souches de *H. parasuis* isolées systématiquement peuvent résister à la déposition du complément à l'aide de leur CPS, de leur lipooligosaccharides (LOS) et de protéines de surface pour survivre dans le sang (Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013; Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2014). Ceci inhiberait donc leur opsonophagocytose, la capacité lytique induite par le complément et l'induction de l'inflammation (Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2014).

Tel que mentionné plus haut, la BBB est composée de PBMEC entourées de péricytes et de prolongements des astrocytes (Vanier *et al*, Microbiology, 2006). Puisque les PBMEC semblent constituer le premier site de rupture lors de la majorité des cas de méningites, les interactions de *H. parasuis* avec ces cellules ont été étudiées (Vanier *et al*, Microbiology, 2006). *H. parasuis* induit l'apoptose des PBMEC, sans être cytotoxique, suggérant qu'il pourrait modifier la perméabilité de la BBB afin de produire la méningite (Bouchet *et al*, Vet Res, 2008). *H. parasuis* adhère aux PBMEC, les envahit et survit dans ces cellules (Vanier *et al*, Microbiology, 2006). Puisque la quantité de bactéries intracellulaires diminue avec le temps, *H. parasuis* semble transiter par les cellules endothéliales et sortir par exocytose comme il a été montré avec d'autres pathogènes, comme *Pasteurella multocida* avec les cellules endothéliales aortiques bovines (Vanier *et al*, Microbiology, 2006). L'invasion des PBMEC par *H. parasuis* varie selon le sérotype; les sérotypes virulents 4 et 5 ayant une meilleure capacité d'invasion que les sérotypes considérés comme non-virulents, bien que ces derniers adhèrent mieux à ces cellules (Vanier *et al*, Microbiology, 2006, Aragon *et al*, Vet J,

2010). *H. parasuis* induit le relâchement d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules endothéliales modifiant la perméabilité de la BBB, ceci serait dû, seulement en partie, aux LOS (Bouchet *et al*, Vet Res, 2008).

Les souches virulentes de *H. parasuis* pouvant persister dans le sang sont donc libres d'aller causer des réactions inflammatoires exagérées et ainsi produire de l'arthrite, des méningites et la polysérosite, soit la maladie de Glässer, tandis que les souches non-virulentes seront phagocytées facilement (MacInnes & Desrosiers, Can J Vet Res, 1999; Olvera *et al*, Vet J, 2007; Oliveira & Pijoan, Vet Microbiol, 2004). Il peut aussi causer des morts subites, de l'anorexie, de la léthargie, des difficultés à respirer, de la toux, de la fièvre, des avortements spontanés, des péricardites et des péritonites. *H. parasuis* produit des pétéchies, des hémorragies et des thromboses rénales, pulmonnaires et hépatiques dues aux LOS (Amano *et al*, J Vet Med Sci, 1997; MacInnes & Desrosiers, Can J Vet Res, 1999; Oliveira & Pijoan, Vet Microbiol, 2004). La Figure 2 résume la pathogenèse de *H. parasuis*.





**Figure 2. Hypothèse de la pathogénèse de *Haemophilus parasuis*.** 1) *H. parasuis* colonise les voies respiratoires supérieures et produit un biofilm. 2) Il peut adhérer et 3) envahir les cellules épithéliales du tractus respiratoire. 4) *H. parasuis* dégrade les IgA du mucus. 5) Il induit la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales et leur 6) apoptose. 7) Aux poumons, *H. parasuis* cause la pneumonie en résistant à la phagocytose, se multipliant et en causant l'inflammation. 8) Les souches produisant une capsule (CPS) résistent au killing et à la 9) phagocytose dans le sang. 10) Il peut donc produire une bactériémie avec le relâchement de cytokines pro-inflammatoires menant à une septicémie, à l'arthrite et à la sérosite, typiques de la maladie de Glässer. 11) À la barrière hémato-encéphalique (BBB), *H. parasuis* induit la production de cytokines pro-inflammatoires et chémoattractantes pour les neutrophiles. Il induit aussi l'apoptose des cellules de la BBB, en plus de pouvoir y 12) adhérer et les envahir. Ces mécanismes pourraient permettre à la bactérie de causer des dommages tissulaires au cerveau, menant à la méningite. (Adaptée de Doran *et al*, Acta Neuropathol, 2016).

### **3. Les cellules épithéliales de la trachée**

#### **3.1 Généralités**

Les cellules épithéliales forment l'interface entre les muqueuses de l'hôte et l'environnement. Des jonctions serrées entre les cellules font de cette structure une barrière physique limitant les échanges ainsi que l'entrée de microorganismes pathogènes. Puisque *S. suis* et *H. parasuis* colonisent les amygdales et les cavités nasales des porcs et que leur principale voie d'entrée est le tractus respiratoire, leurs interactions avec les cellules épithéliales de la voie respiratoire ont un rôle central dans l'initiation de la maladie (Norton *et al*, FEMS Immunol Med Microbiol, 1999; Lalonde *et al*, Microbiology, 2000).

#### **3.2 Interactions de *S. suis* avec les cellules épithéliales**

Afin d'induire la maladie, *S. suis* doit traverser la barrière épithéliale pour se rendre à la circulation sanguine et se disséminer vers les organes cibles. Il a été suggéré que ce processus se déroule en plusieurs étapes, soient l'adhésion aux cellules épithéliales puis leur invasion afin de pénétrer la barrière respiratoire. Dans certains cas, le relâchement de molécules cytotoxiques pourrait permettre la rupture de la barrière épithéliale et le passage de la bactérie. Un résumé des interactions de *S. suis* avec les cellules épithéliales est illustré à la Figure 3A.

### **3.2.1 Adhésion de *S. suis* aux cellules épithéliales**

La première étape afin de coloniser l'hôte et initier l'infection est une étape d'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales. *S. suis* adhère à différents types de cellules épithéliales, et il est à noter que les souches virulentes ont tendance à adhérer plus aux cellules épithéliales Hep-2 que les souches moins virulentes (Norton *et al*, FEMS Immunol Med Microbiol, 1999; Lalonde *et al*, Microbiology, 2000). L'adhésion de *S. suis* sérotype 2 aux cellules épithéliales pulmonaires humaines A549, épithéliales du col utérin humain (HeLa), épithéliales du plexus choroïdien, ainsi qu'aux cellules épithéliales rénales canines (MDCK) et porcines (PK15 et LLC-PK1) a été confirmée (Lalonde *et al*, Microbiology, 2000; Tenenbaum *et al*, Brain Res, 2006). Cette adhésion est dépendante du temps et de la concentration bactérienne utilisée (Lalonde *et al*, Microbiology, 2000). Pour ce qui est du tractus respiratoire, *S. suis* adhère aux cellules épithéliales de la trachée (NPTr) et aux cellules épithéliales humaines du larynx (Hep-2) (Wang *et al*, Infect Immun, 2013; Li *et al*, Vet Microbiol, 2013).

Lorsque l'adhésion de souches de *S. suis* isolées de porcs à différentes lignées de cellules épithéliales de différentes origines est testée, elles adhèrent mieux aux cellules porcines que des souches isolées de cas cliniques humains (Ferrando *et al*, J Infect Dis, 2015).

#### **3.2.1.1 Rôle de la CPS de *S. suis* sur son adhésion aux cellules épithéliales**

La CPS de *S. suis* intervient dans l'adhésion de *S. suis* aux cellules épithéliales puisque le mutant non encapsulé de sérotype 2 adhère significativement plus à tous les types de

cellules épithéliales testées (Lalonde *et al*, Microbiology, 2000; Benga *et al*, Cell Microbiol, 2004). Ceci s'explique par le fait que la CPS masquerait les protéines impliquées dans l'adhésion de *S. suis* aux cellules épithéliales, illustré par un plus haut niveau d'adhésion observé lorsqu'elle est absente (Lalonde *et al*, Microbiology, 2000). *S. suis* pourrait moduler *in vivo* l'expression de sa CPS afin de modifier ses interactions avec les cellules épithéliales, particulièrement en fonction des conditions environnementales (Lalonde *et al*, Microbiology, 2000; Benga *et al*, Cell Microbiol, 2004). En effet, bien qu'aucune preuve de cette modulation *in vivo* n'existe, la diminution de l'expression de sa CPS permettrait d'augmenter l'adhésion de *S. suis* aux cellules épithéliales lors de la colonisation, puis, lors de son passage dans la circulation sanguine, l'expression de la CPS permettrait la protection contre le système immunitaire (Lalonde *et al*, Microbiology, 2000). De la paroi bactérienne purifiée ajoutée lors des tests montre que l'adhésion de *S. suis* aux cellules épithéliales porcines est hautement inhibée, ce qui suggère que les adhésines impliquées sont cachées en partie par la CPS (Lalonde *et al*, Microbiology, 2000; Benga *et al*, Cell Microbiol, 2004; Wang *et al*, Infect Immun, 2013). Le LTA et le peptidoglycane ne semblent pas impliqués dans l'adhésion de *S. suis* aux NPTr (Wang *et al*, Infect Immun, 2013). Cependant, des études en utilisant des composants purifiés doivent être effectuées pour confirmer cette hypothèse.

### **3.2.1.2 Rôle des protéines bactériennes dans l'adhésion de *S. suis* aux cellules épithéliales**

Plusieurs protéines ont un rôle dans l'adhésion de *S. suis* aux cellules, l'effet de redondance pourrait donc compenser l'effet des protéines dans des mutants individuels

isogéniques déficients en ces protéines (Roy *et al*, Microb Pathog, 2014). Plusieurs protéines de surface ont tout de même été identifiées comme ayant un rôle pour l'adhésion de *S. suis* aux cellules épithéliales, telles que la protéine ApuA, l'énolase liant le fibrinogène, la glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (GAPDH), la 6-phosphogluconate-déhydrogénase (6-PGD), la sortase A, l'amylopullulanase, l'autolysine et la glutamine synthétase (Wang *et al*, Infect Immun, 2013; Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012; Segura *et al*, FEBS Lett, 2016). L'IgA protéase de *S. suis* lui permettrait aussi de dégrader les IgA et de recruter à sa surface les fragments Fab lui permettant d'adhérer aux cellules épithéliales par hydrophobicité (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012).

À la surface de *S. suis*, la protéine DnaJ, la protéine chaperone la plus abondante issue de l'opéron DnaK, participe à cette adhésion puisque l'ajout de sérum anti-DnaJ et que la délétion du gène codant la protéine DnaJ diminue l'adhésion de *S. suis* aux cellules épithéliales humaines du larynx (Hep-2) lorsque comparée à la souche sauvage (Zhang *et al*, J Microbiol Biotechnol, 2015). DnaJ permet le repliement des protéines en situation de stress par la chaleur, et est donc plus exprimée à température élevée (Zhang *et al*, J Microbiol Biotechnol, 2015). L'adhésion de *S. suis* sérotype 2 augmente aussi suite à un stress à la chaleur, mais cette augmentation est inhibée par du sérum anti-DnaJ, montrant l'implication de cette protéine dans l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales (Zhang *et al*, J Microbiol Biotechnol, 2015). Les protéines Cbp40, liant le collagène, et Ssa, liant la fibronectine, sont aussi impliquées dans les interactions de *S. suis* sérotype 2 avec les cellules épithéliales puisque des mutants isogéniques déficients de ces protéines ont une capacité diminuée d'adhésion aux cellules Hep-2 comparativement à la souche sauvage (Li *et al*, Vet

Microbiol, 2013; Zhang *et al*, Vet J, 2013). La protéine *Surface Antigen One* (SAO) est présente à la surface bactérienne et ce, sur la plupart des souches de *S. suis*, mais ne semble pas avoir de rôle dans les interactions de *S. suis* avec les cellules de l'hôte (Roy *et al*, Microb Pathog, 2014).

La phosphodiesterase GdpP dégrade l'adénosine monophosphate cyclique qui constitue une voie de signalisation intracellulaire importante chez *S. suis* (Du *et al*, Microbiol Res, 2014). D'autre part, Tran est un facteur de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du sucre chez *S. suis* (Li *et al*, Microbiol Res, 2014). Lorsque ces protéines sont mutées, l'adhésion de *S. suis* aux cellules épithéliales est diminuée (Du *et al*, Microbiol Res, 2014; Li *et al*, Microbiol Res, 2014). L'adhésion de *S. suis* sérotype 2 aux cellules épithéliales est diminuée de plus de 85 % lorsqu'un mutant isogénique déficient de NisK/NisR est utilisé, en comparaison à la souche sauvage (Xu *et al*, Microbiol Res, 2014). Un autre système à deux composantes, CiaR/CiaH, jouant un rôle dans la régulation de processus essentiels cellulaires et dans l'adaptation à l'environnement, est aussi impliqué dans l'adhésion de *S. suis* aux cellules épithéliales (Li *et al*, Vet Microbiol, 2011). Ces résultats suggèrent que lorsque *S. suis* est localisé dans un environnement hostile, ces régulateurs permettent l'implantation de la bactérie par l'adhésion aux cellules de l'hôte.

### **3.2.1.3 Rôle de la sulysine**

La SLY pourrait aussi être impliquée dans l'adhésion de *S. suis* aux cellules épithéliales, les résultats sont cependant controversés (Seitz *et al*, Vet Microbiol, 2013;

Tenenbaum *et al*, Future Microbiol, 2016). Des études portant sur l'effet de la SLY sur les interactions avec des cellules épithéliales d'origines différentes ont été faites et il a été démontré que certaines souches hautement virulentes produisant la SLY adhéraient plus aux cellules épithéliales que des souches ne produisant pas la SLY (Norton *et al*, FEMS Immunol Med Microbiol, 1999; Tenenbaum *et al*, Future Microbiol, 2016). La SLY permettrait la formation d'ondulations dans la membrane cellulaire qui augmenteraient la surface de contact avec la bactérie, et ainsi ses interactions avec celle-ci (Tenenbaum *et al*, Future Microbiol, 2016). Ainsi, les souches produisant la SLY seraient plus aptes à adhérer et à coloniser les cellules épithéliales (Tenenbaum *et al*, Future Microbiol, 2016). Il a aussi été démontré qu'un mutant non encapsulé adhère plus aux cellules épithéliales que la souche sauvage et qu'un double mutant de la CPS et de la SLY adhère moins que le simple mutant non encapsulé (Seitz *et al*, Vet Microbiol, 2013). Cependant, ces résultats n'ont pas été observés avec toutes les cellules épithéliales utilisées, et les mécanismes exacts par lesquels la SLY augmenterait l'adhésion aux cellules épithéliales des voies respiratoires sont encore méconnus (Tenenbaum *et al*, Future Microbiol, 2016)

### **3.2.2 Invasion des cellules épithéliales par *S. suis***

Une autre étape qui pourrait avoir un rôle important dans la pathogenèse de *S. suis* est l'invasion des cellules épithéliales. L'invasion des cellules épithéliales par *S. suis* est toutefois controversée puisque les observations en lien avec ces interactions sont inconstantes selon les différentes publications. Alors qu'une étude montre que *S. suis* n'est pas capable d'envahir les cellules épithéliales, qu'elle soit encapsulée ou non, celle publiée par Norton *et al* en 1999

montre que *S. suis* serait capable d'envahir d'autres cellules épithéliales et que des souches virulentes isolées du SNC seraient plus invasives que les non-virulentes, bien que l'invasion des cellules épithéliales reste un événement rare (Norton *et al*, FEMS Immunol Med Microbiol, 1999; Lalonde *et al*, Microbiology, 2000). Benga *et al*. (2004) ont comparé l'invasion de plusieurs types cellulaires par différentes souches de *S. suis* sérotype 2 et des souches non-typables. Ils n'ont cependant pas pu constater que les souches virulentes envahissaient plus les cellules de l'hôte que les non-virulentes (Benga *et al*, Cell Microbiol, 2004). Seules les souches non-typables n'exprimant pas de CPS, contrairement aux souches de sérotype 2 bien encapsulées, seraient capables d'envahir les Hep-2, les cellules épithéliales pulmonaires porcines A549 et les cellules épithéliales testiculaires porcines ST; les souches de sérotypes 2 ayant une capacité d'invasion faible (Benga *et al*, Cell Microbiol, 2004). Tout comme pour l'adhésion aux cellules épithéliales, ces observations suggèrent que *S. suis* module l'expression de sa CPS pour interagir avec les cellules épithéliales de l'hôte (Benga *et al*, Cell Microbiol, 2004; Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012). Lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu de culture pauvre, la capacité d'invasion de *S. suis* est augmentée, suggérant que l'environnement dans lequel se trouve la bactérie a un impact sur l'expression de facteurs de virulence impliqués dans l'invasion, notamment sur celle de la CPS (Benga *et al*, Cell Microbiol, 2004). L'observation des cellules épithéliales infectées avec *S. suis* par microscopie électronique et confocale montre que les bactéries internalisées sont présentes en petit nombre au niveau de vacuoles semblables à des phagolysosomes (Benga *et al*, Cell Microbiol, 2004).

De plus, les résultats obtenus lors des tests d'invasion sont inconstants puisque *S. suis* est toxique pour les cellules épithéliales et que les antibiotiques servant à tuer les bactéries



extracellulaires pourrait détruire du même coup les bactéries internalisées dans la monocouche altérée de cellules (Norton *et al*, FEMS Immunol Med Microbiol, 1999). Cette toxicité serait due à la SLY (Norton *et al*, FEMS Immunol Med Microbiol, 1999; Lalonde *et al*, Microbiology, 2000; Benga *et al*, Cell Microbiol, 2004). La SLY serait aussi impliquée dans l'invasion des Hep-2 puisqu'un double mutant déficient de la CPS et de la toxine envahit moins ces cellules qu'un mutant simple de la CPS (Seitz *et al*, Vet Microbiol, 2013). Comme pour l'adhésion, des souches virulentes produisant la SLY envahissaient plus les cellules épithéliales que celles n'en produisant pas (Tenenbaum *et al*, Future Microbiol, 2016). Il a aussi été observé que le double mutant n'induit pas d'ondulation de la membrane cellulaire au point de contact contrairement à la souche produisant de la SLY (Seitz *et al*, Vet Microbiol, 2013). Ces résultats suggèrent que la SLY, en plus d'aider à l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales et à briser la barrière par toxicité, agirait sur le cytosquelette afin de permettre l'invasion des cellules de l'hôte (Lalonde *et al*, Microbiology, 2000; Seitz *et al*, Vet Microbiol, 2013).

Certaines protéines de surface semblent avoir un lien dans l'invasion des cellules épithéliales. La protéine Ssa, liant la fibronectine (composant important de la matrice extracellulaire) ainsi que les cellules épithéliales, est impliquée dans l'invasion des Hep-2 par *S. suis* sérotype 2 (Li *et al*, Vet Microbiol, 2013). *S. suis* recruterait la fibronectine via Ssa afin d'interagir avec les cellules épithéliales et de permettre son entrée dans la cellule (Li *et al*, Vet Microbiol, 2013). La mutation de NisK/R chez *S. suis* diminuerait également de plus de 90 % l'invasion des cellules épithéliales par la bactérie (Xu *et al*, Microbiol Res, 2014).

Les interactions de *S. suis* avec les cellules épithéliales porcines du plexus choroïde (PCPEC) ont été étudiées et des lésions au niveau du plexus choroïde ont été observées lors d'infections expérimentales, ces lésions pouvant faciliter la traversée de cette barrière par la bactérie (Tenenbaum *et al*, Brain Res, 2006). *S. suis* peut adhérer aux PCPEC et les envahir (Tenenbaum *et al*, Brain Res, 2006). Certaines souches sont aussi cytotoxiques pour ces cellules et induisent leur apoptose, observée par la condensation et la fragmentation de leur ADN (Tenenbaum *et al*, Brain Res, 2006). Les résultats suggèrent donc que *S. suis* augmente la perméabilité de la BBB par apoptose et nécrose des cellules de cette barrière, puis, que la nécrose de ces cellules induit l'inflammation et des dommages tissulaires au niveau du cerveau (Tenenbaum *et al*, Brain Res, 2006).

### **3.2.3 Modulation de l'expression de médiateurs de l'inflammation**

*S. suis* induit la production de cytokines par les cellules épithéliales. Les cellules NPTr infectées avec *S. suis* expriment de hauts niveaux d'IL-8, de l'IL-6 et du CCL5 (Wang *et al*, Infect Immun, 2013; Dang *et al*, BMC Vet Res, 2014). Les cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 et IL-8 pourraient mener à l'augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale, facilitant le passage de la bactérie.

### 3.3 Interactions de *H. parasuis* avec les cellules épithéliales

#### 3.3.1 Adhésion et invasion des cellules épithéliales par *H. parasuis*

Les interactions de *H. parasuis* avec les cellules épithéliales ont été étudiées, et sont résumées à la Figure 3B. Il a été démontré que *H. parasuis* peut adhérer aux cellules épithéliales rénales et les envahir (Frاندoloso *et al*, Vet Microbiol, 2012; Fu *et al*, Res Vet Sci, 2012). Le phénomène d'invasion n'a pas été observé, par contre, avec des cellules épithéliales respiratoires porcines (Bouchet *et al*, Microb Pathog, 2009).

*H. parasuis* est connu pour induire l'apoptose des NPTr à hautes concentrations, bien qu'il soit non-toxique pour ces cellules (Bouchet *et al*, Microb Pathog, 2009). La bactérie induit la formation de projections de la membrane cellulaire des cellules épithéliales rénales porcines (PK-15) et on la retrouve en contact à ces projections lors des tests d'adhésion (Frاندoloso *et al*, Vet Microbiol, 2012). *H. parasuis* pourrait donc se servir de ce mécanisme pour augmenter son adhésion aux cellules épithéliales (Frاندoloso *et al*, Vet Microbiol, 2012). La capacité d'adhésion et d'invasion semble être en lien avec la virulence de la souche utilisée. En effet, la souche virulente Nagasaki de sérotype 5 adhère et envahit plus les PK-15 que la souche non-virulente SW114, celle-ci étant incapable d'envahir les PK-15 (Frاندoloso *et al*, Vet Microbiol, 2012). L'adhésion de *H. parasuis* aux cellules pourrait être due, du moins en partie, aux heptoses des LOS puisque des mutants déficients des gènes (*rfaE*, *opsX* et *rfaF*) impliqués dans la biosynthèse des LOS, adhèrent et envahissent moins les cellules épithéliales que les souches parentales (Xu *et al*, Vet J, 2013; Zhang *et al*, Microb Pathog,

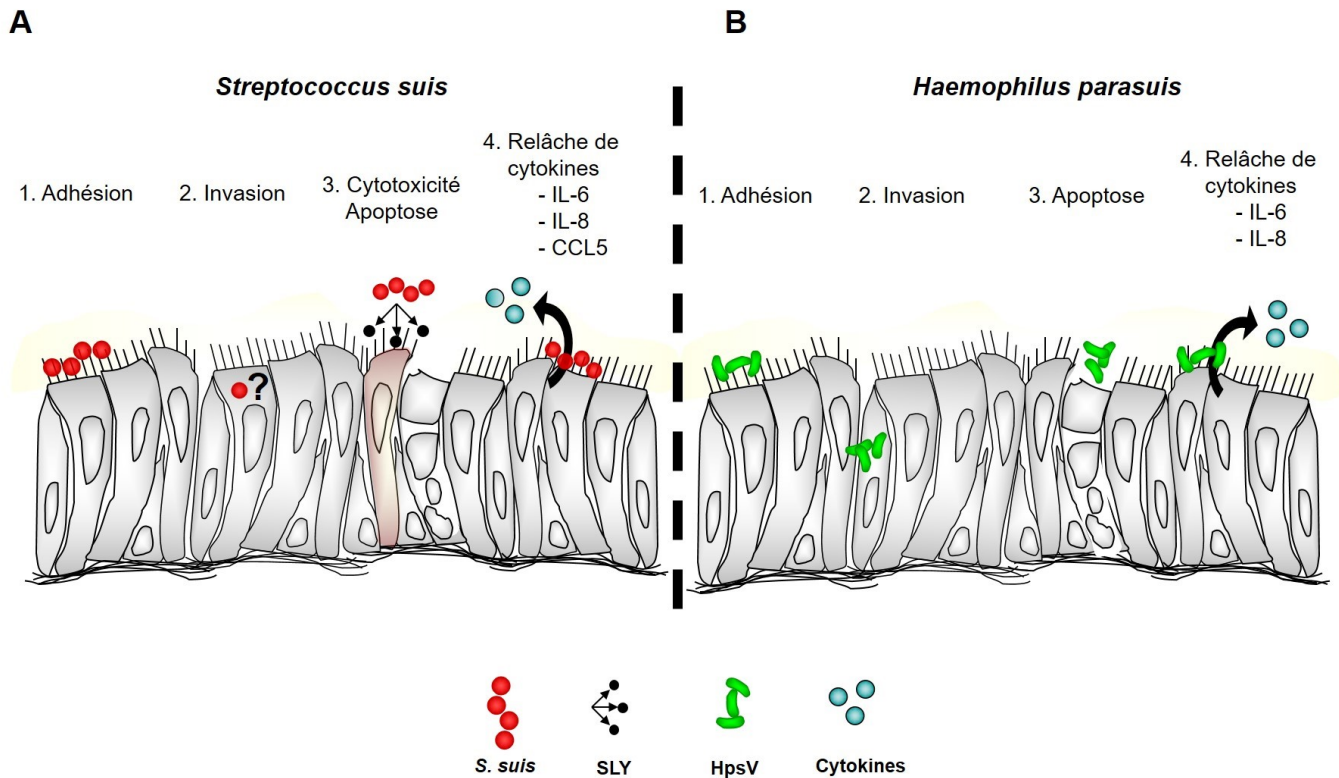
2014). Ces mutants ont également une capacité d'invasion diminuée, ce qui suggère que les LOS sont nécessaires aux interactions entre *H. parasuis* et les cellules épithéliales (Xu *et al*, Vet J, 2013). Pourtant, la souche Nagasaki, bien qu'elle adhère aux NPTr, ne les envahit que faiblement (Auger *et al*, Infect Immun, 2009). Tout comme pour *S. suis*, l'invasion des cellules épithéliales par *H. parasuis* est controversée, et pourrait dépendre de l'origine cellulaire (Auger *et al*, Infect Immun, 2009; Bouchet *et al*, Microb Pathog, 2009; Frandoloso *et al*, BMC Vet Res, 2013; Lacouture *et al*, Can Vet J, 2017).

Certaines protéines semblent avoir un rôle dans l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales par *H. parasuis*. La 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGD) est une enzyme impliquée dans le métabolisme du glucose qui se trouve à la surface de la bactérie et qui pourrait avoir un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales (Fu *et al*, Res Vet Sci, 2012). Le système de toxine *cytolethal distending toxin* (CDT) est composé de 3 sous-unités et est connu pour bloquer le cycle cellulaire, mener à la mort cellulaire et médier l'adhésion et l'invasion à des cellules en culture (Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2012). L'adhésion et l'invasion des PK-15 par *H. parasuis* sont diminuées lorsqu'on utilise des mutants déficients des sous unités CdtA et CdtB, et sont encore davantage diminuées lorsqu'on utilise un double mutant en comparaison avec la souche parentale (Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2012). Par ailleurs, la protéine de surface OmpP2, impliquée dans l'adhésion aux PAM, semble aussi avoir un rôle dans les interactions d'*H. parasuis* avec les cellules épithéliales. Lorsqu'un mutant déficient dans la production de la protéine a été évalué, l'adhésion aux cellules épithéliales ainsi que leur invasion par la bactérie sont augmentées comparativement à la souche parentale; par contre, l'ajout de la protéine purifiée aux cellules lors de tests diminue la

capacité d'adhésion et d'invasion d'*H. parasuis*, suggérant qu'elle participe à ces interactions (Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2013). Ces résultats contradictoires s'expliquent par le fait que OmpP2 est la protéine la plus abondante à la surface de la bactérie, cette dernière modifie donc l'expression des autres protéines de surface afin de s'adapter lors de la mutation, comme le démontre une analyse quantitative protéomique (Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2013). Lorsque la protéine OmpP2 est absente, il y a une augmentation de l'expression de l'ADP-L-glycerol-D-mannoheptose-6-epimerase (RfaD) et de la thymidylate synthase (ThyA) qui participent aussi à l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales par *H. parasuis* (Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2013). Ces protéines participent donc à l'adhésion et à l'invasion des cellules épithéliales par *H. parasuis*.

### **3.3.2 Modulation de l'expression de médiateurs de l'inflammation**

*H. parasuis* induit la production de médiateurs de l'inflammation par les cellules épithéliales alvéolaires porcines (Fu *et al*, Res Vet Sci, 2012). *H. parasuis* pourrait donc causer des dommages tissulaires en induisant la production d'IL-6 et d'IL-8, ayant un rôle dans l'inflammation aigue et dans l'attraction massive de neutrophiles aux poumons respectivement. Ceci permettrait à *H. parasuis* de traverser la barrière épithéliale au niveau du tractus pulmonaire et causer la maladie (Fu *et al*, Res Vet Sci, 2012). La protéine 6PGD participe à l'induction de la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales alvéolaires porcines puisqu'un mutant de la protéine induit une moins forte production d'IL-6 et d'IL-8 que la souche parentale (Fu *et al*, Res Vet Sci, 2012).



**Figure 3. Résumé des interactions de *S. suis* et *H. parasuis* avec les cellules épithéliales.**  
 A) *S. suis* adhère (1), envahit faiblement ou non (2) et induit le relâchement de cytokines pro-inflammatoires (4) par les cellules épithéliales. Il induit aussi leur apoptose et il peut être cytotoxique pour ces cellules par la relâche de suilysine (SLY), bien que toutes les souches ne produisent pas la toxine (3). B) *H. parasuis* adhère (1) et envahit (2) les cellules épithéliales. Elle induit aussi leur apoptose (3) et la production d'IL-6 et d'IL-8 (4). Légende : HpsV, *H. parasuis*; IL, interleukine. (Adaptée de Doran *et al*, Acta Neuropathol, 2016).

## 4. Macrophages et macrophages alvéolaires

### 4.1 Généralités et origine

Les macrophages sont des cellules mononucléées du sang dérivées des précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse et dont la fonction principale est la phagocytose de débris cellulaires infectés ou apoptotiques, de particules et des agents pathogènes (Bieber & Autenrieth, Immunobiology, 2015). Ils sont aussi des régulateurs de l'inflammation par le relâchement de cytokines en plus d'avoir un rôle dans l'homéostasie et la réparation des tissus (Ezquerro *et al*, Dev Comp Immunol, 2009; Bieber & Autenrieth, Immunobiology, 2015; Weiss & Schaible, Immunol Rev, 2015). Les macrophages participent à l'immunité innée grâce à leurs *Toll Like Receptor* (TLR) ainsi qu'à l'immunité acquise par la présentation des antigènes et la sécrétion de cytokines (Bieber & Autenrieth, Immunobiology, 2015; Weiss & Schaible, Immunol Rev, 2015).

Les cellules souches de la moelle osseuse se différencient en progéniteurs myéloïdes, puis en monocytes circulant du sang (Ezquerro *et al*, Dev Comp Immunol, 2009). Ceux-ci sont recrutés aux tissus où ils se différencient en macrophages avec des fonctions spécifiques selon leur localisation (Bieber & Autenrieth, Immunobiology, 2015). Les PAM sont les macrophages résidents de l'espace alvéolaire du parenchyme pulmonaire. Ils constituent donc la première ligne de défense phagocytaire que doivent traverser les pathogènes et les particules en provenance de la voie respiratoire (Weiss & Schaible, Immunol Rev, 2015). Les PAM régulent l'inflammation dans les poumons et ont des capacités phagocytaires, anti-tumorales et

chimiotactiques, et possèdent donc un grand nombre de vacuoles et de mitochondries (Fels & Zanvil, J Appl Physiol, 1986). Les PAM représentent une population très hétérogène (Fels & Zanvil, J Appl Physiol, 1986). On reconnaît les macrophages porcins au FACS à l'aide d'une combinaison de marqueurs de surface qui diffèrent selon la localisation des macrophages (Piriou-Guzylack & Salmon, Vet Res, 2008). Ainsi, certains marqueurs sont présents (SWC3<sup>+</sup>, SWC1<sup>+/-</sup>, CD14<sup>Faible</sup>, CMHII<sup>+</sup>, SWC9<sup>+</sup> et CD163<sup>+</sup>) ou absents (CD6, wCD11R1 et SWC8) sur les macrophages porcins, alors que certains marqueurs sont exprimés différemment à la surface des PAM, tels CD72 et CD203 (Piriou-Guzylack & Salmon, Vet Res, 2008).

## **4.2 Phagocytose et activation**

Les macrophages sont normalement présents au repos dans les tissus, ayant une capacité de phagocytose basale (Weiss & Schaible, Immunol Rev, 2015). Lorsqu'ils sont activés par les agents pathogènes, reconnus par des récepteurs de patrons moléculaires associés aux pathogènes tels les TLR, leurs pouvoirs de phagocytose, de destruction et inflammatoire sont augmentés (Weiss & Schaible, Immunol Rev, 2015). Ils peuvent donc phagocyter les agents pathogènes plus facilement et les détruire dans leurs phagosomes. Ainsi, les antigènes de l'agent pathogène capturé sont apprêtés et présentés à la surface des macrophages sur les SLA de classe II, ce qui permettra l'enclenchement de l'immunité acquise par l'activation des cellules T (Weiss & Schaible, Immunol Rev, 2015). L'activation des macrophages induit aussi une production accrue de cytokines et une modulation de la présence des molécules et récepteurs à leur surface (Weiss & Schaible, Immunol Rev, 2015).



### **4.3 Interaction de *S. suis* avec les macrophages et les macrophages alvéolaires porcins**

Plusieurs études portent sur les interactions de *S. suis* avec des macrophages d'origine humaine et murine. Par contre, peu d'études ont été effectuées avec des cellules d'origine porcine. La CPS de *S. suis* lui permet d'échapper à la phagocytose par les macrophages, tout en lui permettant de s'y attacher. Un résumé des interactions de *S. suis* avec les macrophages alvéolaires est illustré à la Figure 6A.

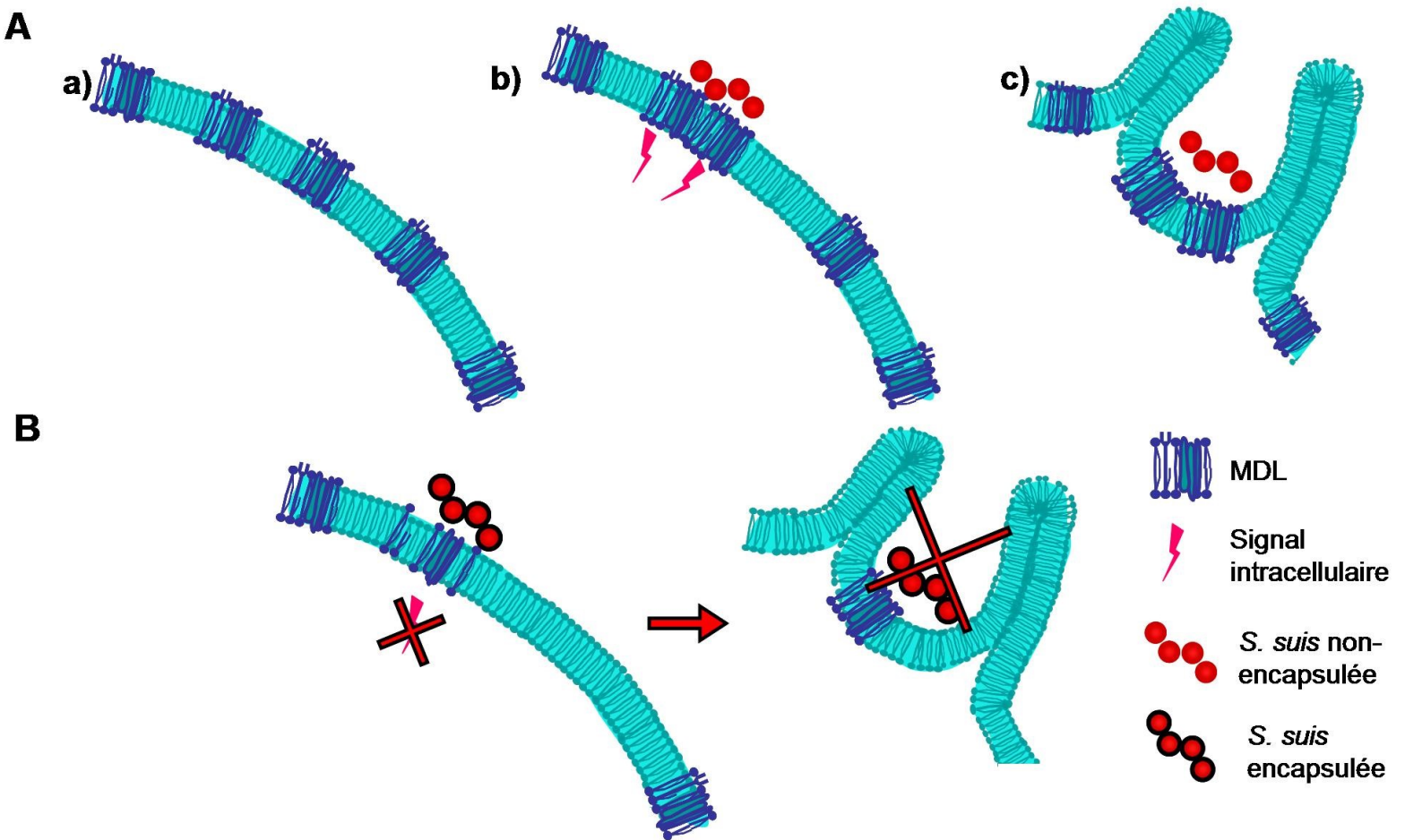
#### **4.3.1 Adhésion aux macrophages**

*S. suis* adhère aux macrophages murins (Segura & Gottschalk, Infect Immun, 2002). Son adhésion augmente avec la concentration de bactérie et le temps d'infection (Segura & Gottschalk, Infect Immun, 2002). Le SA de la CPS de *S. suis*, serait responsable de cette adhésion puisque, le prétraitement de *S. suis* avec une sialidase ou des macrophages avec du SA purifié diminue cette adhésion (Segura & Gottschalk, Infect Immun, 2002). L'adhésion n'est pas modulée par d'autres composants bactériens comme la paroi bactérienne ou du LTA (Segura & Gottschalk, Infect Immun, 2002). Une augmentation de l'adhésion de *S. suis* aux macrophages murins est observée lorsque la bactérie est opsonisée avec du sérum, ce qui suggère la présence d'un mécanisme d'adhésion indirect impliquant des composantes du sérum comme intermédiaires (Segura & Gottschalk, Infect Immun, 2002). L'adhésion de *S. suis* aux macrophages serait donc assurée par le SA, les adhésines ainsi que par un mécanisme indirect de liaison impliquant des protéines du sérum.

### **4.3.2 Résistance à la phagocytose**

*S. suis* est très peu phagocyté par les macrophages et ne survit pas à l'intérieur de ceux-ci. Des mutants déficients de la CPS sont facilement phagocytés et détruits par les macrophages murins et les PAM contrairement aux souches encapsulées, et un prétraitement des macrophages avec de la CPS purifiée prévient leur phagocytose (Smith *et al*, Infect Immun, 1999; Segura *et al*, Infect Immun, 2004; de Greeff *et al*, Vet Microbiol, 2010; Lecours *et al*, Microbes Infect, 2012; Roy *et al*, Microb Pathog, 2014). De plus, plus la production de CPS par *S. suis* est importante, plus la phagocytose est inhibée, suggérant donc que la CPS est responsable de la résistance à la phagocytose (Brazeau *et al*, Microbiology, 1996; Lecours *et al*, Microbes Infect, 2012). L'attachement de *S. suis* aux macrophages ne se résulte pas en l'internalisation de la bactérie (Segura & Gottschalk, Infect Immun, 2002), ce qui va à l'encontre de l'hypothèse qui avait autrefois été formulée stipulant que *S. suis* évitait la phagocytose grâce à la charge de sa CPS. De plus, la présence du complément, contrairement au sérum, n'a pas d'effet sur la phagocytose de *S. suis* par les macrophages (Brazeau *et al*, Microbiology, 1996). Des études sur les voies de signalisations intracellulaires ont démontré que les souches encapsulées de *S. suis* n'activent pas la voie de phosphatidylinositol 3-kinase (PI-K3) et de ses effecteurs secondaires, la protéine kinase C (PKC) et Akt, dans les macrophages murins contrairement aux mutants déficients de la CPS (Segura *et al*, Infect Immun, 2004). La voie PI-K3 est impliquée dans le réarrangement du cytosquelette lors de la phagocytose ainsi que dans l'activation des macrophages et est parfois utilisée par les agents pathogènes afin de permettre leur internalisation (Segura *et al*, Infect Immun, 2004). L'utilisation d'inhibiteurs de PI-K3 et PKC inhibe partiellement la phagocytose des mutants

non-encapsulés (Segura *et al*, Infect Immun, 2004). Ces résultats suggèrent que la CPS de *S. suis* module sa phagocytose par les macrophages en inhibant partiellement ces voies de signalisation intracellulaires (Segura *et al*, Infect Immun, 2004) (Figure 4.).



**Figure 4. La capsule polysaccharidique de *S. suis* prévient sa phagocytose par les macrophages.** A) Des radeaux lipidiques contenant du lactosylceramide se retrouvent sur la membrane cellulaire des cellules phagocytaires et forment une plateforme de signalisation (a). Lorsque *S. suis* non-encapsulé s’y lie, les radeaux lipidiques se regroupent au point de contact du phagocyte et de la bactérie et un signal intracellulaire est enclenché avec la cascade de signalisation PI-K3 (b) permettant la phagocytose de la bactérie (c). B) La capsule de *S. suis* déstabilise et diminue l’accumulation des microdomaines lipidiques sur la membrane des macrophages au point de contact de *S. suis* et du phagocyte, ce qui lui permet d’échapper à la phagocytose. Légende : MDL, microdomaine lipidique.

Des tests effectués avec des billes de latex couplées à la CPS purifiée de *S. suis* sérotype 2 ont démontré que la CPS inhibe leur phagocytose par les macrophages murins (Houde *et al*, Infect Immun, 2012). De plus, il a été démontré qu'un prétraitement des macrophages avec des billes couplées à la CPS inhibe la phagocytose d'autres billes de latex exemptes de CPS, suggérant que la CPS de *S. suis* diminue la capacité de phagocytose des macrophages (Houde *et al*, Infect Immun, 2012).

L'équipe s'est donc intéressée aux mécanismes par lesquels *S. suis* évite sa phagocytose (Houde *et al*, Infect Immun, 2012). Pour se faire, ils ont testé l'effet de la CPS de *S. suis* sur la distribution des radeaux lipidiques contenant du Lactosyl Ceramide (LacCer) à la surface des phagocytes. Les radeaux lipidiques se retrouvent sur la membrane cellulaire et sont des plateformes de transduction de signal composées de sphingolipides et de cholestérol (Houde *et al*, Infect Immun, 2012). Les radeaux lipidiques contenant le LacCer, un glycosphingolipide, servent de récepteurs pour certaines bactéries et induisent des cascades de signalisation intracellulaire menant à la phagocytose de la bactérie (Houde *et al*, Infect Immun, 2012). Lorsque les macrophages sont incubés avec *S. suis* encapsulée, la distribution des radeaux lipidiques à leur surface devient irrégulière et la quantité de ces radeaux est diminuée comparativement à ceux infectés avec la souche non-encapsulée (Houde *et al*, Infect Immun, 2012) (Figure 2.). La CPS de *S. suis* prévient l'accumulation de LacCer et la signalisation intracellulaire découlant de sa liaison avec la bactérie est diminuée (Houde *et al*, Infect Immun, 2012). Le LacCer active la voie de PI-3K, et ces résultats coïncident avec ceux de Segura *et al* (Infect Immun, 2004) indiquant que cette voie est inhibée par la CPS de *S. suis*. La CPS de *S. suis* bloque la reconnaissance des patrons bactériens présents à sa surface par les récepteurs

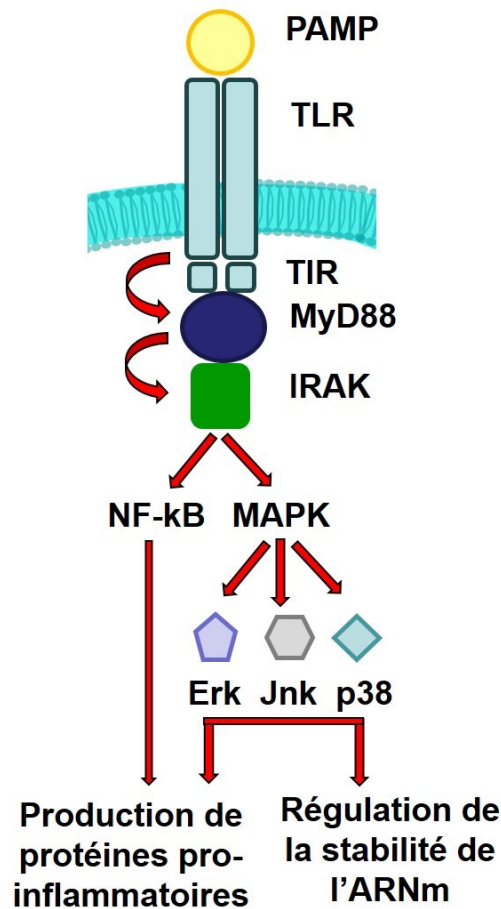
des macrophages et diminuerait leurs fonctions phagocytaires en prévenant l'accumulation de LacCer au point de contact de *S. suis* et du macrophage afin d'empêcher la signalisation intracellulaire menant à la phagocytose (Houde *et al*, Infect Immun, 2012).

D'autres protéines seraient aussi impliquées dans la résistance à la phagocytose de *S. suis* par les macrophages, tel que démontré par des études utilisant des mutants déficients en ces protéines. Les macrophages peuvent former des autophagosomes afin de capturer des bactéries intracellulaires et de les détruire à l'aide de dérivés réactifs de l'oxygène (Fang *et al*, Vet Microbiol, 2015). La superoxyde dismutase (SodA) est une protéine produite par *S. suis* qui lui permet de diminuer sa phagocytose et de survivre dans les autophagosomes, tout en diminuant la quantité de dérivés réactifs de l'oxygène et ainsi diminuer l'effet antimicrobien des autophagosomes (Fang *et al*, Vet Microbiol, 2015). Les protéines NisK et NisR forment un système à deux protéines senseur-régulateur qui régulent la transcription de différents gènes en réponse à des changements dans l'environnement de *S. suis* et contribuent à sa résistance à la phagocytose et à sa survie intracellulaire (Xu *et al*, Microbiol Res, 2014).

#### **4.3.3 Induction de l'expression de médiateurs de l'inflammation**

*S. suis* peut induire la production de cytokines et de médiateurs de l'inflammation par les macrophages. *S. suis* est reconnu à la surface des macrophages principalement par les TLR2, mais les TLR4, 6 et 9 seraient aussi impliqués dans sa reconnaissance (Rong *et al*, PLoS One, 2012; Segura M., Can J Microbiol, 2012). Les TLR2 et TLR4 en association avec le CD14 reconnaissent des composantes de la paroi cellulaire de *S. suis*, ce qui active la

cascade Myd88, menant à la translocation de NF- $\kappa$ B au noyau et à l'expression de cytokines (Graveline *et al*, Int Immunol, 2007). L'utilisation de macrophages provenant de souris déficientes en TLR2 et MyD88 réduit grandement cette production de cytokines, ce qui confirme que d'autres TLR sont utilisés pour reconnaître *S. suis* et activer la production de cytokines par les macrophages (Graveline *et al*, Int Immunol, 2007) (Figure 5). *S. suis* induit la voie des MAPK et ERK1, qui permet aussi la translocation de NF- $\kappa$ B au noyau et la production de cytokines par les macrophages murins (Lachance *et al*, Infect Immun, 2014). De plus, un blocage de la phagocytose avec de la cytochalasine C n'affecte pas la production de cytokines par les macrophages, ce qui suggère que l'attachement seul de *S. suis* aux macrophages est suffisant pour induire cette production (Segura *et al*, Infect Immun, 1999). *S. suis* induit la production de TNF- $\alpha$ , de métalloprotéinase 9 (MMP-9) et d'IL-6 par les macrophages murins (Segura *et al*, Infect Immun, 1999; Rong *et al*, PLoS One, 2012; Lachance *et al*, Infect Immun, 2014), tandis qu'il induit la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-6, d'IL-8 et d'IL-1 $\beta$  par les macrophages humains (Tanabe *et al*, Can J Vet Res, 2010). Les PAM ont montré une expression d'IL-1 $\beta$  et  $\alpha$ , d'IL-6 et d'IL-8 suite à l'incubation avec *S. suis* (de Greef *et al*, Vet Microbiol, 2010). La matrice MMP-9 intervient dans la dégradation de la matrice cellulaire et un haut niveau de cette protéine dans le liquide cérébro-spinal est associé à la méningite, à des dommages au cerveau et à la rupture de la BBB (Jobin *et al*, Microb Pathog, 2006). Les IL-1, IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$  sont des médiateurs de l'inflammation qui ont un rôle dans la perméabilisation de la BBB (Jobin *et al*, Microb Pathog, 2006).



**Figure 5. Voie de signalisation MyD88 dépendante des récepteurs Toll-Like (TLRs).** Tous les TLRs sauf le TLR3 utilisent cette voie, le TLR4 n'utilisant pas exclusivement cette voie. Lorsque le ligand (PAMP) lie le TLR, MyD88 est recruté au domaine intracellulaire du TLR (TIR). MyD88 recrute à son tour l'« Interleukin-1R-Associated Protein Kinase » (IRAK). La voie de MyD88 et IRAK mène à des cascades en aval puis à l'activation des MAP kinases (MAPK) Erk, Jnk et p38 ou de NF-κB. NF-κB contrôle la transcription de gènes pro-inflammatoires et les MAPK régulent la transcription de gènes pro-inflammatoires ainsi que la stabilité de leur ARNm. (Adaptée de Han J., Nat Immunol, 2006)



Les études montrent que la perte de la CPS de *S. suis* induit une plus forte production de médiateurs de l'inflammation que lorsqu'elle est présente (Segura *et al*, Infect Immun, 1999; Tanabe *et al*, Can J Vet Res, 2010; de Greef *et al*, Vet Microbiol, 2010). Tanabe *et al* suggèrent que la perte de la CPS exposerait des molécules et la paroi cellulaire bactérienne favorisant la sécrétion de cytokines, et que *S. suis* pourrait réguler *in vivo* la production de CPS afin de produire une réponse inflammatoire forte provoquant des dommages à la BBB de l'hôte. Il a en effet été rapporté que la paroi cellulaire bactérienne de *S. suis* induisait la même production de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 par les macrophages murins que la bactérie entière tuée (Segura *et al*, Infect Immun, 1999).

D'autres protéines présentes à la surface de *S. suis* pourraient avoir un rôle dans la production de médiateurs de l'inflammation par les macrophages. L'*amylase binding protein B* (abdp) est une peptidase présente à la surface de *S. suis* induisant l'expression d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$ , de MCP-1 et d'INF- $\gamma$  par les macrophages (Huang *et al*, Microbiol Res., 2015). La protéine de surface SspA est un enzyme qui clive les protéines et le fibrinogène extracellulaires et induisant la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$ , d'IL-6, de CXCL8 et de CCL5, reliées à la méningite et à la perméabilisation de la BBB, par les macrophages (Tang *et al*, Folia Microbiol (Praha), 2011).

Par ailleurs, les souches produisant la SLY induisent des dommages aux macrophages murins (Segura & Gottschalk, Infect Immun, 2002). La SLY serait aussi responsable, en partie, de la production d'IL-6, mais pas de TNF- $\alpha$  ni d'IL-1, par les PAM (Lun *et al*, Microb Pathog, 2003).

#### **4.4 Interaction de *H. parasuis* avec les macrophages et les macrophages alvéolaires porcins**

Quelques études portent sur les interactions entre *H. parasuis* et les macrophages et PAM. Les interactions entre *H. parasuis* et les PAM semblent différentes selon la virulence de la souche impliquée (Olvera *et al*, Vet Res, 2009). Un résumé des interactions de *H. parasuis* avec les macrophages alvéolaires est illustré à la Figure 6B.

##### **4.4.1 Adhésion aux macrophages**

Les souches virulentes de *H. parasuis* adhèrent aux PAM, mais les souches non-virulentes semblent s'associer à ces cellules en plus grand nombre (Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2012; Olvera *et al*, Vet Res, 2009). Lorsque les bactéries sont incubées avec des macrophages à 4°C, il y a une diminution de l'attachement de *H. parasuis* aux macrophages, ce qui suggère que peu de récepteurs spécifiques sont impliqués dans cet attachement (Olvera *et al*, Vet Res, 2009). La porine *outer membrane protein P2* (OmpP2) est la protéine la plus abondante de la membrane externe de cette bactérie et elle est impliquée dans la résistance de *H. parasuis* au complément et dans l'adhésion aux PAM (Li *et al*, Res Vet Science, 2012; Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2012).

#### **4.4.2 Résistance à la phagocytose**

*H. parasuis* peut résister à la phagocytose par les macrophages (Olvera *et al*, Vet Res, 2009). Cependant, des tests de phagocytoses effectués avec des PAM ont montré que les isolats cliniques ont une sensibilité différente à la phagocytose selon la virulence de la souche (Olvera *et al*, Vet Res, 2009). En effet, des souches systémiques virulentes sont capables d'éviter la phagocytose par les PAM tandis que des souches isolées de tractus respiratoire de porcs sains étaient phagocytées facilement (Olvera *et al*, Vet Res, 2009). Comme seules les souches capsulées ont réussi à éviter la phagocytose, la CPS de *H. parasuis* pourrait être impliquée dans la résistance à la phagocytose (Olvera *et al*, Vet Res, 2009). Étant donné que la CPS interfère avec la déposition du complément, une réponse humorale est nécessaire pour la clairance de la bactérie par les macrophages (Olvera *et al*, Vet Res, 2009). La SA de la CPS, montré comme étant un facteur anti-phagocytaire chez d'autres bactéries telle *S. suis*, pourrait aussi être impliquée dans la résistance à la phagocytose par *H. parasuis* (Costa-Hurtado *et al*, Infect Immun, 2013). Les auto-transporteurs trimériques associés à la virulence (VtaA) sont des protéines de surface de *H. parasuis* ayant aussi un rôle dans la résistance à la phagocytose (Costa-Hurtado *et al*, Vet Res, 2012). Les VtaA 8 et 9 sont présents en grand nombre à la surface des souches virulentes de *H. parasuis*, mais sont peu nombreux sur celle des non virulentes, et peuvent donc être associés à la virulence (Costa-Hurtado *et al*, Vet Res, 2012). Leur expression dans des souches d'*E. coli* sensibles à la phagocytose par les macrophages conduit à un délai dans le processus de phagocytose (Costa-Hurtado *et al*, Vet Res, 2012).

#### **4.4.3 Modulation de l'activation**

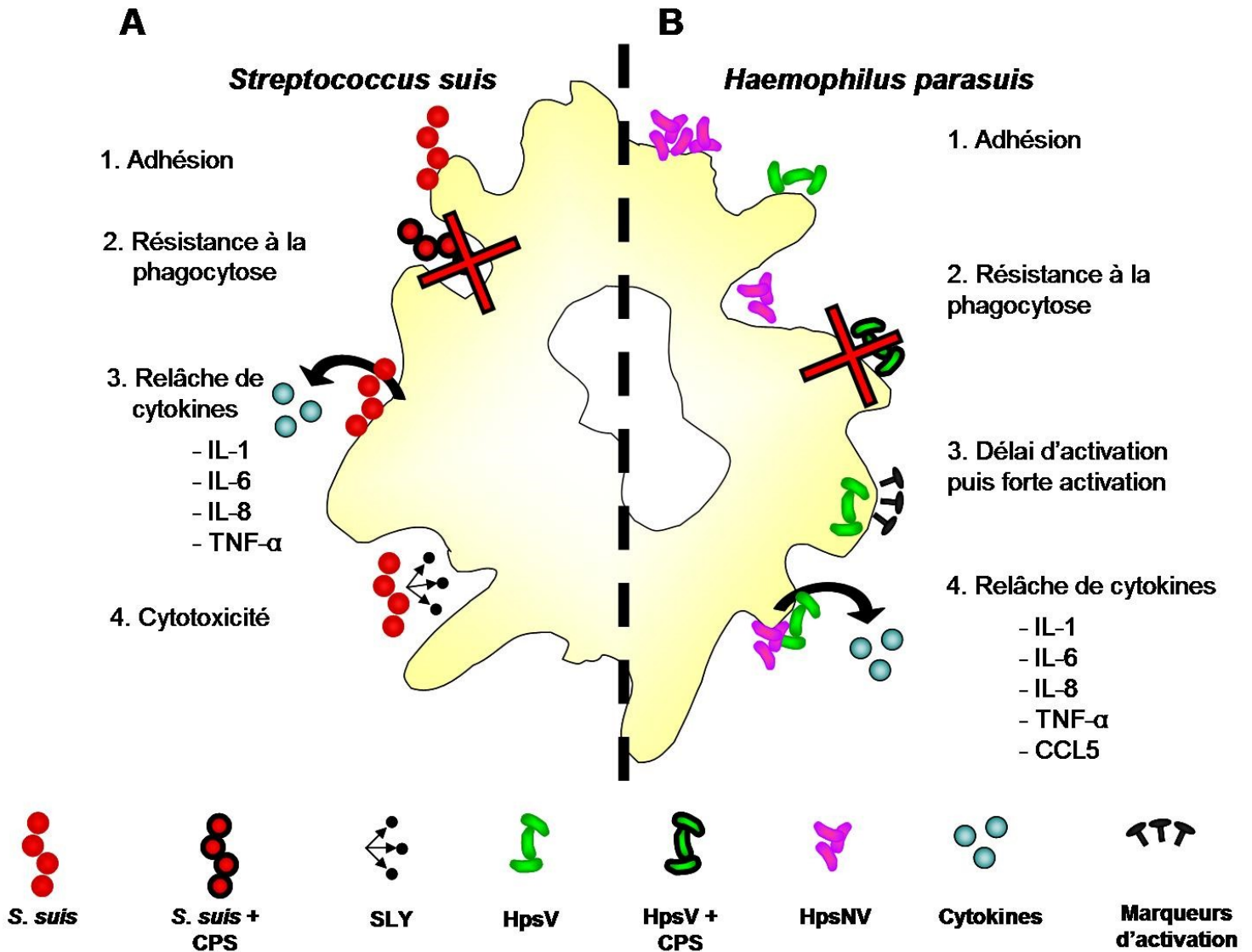
Chez les PAM récoltés de porcelets infectés expérimentalement avec *H. parasuis*, une analyse par FACS montre que *H. parasuis* virulente induit tout d'abord un délai d'activation de ces cellules tel que démontré par une diminution de molécules d'activation à la surface cellulaire (Costa-Hurtado *et al*, Infect Imm, 2013). Ces molécules de surface sont impliquées dans la capture, l'apprêtement et la présentation de l'antigène à la surface du macrophage afin d'activer la réponse immunitaire adaptative (Costa-Hurtado *et al*, Infect Imm, 2013). En bref, *H. parasuis* peut éviter sa phagocytose, facilitant sa persistance et sa multiplication dans les poumons, retarder l'activation des PAM et la mise en marche de l'immunité adaptative, la production de médiateurs de l'inflammation et d'anticorps, ce qui lui permettrait de mettre en place l'infection (Olvera *et al*, Vet Res, 2009; Costa-Hurtado *et al*, Infect Imm, 2013). La situation s'inverse après quelques jours, où une forte activation et l'inflammation pourraient mener à des dommages tissulaires (Costa-Hurtado *et al*, Infect Imm, 2013). Les mêmes résultats ne sont cependant pas observés avec les cultures de macrophages alvéolaires infectés *in vitro* (Costa-Hurtado *et al*, Infect Imm, 2013).

#### **4.4.4 Induction de l'expression de médiateurs de l'inflammation**

Des PAM isolés de porcs infectés avec *H. parasuis* ont été analysés par microarray afin de déterminer leur réponse face à la bactérie (Wang *et al*, BMC Genomics, 2012). Plusieurs gènes liés à l'inflammation, la phagocytose et à la réponse immunitaire étaient régulés. Les gènes IL-1 $\beta$  et CCL5/RANTES, impliqués dans l'inflammation et le recrutement de cellules

du système immunitaire au site d'infection, sont régulés à la hausse dans les PAM infectés avec *H. parasuis* comparativement au groupe contrôle (Wang *et al*, BMC Genomics, 2012). La voie de signalisation NF- $\kappa$ B est activée lors des infections pour induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Lors de l'infection des PAM avec *H. parasuis*, il y a une régulation négative de répresseurs de cette voie de signalisation, ce qui montre son activation permettant la production de cytokines (Wang *et al*, BMC Genomics, 2012). Cependant, des cytokines régulatrices de l'inflammation sont aussi exprimées lors de cette infection, comme le TGF- $\beta$  (Wang *et al*, BMC Genomics, 2012). Dans des études de stimulation de PAM, la protéine de surface OmpP2, la plus abondante à la surface de *H. parasuis*, augmente l'expression d'IL-1 $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  ainsi et que des IL-6 et IL-8 par ces cellules (Zhou *et al*, Vet J, 2014).

*H. parasuis* peut donc, dans un premier temps, résister à la phagocytose et créer un délai d'activation des PAM lui permettant de s'installer dans les poumons, et, dans un deuxième temps, une forte activation des PAM et la relâche de médiateurs de l'inflammation et produire la pneumonie.



**Figure 6. Résumé des interactions de *S. suis* et *H. parasuis* avec les macrophages.** A) *S. suis* adhère aux macrophages (1). *S. suis* évite sa phagocytose à l'aide de sa CPS (2) et induit la production de cytokines pro-inflammatoires (3). Certaines souches sécrètent la suilysine, une toxine cytotoxique pour les macrophages (4). B) Les souches virulentes et les non-virulentes de *H. parasuis* adhèrent aux macrophages, les souches non-virulentes s'associant en plus grand nombre (1). Les souches virulentes de *H. parasuis* produisant une CPS résistent à la phagocytose mieux que les souches non-virulentes (2). Les souches virulentes de *H. parasuis* induisent un délai de l'activation, puis une forte activation des macrophages alvéolaires marquée par l'augmentation de l'expression de marqueurs d'activation à la surface de la cellule (3). *H. parasuis* induit le relâchement de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (4). Légende : CPS, capsule polysaccharidique; HpsV, souches virulentes de *H. parasuis*; HpsNV, souches non-virulentes de *H. parasuis*; IL, interleukine; SLY, suilysine; TNF, facteur de nécrose tumoral.

## 5. Co-infections

Puisqu'un hôte est colonisé par plusieurs microorganismes et considérant que plus de 80% de la biomasse microbienne résiderait sous forme de biofilm, des interactions entre les microorganismes existent (Jacques *et al*, Animal Health Res Rev, 2010). Les maladies affectant le tractus respiratoire chez le porc engendrent des pertes importantes pour l'industrie porcine et sont souvent causées par une combinaison d'agents infectieux possédant différents niveaux de virulence, résultant, par exemple, au complexe respiratoire porcin (PRDC) (Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011). Lors du PRDC, des effets additifs ou synergiques sont observés entre des agents pathogènes primaires et secondaires au niveau du système respiratoire du porc, menant à la maladie multifactorielle (Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011). Bien que les interactions entre les pathogènes soient complexes et qu'une meilleure compréhension de celles-ci soit nécessaire pour élucider les mécanismes de virulence impliqués dans l'apparition du PRDC, il est supposé que la maladie soit initiée la plupart du temps par un agent qui endommage la muqueuse du tractus respiratoire qui devient, par la suite, une porte d'entrée pour des agents opportunistes (Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011). Il est à noter que des interactions entre deux bactéries, deux virus ou impliquant plusieurs types d'agents infectieux sont aussi possibles (Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011; Meng *et al*, Infect Immun, 2015).

## 5.1 Interactions entre virus et bactéries

*S. suis*, *H. parasuis* ainsi que les virus du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (PRRSV) et de l'Influenza Porcin (SIV) sont souvent retrouvés dans des infections mixtes chez le porc, et quelques études portent sur les interactions entre ces agents pathogènes. Par exemple, il a été démontré que l'infection de cellules épithéliales de la trachée de porc avec le SIV augmente l'interaction de *S. suis* avec ces cellules par l'intermédiaire de l'hémagglutinine virale qui lie le SA de la CPS bactérienne (Wang *et al*, Infect Immun, 2013; Wu *et al*, J Gen Virol, 2015). Elles ne représentent cependant que quelques exemples d'interactions possibles entre les microorganismes, opportunistes ou pathogènes, qui peuvent survenir et ces interactions ne seront pas discutées en détails dans cette revue de littérature.

## 5.2 Interactions entre bactéries

Une revue publiée dans le journal *Animal Health Research Reviews* en 2011 résume des interactions entre les agents pathogènes lors de maladies respiratoires polymicrobiennes retrouvées chez le porc (Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011). Quelques interactions entre espèces bactériennes retrouvées simultanément chez un porc malade y sont aussi résumées. En effet, les mêmes combinaisons de bactéries, ayant des conséquences normalement moins sévères lorsqu'isolées individuellement, sont retrouvées lors de maladies respiratoires chez le porc, proposant que des interactions entre ces pathogènes existent (Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011). Ces relations suivraient entre autres le principe des agents pathogènes primaire et secondaire dans lequel l'agent primaire induit des



lésions dont profite l'agent secondaire opportuniste (Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011). C'est le cas notamment de *Mycoplasma hyopneumoniae* et *Pasteurella multocida*, qui, lorsqu'ils infectent le porc simultanément, induisent une maladie plus forte que lorsqu'ils sont retrouvés individuellement, et ceci serait dû au fait que les lésions ciliaires causées par *M. hyopneumoniae* faciliteraient l'installation de *P. multocida* dans le tractus respiratoire (Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011). De plus, *M. hyopneumoniae* augmente l'expression d'agglutinine sur les cellules épithéliales du tractus respiratoire, modifiant la composition des glycoconjugués sur l'épithélium et augmentant ainsi l'adhésion de *P. multocida*, ayant une affinité pour ces composés (Park *et al*, BMC Vet Res, 2016). *M. hyopneumoniae* mènerait aussi à une inhibition de la phagocytose par les macrophages alvéolaires, prédisposant les porcs à une infection subséquente par *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011).

De plus, l'infection par *Bordetella bronchiseptica* augmente la colonisation et l'adhésion de *H. parasuis* et de *P. multocida* au tractus en sécrétant des adhésines et en induisant des dommages à l'épithélium (Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011). Ainsi, lors de la rhinite atrophique chez le porc, *B. bronchiseptica* initie l'infection, puis celle-ci est exacerbée par *P. multocida*, étant normalement un faible colonisateur du tractus respiratoire porcin (Horiguchi Y, Curr Top Microbiol Immunol, 2012).

### 5.3 Interactions entre *S. suis* et *H. parasuis*

Les interactions de *S. suis* et *H. parasuis* lors de leur croissance et de la formation de biofilm ont été étudiées récemment (Barre A.M.E., 2015). Prenant part à la flore respiratoire, ces deux bactéries peuvent causer la maladie lorsque des déséquilibres au niveau de la flore microbienne se produisent ou lorsque le profil de santé des animaux est modifié, par exemple, par un virus (Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013; Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011; Barre A.M.E., 2015). Puisqu'elles colonisent toutes deux les voies respiratoires des porcs, qu'elles sont capables de produire des biofilms dans les voies respiratoires ainsi que des maladies inflammatoires semblables, et que les infections mixtes sont de plus en plus considérées comme la cause la plus fréquente de maladies, cette étude donne des pistes sur les interactions entre ces espèces bactériennes lors de la colonisation des porcs par *S. suis* et *H. parasuis* (Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011; Barre A.M.E., 2015).

Dans un biofilm mixte, des interactions entre les espèces bactériennes peuvent survenir (Jacques *et al*, Anim Health Res Rev, 2010). Ces interactions peuvent bénéficier aux bactéries présentes dans le biofilm, et permettre une protection accrue contre le système immunitaire et les antibiotiques, une augmentation de la pathogénicité d'une ou plusieurs souches et de la persistance (Jacques *et al*, Anim Health Res Rev, 2010; Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011). Les interactions peuvent aussi aller au détriment de l'une ou l'autre des espèces bactériennes contenues dans le biofilm, tout en avantageant une autre

(Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011; Barre A.M.E., 2015). L'impact de la présence des deux bactéries sur leur croissance, la production de biofilm, le rôle des facteurs sécrétés par les bactéries durant la croissance, ainsi que la protection contre les antibiotiques et le sérum lors des cultures mixtes ont été évalués (Barre A.M.E., 2015).

En co-cultures planctoniques dans des conditions données, il a été montré que *S. suis* ralentit la croissance de *H. parasuis* tandis que cette dernière a un effet favorable sur la croissance de *S. suis* sérotype 2 (Barre A.M.E., 2015). Il est à noter que cet effet est dépendant de la souche utilisée, et qu'il pourrait être l'effet de la compétition aux nutriments et au fer, ainsi que de la mort de *H. parasuis* par les réactifs de l'oxygènes produits par *S. suis* (Barre A.M.E., 2015). Cependant, *S. suis* lyse les érythrocytes des géloses au sang, permettant de fournir à *H. parasuis* le NAD nécessaire à sa croissance, cette hémolyse étant inhibée par certaines souches de *H. parasuis* (Barre A.M.E., 2015). Un changement de morphologie et de phénotype de *H. parasuis* en présence de *S. suis* est noté et il pourrait être dû à la production d'un fimbriae par *H. parasuis* lors de conditions stressantes, telle l'état de compétition lors de la co-culture (Barre A.M.E., 2015).

*S. suis* et *H. parasuis* peuvent former des biofilms *in vitro* (Jacques *et al*, Anim Health Res Rev, 2010). Selon la virulence de la souche et sa localisation lors du prélèvement, la quantité de biofilm formée varie (Jacques *et al*, Anim Health Res Rev, 2010). Pour *H. parasuis* et *S. suis*, les souches non-virulentes produisent plus de biofilm que les souches virulentes (Jacques *et al*, Anim Health Res Rev, 2010). La production de capsule, masquant les adhésines à la surface bactérienne, semble interférer avec la production de biofilm par

*S. suis* (Jacques *et al*, Anim Health Res Rev, 2010). Lorsqu'elle est isolée du cerveau et du sang, *H. parasuis* produit plus de biofilm que lorsqu'elle est isolée des cavités nasales (Jacques *et al*, Anim Health Res Rev, 2010; Bello-Orti *et al*, Vet Res, 2004). Lors de co-cultures, il a été montré que *S. suis* sérotypes 1 et 2 inhibent la formation de biofilm par des souches de *H. parasuis* virulentes ou non-virulentes, montré par un nombre diminué de cellules viables dans ce biofilm et la diminution de la biomasse (Barre A.M.E., 2015). La co-culture diminuerait aussi la croissance de *S. suis* dans le biofilm, en modulant l'expression de la CPS et l'attachement de *S. suis* (Barre A.M.E., 2015). Les protéinases et les DNases de *S. suis* pourraient avoir un rôle sur la dégradation de la matrice de *H. parasuis*, diminuant ainsi la biomasse (Barre A.M.E., 2015). L'augmentation du nombre de cellules planctoniques qui en découle dans les voies respiratoires pourrait augmenter la pathogénicité de ces espèces bactériennes chez le porc (Barre A.M.E., 2015).

À l'aide du surnageant de culture bactérienne planctonique, un test bactéricide a été effectué et n'a montré aucun effet bactéricide du surnageant des différentes espèces l'une sur l'autre (Barre A.M.E., 2015). La croissance, planctonique ou par biofilm de *S. suis* dans le surnageant de *H. parasuis* et vice versa a montré que *S. suis* peut croître dans le surnageant de *H. parasuis*, tandis que cette dernière ne parvient pas à se multiplier dans le surnageant de *S. suis* (Barre A.M.E., 2015). La production de biofilm par *S. suis* est augmentée en présence d'une grande concentration de surnageant de *H. parasuis* (Barre A.M.E., 2015). Le biofilm de la souche virulente de *H. parasuis* est inhibé lorsqu'elle est cultivée dans le surnageant de *S. suis*, tandis que la souche non-virulente augmente sa production de biofilm (Barre A.M.E., 2015). Ceci démontre que les deux espèces bactériennes peuvent communiquer par

l'intermédiaire de facteurs sécrétés, mais que l'effet est dépendant de la souche testée (Barre A.M.E., 2015).

Donc, puisque *S. suis* croit plus rapidement que *H. parasuis*, il pourrait utiliser les ressources dans le milieu au désavantage de *H. parasuis* (Barre A.M.E., 2015). Les facteurs solubles sécrétés par *S. suis* pourraient aider la croissance de *H. parasuis* non-virulente, mais la compétition entre les deux espèces défavorise la croissance en biofilm de *H. parasuis* (Barre A.M.E., 2015). De plus, les protéases, DNases et autres enzymes sécrétées par *S. suis* pouvant dégrader la matrice polymérique pourraient aussi aller à l'encontre de la formation de biofilm par *H. parasuis* (Barre A.M.E., 2015). La déplétion en nutriments et un biofilm plus dense, contenant plus de zones acides et anoxiques, peuvent mener à un état stationnaire des bactéries et augmentant leur résistance aux antimicrobiens (Barre A.M.E., 2015). La présence de *H. parasuis* confère une protection accrue de *S. suis* contre les antibiotiques lors de la formation de biofilm, tandis que *H. parasuis* bénéficie d'une protection contre les antibiotiques et le sérum avec la présence de *S. suis* (Barre A.M.E., 2015).

De façon générale, *S. suis* pourrait donc profiter de la présence de *H. parasuis* dans le tractus respiratoire des animaux pour favoriser sa formation de biofilm et sa persistance dans l'hôte (Barre A.M.E., 2015). *H. parasuis* pourrait mieux survivre dans le sang en présence de *S. suis* (Barre A.M.E., 2015). Ces interactions ont cependant été étudiées avec un petit nombre de souches, le tractus respiratoire du porc étant colonisé par de nombreuses espèces bactériennes et parfois même par différentes souches d'une même espèce (Barre A.M.E., 2015).

L'objectif général de ce projet de maîtrise est l'étude *in vitro* de l'effet d'une co-infection par *S. suis* et *H. parasuis* sur leurs interactions avec des cellules épithéliales de la trachée et les macrophages alvéolaires porcins lors des premières étapes de l'infection. Ainsi, l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales de la trachée et l'induction de l'expression de médiateurs de l'inflammation par ces cellules et les macrophages alvéolaires lors de co-infections en comparaison aux infections simples seront étudiés. De plus, l'effet inhibiteur de la capsule de *S. suis* sur la phagocytose de *H. parasuis* par les macrophages alvéolaires porcins sera étudié.

### **III MATÉRIEL, MÉTHODE ET RÉSULTATS**

## ***ARTICLE I***

### **Limited interactions between *Streptococcus suis* and *Haemophilus parasuis* in *in vitro* co-infection studies**

**Annabelle Mathieu-Denoncourt<sup>1</sup>, Corinne Letendre<sup>1</sup>, Jean-Philippe Auger<sup>1</sup>, Mariela Segura<sup>1</sup>, Virginia Aragon<sup>2</sup>, Sonia Lacouture<sup>1</sup>, Marcelo Gottschalk<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA) and Groupe de recherche sur les maladies infectieuses en production animale, Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 Sicotte St., Saint-Hyacinthe, QC, Canada J2S 2M2

<sup>2</sup> IRTA, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA, IRTA-UAB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

En préparation pour soumission à MDPI Pathogens

#### **Rôle de la candidate dans la conception de l'article :**

Je suis l'auteure principale de l'article. J'ai participé à la conception et au design des expériences ainsi qu'à la mise au point des techniques. J'ai aussi effectué les manipulations, analysé les résultats, conçu les graphiques et rédigé le manuscrit sous la supervision de M.G.



## ABSTRACT

*Streptococcus suis* and *Haemophilus parasuis* are normal inhabitants of the porcine upper respiratory tract, but are also among the most frequent causes of disease in weaned piglets worldwide, causing inflammatory diseases such as septicemia, meningitis, and pneumonia. Using an in vitro model of infection with tracheal epithelial cells or primary alveolar macrophages (PAMs), it was possible to determine the interaction between *S. suis* serotype 2 and *H. parasuis* strains with different level of virulence. Within *H. parasuis* strains, the low-virulence F9 strain showed higher adhesion levels to respiratory epithelial cells and greater association levels to PAMs than the high-virulence Nagasaki strain. Accordingly, the low-virulence F9 strain induced, in general, higher levels of pro-inflammatory cytokines than the virulent Nagasaki strain from both cell types. In general, *S. suis* adhesion levels to respiratory epithelial cells were similar to *H. parasuis* Nagasaki strain. Yet, *S. suis* strains induced a significantly lower level of pro-inflammatory cytokine expression from epithelial cells and PAMs than those observed with both *H. parasuis* strains. Finally, this study has shown that, overall and under in vitro conditions, *S. suis* and *H. parasuis* have limited interactions between them and use probably different host receptors, regardless to their level of virulence.

**Keywords:** *Streptococcus suis* serotype 2; *Haemophilus parasuis*; co-infections; *in vitro*; inflammation; phagocytosis; alveolar macrophage; tracheal epithelial cells

## INTRODUCTION

*Streptococcus suis* and *Haemophilus parasuis* are among the most frequent causes of disease in weaned piglets worldwide [1]. Both bacterial species, mainly low virulent strains, are also normal inhabitants of the porcine upper respiratory tract and are present in most healthy animals [2,3]. They are both transmitted by nasal contact from a colonized animal to another, usually from the sow to the piglets, but also among piglets [2,3]. Both pathogens cause inflammatory infections such as septicemia, polyserositis, meningitis, arthritis and pneumonia [2,3].

*S. suis* is classified into 35 serotypes, based on the antigenicity of the capsular polysaccharide (CPS). More recently, some serotypes (20, 22, 26, 32, 33 and 34) have been suggested to belong to different bacterial species [4], whereas strains with new capsular genes have also been described [5]. Serotype 2 has been described as being the most virulent and frequently recovered serotype from diseased animals [6]. However, phenotypic and genotypic differences within serotype 2 strains do exist [7]. The use of multilocus sequence typing has revealed that some strains of serotype 2 belonging to certain sequence types (STs) are more virulent than others. For example, virulent ST1 (as well as other members of the clonal complex 1) strains predominate in most Eurasian countries, whereas ST25 and ST28 strains (intermediate and low virulence, respectively) are widely distributed in North America [7]. The early steps of a *S. suis* infection take place in the upper respiratory tract. Bacteria adhere and, to a certain extent, invade the epithelial cells [8]. Although mechanisms are not completely understood, *S. suis* eventually reaches the bloodstream, remains extracellular by resisting phagocytosis and causes disease [3]. *S. suis* resistance to phagocytosis by phagocytic cells is mainly due to the presence of the CPS [9], which may indeed affect not only its own phagocytosis but also that of an heterologous species, such as Group B *Streptococcus* [10]. Bacteria then induce the production of pro-inflammatory cytokines in the respiratory tract as well as systemically that may compromise the host [11].

*H. parasuis* is the etiological agent of Glässer's disease, and is classified into 15 serotypes [12]. There are virulent and low-virulent strains, and there is no clear relationship between virulence and serotype [2]. Many of the non-typeable strains identified as such by the use of antibodies can now be serotyped by PCR [13,14]. Virulent strains of *H. parasuis* are able to colonize and initiate infection by adhesion to and, to a certain extent, invasion of epithelial cells [15]. In the lungs, non-virulent strains of *H. parasuis* can be eliminated through phagocytosis by alveolar macrophages [16]. In contrast, virulent strains of *H. parasuis* are able to avoid phagocytosis, probably due, among other factors, to the expression of a bacterial capsule, which allows multiplication of bacteria inside the host with a production of a strong inflammatory reaction that results in the characteristic lesions of Glässer's disease [2]. Once virulent strains enter the bloodstream (by still unknown mechanisms), the bacterium is able to avoid complement-mediated killing in an antibody-independent manner [2]. *H. parasuis* is also able to cause bronchopneumonia and virulence of isolates recovered from affected lungs is not completely known, since these isolates may also be the result of aspiration of low virulent colonizers from the upper respiratory tract [17]. Different virulence factors have been suggested to play important roles in the pathogenesis of the Glässer's disease [2]. Among them, the virulence associated trimeric autotransporters (VtaA) are those more characterized and their presence has been used to potentially identify virulent isolates by PCR [18].

Because *S. suis* and *H. parasuis* are present in the upper respiratory tract and both cause inflammatory diseases in young piglets after weaning, interactions between the two species may occur during the early steps of infection. In the present study, the interactions of virulent and intermediate/low-virulent *S. suis* and *H. parasuis* strains with neonatal porcine tracheal epithelial cells (NPTr) and primary porcine alveolar macrophages (PAMs) during single infections and as well as simultaneous or sequential co-infections were studied. Results indicate that, in general, limited interaction occurs between the two bacterial species.

## MATERIALS AND METHODS

### 3.1. Bacterial strains

Two different strains of *S. suis* serotype 2 were used in this study (Table 1); the well characterized high-virulent strain P1/7 (ST1) from Europe, and the intermediate-virulent strain 89-1591 (ST25) from Canada [33]. Bacteria were cultured as previously described with some modifications [34]. Briefly, *S. suis* strains were cultivated on Colombia sheep blood agar plates (Oxoid, Burlington, ON, Canada), which were incubated at 37 °C for 16 h with 5 % CO<sub>2</sub>. For cell infections, 5 ml of Todd Hewitt Broth (THB; Difco, Mississauga, ON, Canada) were inoculated with a few colonies of *S. suis* and incubated for 16 h at 37 °C, with agitation. To obtain the final culture, 10 ml of fresh medium were inoculated with 400 µl of the overnight culture and incubated at 37 °C under agitation until reaching the exponential growth phase when an optical density 0.6 (OD<sub>600nm</sub>) was obtained. Two different strains of *H. parasuis* were also used. The virulent Nagasaki strain (originally isolated from a case of septicemia with meningitis in Japan) and low-virulent F9 strain, isolated from the nasal cavities of a pig in Spain [28] (Table 1). Bacteria were grown on chocolate agar plates (Oxoid) as previously described [16], incubated 16 h at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> and harvested with sterile phosphate buffered saline (PBS). After centrifugation, bacteria (*S. suis* and *H. parasuis*) were suspended to the appropriate concentration in cell culture media without antibiotics.

### 3.2. Cell culture

The neonatal porcine epithelial cells (NPTr) and primary alveolar macrophages (PAMs) were used for co-infection studies. NPTr cells were cultured as described before [11,25,39]. Briefly, cells were grown at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> in Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM; Gibco, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco), penicillin-streptomycin (100 U/ml; Gibco) and gentamycin (0.04 mg/ml; Gibco). For assays, cells were treated with 0.1 % trypsin in 0.03 % ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution (Gibco), suspended in fresh culture media and

distributed into 24 wells tissue culture plates (Falcon, Mississauga, ON, Canada). The media was replaced after 24 h by cell culture medium without antibiotic, and the cells were incubated until they reached confluence, with a final concentration of  $10^5$  cells/ml. The day of the experiment, cells were washed three times with PBS and fresh cell culture medium without antibiotic was added to the wells.

To harvest the PAMs, bronchoalveolar lavages were performed with sterile PBS on lungs from 5 six-week old piglets from a high-health status farm as previously described [40], but without the use of antibiotics. These studies were carried out in strict accordance with the recommendations of and approved by the University of Montreal Animal Welfare Committee guidelines and policies (protocol number Rech-1570). Cells were washed twice with DMEM and frozen in liquid nitrogen to a final concentration of  $2 \times 10^7$  cells/ml in DMEM supplemented with 20 % (v/v) FBS use. For the experiments, PAMs were thawed in warm DMEM supplemented with 10% FBS, centrifuged at  $800 \times g$ , and suspended at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells/ml in fresh culture medium. Five milliliters of the suspension were distributed in each well of 6-well tissue Primaria culture plates (Falcon). PAMs were further incubated overnight at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> in a humid atmosphere. Sterility controls were done in parallel.

### 3.3. Adhesion and invasion of NPTr by *S. suis* and *H. parasuis*

The so-called adhesion assay (which in fact quantifies total intracellular and surface-adherent bacteria) was performed as described before [20,25] with some modifications. Briefly, cells were infected with either *S. suis* or *H. parasuis* with a MOI of 5 by removing the cell culture media and by replacing it with 1 ml of the bacterial suspension. This MOI was established as being optimal during standardization tests. Bacteria were cultured as previously reported [20,25]. The number of colony forming units (CFU)/ml in the final suspension before each experiment was determined by plating *S. suis* samples onto Todd-Hewitt agar (Difco) or *H. parasuis* samples onto chocolate agar plates (Oxoid) using an Autoplate 4000 automated

spiral plater (Spiral Biotech, Norwood, MA). Cell culture plates were then infected with the bacterial suspensions and centrifuged at  $800 \times g$  for 10 min in order to bring bacteria into close contact with cells [20] and further incubated at different incubation times (from 15 min up to 2 h) for adhesion assays. For simultaneous co-infections, 500  $\mu$ l of both twice-concentrated bacterial suspensions (total of 1 ml; final MOI of 5 for each bacterial species) were added to the wells. For sequential co-infections, cells were pre-infected with one pathogen (either *S. suis* or *H. parasuis*) at a MOI of 5, centrifuged at  $800 \times g$  and incubated for 15 min at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub>. In selected experiments and in order to saturate receptors, an MOI of 500 was also used. Cells were then washed 3 times with sterile PBS and 1 ml of the second bacterial suspension (MOI: 5) was added to the wells. The plates were centrifuged again and further incubated up to 2 h. These conditions were established during standardization tests.

For adhesion studies, and after the incubation time, cells were washed five times with PBS and disrupted with sterile ice-cold deionized water followed by cell scraping from the bottom of the well in order to liberate cell-associated bacteria. The cell suspensions were plated and incubated at 37 °C for 24-48 h on THA plates (to count *S. suis* colonies only) or chocolate agar to count either *H. parasuis* or both bacterial species which could be easily differentiated by colony morphology. Levels of adhesion were expressed as the total number of CFU recovered per well. For the invasion assay, a method similar to that of the adhesion assay was followed, except that after 2 h of incubation, the NPTr cell monolayers were washed twice with PBS, and 1 ml of cell culture medium containing 100  $\mu$ g of gentamicin and 5  $\mu$ g of penicillin G (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) was added to each well. The plates were then further incubated for 1 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> to kill extracellular and surface-adherent bacteria. Cells were washed three times and the last wash was plated to confirm antibiotic activity. Cells were then disrupted and bacterial CFU numbers were determined as described above. Levels of invasion were expressed as the total number of CFU recovered per well.

### 3.4. Induction of pro-inflammatory cytokine expression

For cell activation, NPTr and PAMs were infected with either *S. suis* or *H. parasuis*, or with both bacterial species simultaneously. All manipulations were carried out on LPS-free conditions. Cell culture media was removed from the wells and replaced by 1000 µl of bacterial suspension (MOI: 10) for single infections, or with 500 µl of both twice-concentrated bacterial suspensions for simultaneous co-infections. The plates were centrifuged 10 min at  $800 \times g$  and incubated 6 h (NPTr) or 12 h (PAMs) at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub>. MOI and incubation times were chosen based on cytotoxicity studies, in order to work under non-toxic conditions. The cells were washed twice with warm PBS and homogenized in 1000 µl of QIAzol (Qiagen, Toronto, ON, Canada). The samples were frozen at – 80 °C until RNA extraction.

### 3.5. RNA extraction, cDNA construct and RT-qPCR

The RNA extractions using chloroform were performed according to kit instructions (QIAzol, Qiagen). Purified RNA was suspended in 20 µl of DNase and RNase-free water (Fisher, Ottawa, ON, Canada) and was quantified with NanoDrop 1000 (Fisher). Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 500 ng of sample RNA with QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was diluted seven times in water for qPCR analysis.

Primers (IDT, Coralville, IA) used for quantitative PCR are listed in Table 2. A CFX96 rapid thermal cycler system (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) showed that primers had a PCR amplification efficiency ranking between 90 and 110 %. The cDNA was amplified by qPCR as described in Lecours *et al* [41]. Briefly, the cDNA was amplified using SsoFast EvaGreen Supermix kit (Bio-Rad). The PCR amplification program for all cDNA consisted of an enzyme activation step of three min at 98 °C, followed by 40 cycles of denaturation for 2 s at 98 °C and an annealing/extension step for 5 s at 58 °C. Two genes, PPIA and Hypox, were

used as the normalizing genes to compensate for potential differences in cDNA amounts [11]. Fold changes in gene expression were calculated using the normalized gene expression ( $\Delta\Delta Cq$ ) calculation method of the CFX software manager (v.2.1: Bio-Rad). The non-infected cells group was used as the calibrator reference in the analysis. The results originated from at least three independent experiments.

### 3.6. Cytotoxicity

The cell supernatants from infected cells under different assay conditions were used for LDH detection using the Cyto Tox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity assay kit (Promega, Madison, WI) according to manufacturer's instructions. Medium from non-infected cells and supernatant from non-infected cells lysed in pure cold water were used as negative and positive controls, respectively.

### 3.7. Effect of *S. suis* on *H. parasuis* association to and phagocytosis by PAMs

#### 3.7.1. Association of *H. parasuis* to PAMs by FACS

In order to evaluate *H. parasuis* association to PAMs by flow cytometry (FACS), bacteria were first stained. Five milliliters of a *H. parasuis* bacterial suspension of an  $OD_{600nm}$  of 1.0 were incubated with 2 ng/ml of fluorescein isothiocyanate (FITC; Sigma-Aldrich) for 45 min at 37 °C with agitation [16]. Bacteria were washed three times with PBS supplemented with 1 % (v/v) of FBS. Tenfold dilutions were plated on chocolate agar to determine the final concentration of bacteria. Then, PAMs were infected with 5 ml of stained *H. parasuis* (MOI: 500) suspension. Plates were incubated for 2 h at 37 °C, followed by two washes with warm PBS and cells were harvested with a scraper in PBS supplemented with 1 % (w/v) bovine serum albumin (Difco) [16]. The effect of a pre-infection with *S. suis* on the association of *H. parasuis* to PAMs was evaluated by a pre-treatment of the cells with virulent or intermediate virulent *S. suis* strains (MOI: 50) by replacing the cell culture media with 5 ml of the unstained *S. suis* suspension, and by incubating the plates at 37 °C for 1 h, followed by



FITC-stained *H. parasuis* infection as described above. Mock-infected and cells infected with unstained *S. suis* only were used as control. Different MOIs were evaluated in pre-standardization tests in order to select the above indicated experimental conditions.

### 3.7.2. Phagocytosis of *H. parasuis* by PAMs by the antibiotic-protection assay

The viable intracellular count of *H. parasuis* was also assessed to determine the effect of *S. suis* on its phagocytosis by PAMs. Cell culture media was replaced by a suspension of *S. suis* ST1 strain P1/7 (MOI: 100) and the plates were centrifuged at 800 x g for 10 min. Non-infected cells were included as controls. Cells were then further incubated 30 or 60 min, and cell culture medium was replaced with a suspension of *H. parasuis* (MOI :100). Plates were centrifuged and phagocytosis was left to proceed for 2 h, to allow optimal phagocytosis, determined during preliminary studies with different incubation times and MOIs. After incubation, cell monolayers were washed twice with PBS and incubated 2 h with medium containing antibiotics to kill extracellular bacteria, as described above. Supernatant controls were taken during every test to confirm the activity of the antibiotics. After antibiotic treatment, cell monolayers were washed three times with PBS, lysed with water and vigorous pipetting, and viable intracellular bacteria determined by plating appropriate dilutions as described above. Each test was repeated at least three times (with cells from 3 different animals) in independent experiments and the number of CFU/mL was determined as described above. To confirm the phagocytosis activity of the cells, a non-encapsulated *S. suis* mutant was used as positive control [41] (Table 1). Lysed cells and internalized bacteria were plated on chocolate agar (Oxoid) and incubated for 24-48 h at 37 °C. A bacterial count was performed to determine the rate of *H. parasuis* phagocytosed by PAMs.

### 3.8. Statistical analysis

All data are expressed as means  $\pm$  standard errors. SigmaPlot Software (v.11.0) was used for data analysis. Significance was determined with one-way analysis of variance (ANOVA)

or Student's unpaired t test where appropriate depending on the experiment. *P* values of  $< 0.05$  were considered significant. Results reflect mean values from at least three independent experiments.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *2.1. Co- or sequential infections of swine tracheal epithelial cells by *S. suis* and *H. parasuis* has no impact on their adhesion/invasion capacities*

Both *H. parasuis*, as *S. suis*, first colonize pigs in their upper respiratory tract [2], through adhesion and, to some extent, invasion of epithelial cells [15]. To determine the effect of a co-infection on the early steps of infection in swine, the adhesion to and the invasion of swine epithelial cells from upper respiratory tract (NPTr) by strains of *S. suis* and *H. parasuis* of different virulence was evaluated. For the first time, individual cell adhesion of both bacterial species was compared within the same study and under the same conditions. All studies have been done under non-toxic conditions (< 15%), as revealed by the lactate dehydrogenase (LDH) test (results not shown).

As shown in Figure 1A, after 2 h of single infection and an MOI of 5, both high virulent and intermediate virulent *S. suis* serotype 2 strains presented similar level of adhesion to swine tracheal epithelial cells. Similar results were observed when using different MOIs and incubation times (results not shown). Obtained results were similar to what has previously been described for this pathogen [19]. Most *S. suis* adhesion studies previously done used the low relevant human epithelial cell line HEp-2 [9]. In fact, only two studies have been carried out with swine tracheal epithelial cells and *S. suis*, both also showing similar adhesion levels to those observed in the present study [19-21]. Interestingly, the intermediate virulent North American ST25 strain presented similar adhesion levels than the high virulent ST1 strain (Figure 1A). Previous studies with *S. suis* serotype 2 have exclusively used virulent ST1 strains, which produce an hemolysin, called suilysin [22]. In fact, suilysin was shown to have a positive effect on *S. suis* adhesion to epithelial cells in absence of CPS [23]. However, the ST25 North-American strain used in this study (as well as all ST25 strains described so far) does not produce the suilysin, indicating that in the presence of the CPS this hemolysin might not be a critical factor for adhesion. Similar very low invasion rates have been obtained for both strains (Figure 1B), which confirm a previous study using an ST1 strain and the same

cells [20]. This may suggest that high and intermediate virulent strains do not differ in these first steps of the pathogenesis of *S. suis* and differences may probably take place during the systemic phase.

The virulent *H. parasuis* Nagasaki strain adhered to epithelial cells in similar levels than both *S. suis* strains (Figure 1A). However, the low-virulent *H. parasuis* strain F9 adhered in significantly higher levels when compared to all other strains ( $p < 0.05$ ) (Figure 1A). Similar results were observed when using different MOIs and incubation times (results not shown). Adherence of Nagasaki strain to epithelial cells has been previously shown [15,24]. Interestingly, in those studies, authors showed higher levels of adhesion for this strain to renal epithelial cells, when compared to the low-virulent strain SW114 [15,24]. These results differ from those obtained in the present study; it is difficult to establish if differences in adhesion between SW114 and F9 strains are really due to their virulence potential or to the cell type (tracheal vs renal) used in the adhesion test and further studies are needed to obtain a definitive conclusion. Two previous studies also showed similar low levels of adhesion with Nagasaki strain and NPTr cells [25,26]. In the present study, both strains of *H. parasuis* presented very low levels of invasion (less than 1 bacteria internalized per 2000 cells) (Figure 1B), and no significant differences were observed between the strains. Invasion of *H. parasuis* to epithelial cells is still controversial and, as it is the case for adhesion, there are important differences between results obtained from renal and respiratory epithelial cells [15,24-26].

When the two bacterial species were used simultaneously, no differences in the adhesion of *S. suis* or *H. parasuis* could be detected when compared to those observed with individual infections (Figure 2). Similarly, a pre-infection with *S. suis* did not have any effect on *H. parasuis* adhesion to cells and vice-versa (Figure 2). All results were identical independently of the virulence of the strain. Even the use of a first bacterial species at an MOI: 500 to attempt to block cell receptors during the pre-infection did not influence the adhesion of the second bacterial species (results not shown). Similarly, it has not been possible to observe any

significant difference in the bacterial invasion of the tracheal cells during co-infections or pre-infections compared to single infections (results not shown). All these results indicate that these bacterial species probably use different cell receptors. Knowledge on epithelial cell host receptors recognized by *S. suis* is limited [8]. A sialic acid-rich carbohydrate receptor (NeuNAca2-3Galb1-4GlcNAcb1-3Gal), host cell surface glycosaminoglycans and the globotriaosylceramide (GbO3) have all been suggested as possible receptors for epithelial cells [8]. On the other hand, receptors involved in *H. parasuis* adhesion/invasion of epithelial cells are unknown.

*2.2. H. parasuis induces a higher expression of pro-inflammatory cytokines by tracheal porcine epithelial cells and primary alveolar macrophages than S. suis, and co-infections only partially modulate this expression*

Inflammation seems to be a hallmark of *S. suis* infections [3]. Although it is not a typical respiratory pathogen, *S. suis* may complicate infections caused by other aetiological agents of the Porcine Respiratory Disease Complex, such as influenza [20]. It is generally accepted that one of the main role of *S. suis* would be to increase local inflammation [11]. As such, *S. suis* is able to induce inflammatory mediators from respiratory epithelial cells [11,20]. Interestingly, only one study addressed the inflammatory response of PAMs by *S. suis* [27]. Remarkably, the latter as well as all other studies of *S. suis* serotype 2 and swine cells have all been performed with virulent ST1 strains, and almost no information is available for North American strains belonging to other STs of lower virulence.

On the other hand, it has also been described that inflammation is an important player in the pathogenesis of the Glässer's disease [2]. It has been previously shown that epithelial cells may highly contribute to local inflammation observed with this pathogen [25]. In addition, if *H. parasuis* reaches the lungs, virulent strains resist to phagocytosis by PAMs and delay the activation of those cells, leading to bacterial multiplication in the lung and, ultimately, the release of inflammatory mediators resulting in pneumonia and polyserositis [16,28]. For

unknown circumstances, strains with a low-virulent profile (based on autotransporters analysis) are, in some cases, isolated from lungs of pigs with pneumonia, which may indicate they are low phagocytosed [18]. *H. parasuis* would then induce the production of IL-6 and IL-8 and the apoptosis of respiratory epithelial cells, which may lead to its entry into the bloodstream [25,29].

In the present study, we aimed to compare the inflammatory response of respiratory epithelial cells and PAMs infected with strains of *H. parasuis* and/or *S. suis* of different virulence. As it was the case with epithelial cells, PAM studies were done under non-toxic conditions (results not shown). First, swine tracheal epithelial cells and PAMs were infected with *S. suis* or *H. parasuis* alone in order to compare the expression of pro-inflammatory cytokines induced by each species and according to the virulence of the strains (Figures 3 & 4, respectively). Cells were infected for 6 h (NPTr) or 12 h (PAMs) and a quantitative RT-PCR was performed to assess the relative expression of IL-6 and IL-8, normalized by using Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Hypox) genes, and compared to the expression in non-infected cells. These incubation times were shown to be optimal for gene expression under non-toxic conditions during preliminary studies (results not shown). In general, *H. parasuis*, whether it is the virulent or the low-virulent strain, induced a higher expression of IL-6 and IL-8 by the epithelial cells during single infections than *S. suis*. Indeed, the latter induced a limited expression of both cytokines (Figure 3). *S. suis* and *H. parasuis* have been described to activate cells through Toll-like receptors (TLR) [30,31], some of them (such as TLR2 and 6) being common to both species. However, the role of each receptor is probably different, being *H. parasuis* and *S. suis* a Gram-negative and a Gram-positive microorganism, respectively. Only two studies are available in the literature concerning cytokine expression by epithelial cells infected with *H. parasuis* [25,32]. Although some differences were observed in one of these studies when field strains of serotypes 4 and 5 were compared [25], this does not seem to be related to the virulence of the strain. In this study, the low-virulent F9 strain induced higher levels of IL-8 expression than the virulent strain, which might be related to the higher capacity of this strain to adhere to

cells. Additional strains should be tested to reach a definitive conclusion. In the case of *S. suis*, expression of both cytokines with high-virulent strains has been previously shown with these cells [11]. Interestingly, the high-virulent P1/7 strain induced a higher expression of IL-6 ( $4.03 \pm 1.28$ ) and IL-8 ( $4.02 \pm 0.80$ ) than the intermediate virulent 89-1591 strain ( $1.75 \pm 0.99$  and  $2.44 \pm 0.63$ , respectively) (Figure 3). Whether or not the capacity to stimulate epithelial cells by strains of different virulence has an influence on the pathogenesis of the infection remains to be confirmed.

When epithelial cells were co-infected with the highly virulent ST1 *S. suis* P1/7 and *H. parasuis* Nagasaki strains, only an additive effect on the expression of IL-6 and IL-8 was observed (Figure 3). However, a synergic effect ( $p < 0.05$ ) on the expression of both cytokines could be observed with a co-infection of the low-virulent strain F9 and the highly virulent strain P1/7 (Figure 3). These results might indicate that a virulent strain of *S. suis* may positively modulate the expression of pro-inflammatory cytokines in the presence of a low-virulent *H. parasuis* strain, which might increase the local virulence in the presence of both bacterial species. However, more strains of known virulence should be tested before this hypothesis is confirmed.

In infected PAMs, *H. parasuis* strains also induced higher levels of IL-6 and IL-8 mRNA than both *S. suis* strains (Figure 4). In addition, the low-virulent F9 strain induced statistically higher levels of IL-6 (Figure 4A) and IL-8 (Figure 4B) than the virulent strain Nagasaki, probably due to higher levels of bacterial association to cells (see below). As observed with epithelial cells, *S. suis* high-virulent P1/7 strain induced higher IL-6 RNA levels (Figure 4A) than the intermediate-virulence 89-1591 strain. When analyzing co-infections, neither a clear additive nor a synergistic effect on the expression of IL-6 was observed when the PAMs were infected with *S. suis* and *H. parasuis* strains (Figure 4A). An additive effect on the expression levels of IL-8 by PAMs co-infected with *S. suis* intermediate virulent strain (89-1591) and virulent *H. parasuis* Nagasaki strain was observed (Figure 4B). Other strain combinations did

not present any additive or synergistic effect. Overall, these results differ from those observed with co-infected epithelial cells.

### 2.3. *S. suis* has no effect on *H. parasuis* association to or phagocytosis by PAMs

It has been previously reported that low virulent strains of *H. parasuis* present higher levels of association with PAMs than virulent strains [16]. Accordingly, in the present study, the non-virulent F9 strain presented a significant higher level of association to PAMs than the Nagasaki strain, in terms of % of positive cells as well as in mean fluorescence intensity levels (MFI) (Figure 5). To evaluate a possible role of *S. suis* on *H. parasuis* association to PAMs, cells were pre-infected with the high-virulent *S. suis* P1/7 strain followed by *H. parasuis* strains. Interestingly, a pre-infection with *S. suis* did not change the association levels of any of the *H. parasuis* strains (Figure 5), confirming that these two bacterial species use different receptors.

As mentioned, in the lungs, low-virulent strains of *H. parasuis* can be eliminated through phagocytosis by macrophages [16]. *H. parasuis* is a ubiquitous bacterium in the upper respiratory tract of conventional pigs, which may be the reason that some strains from the upper respiratory tract may sometimes be found in the lungs. On the other hand, in some cases, strains with a low-virulent profile can be isolated from lungs of affected animals [18]. Since clinical cases of *H. parasuis* can be present in some farms as a consequence of co-infections (such as Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) [12], it is possible that under those circumstances low-virulent strains are able to induce disease. In the present study, only the low-virulent F9 strain could be recovered intracellularly in the antibiotic-protection assay with PAMs (Figure 6). Indeed, the high-virulent Nagasaki strain could be hardly found inside these cells and could not be recovered in most of the experiments (not shown). Similarly, very low levels of phagocytosis of this strain has previously been reported [16].



It has been proposed that the *S. suis* is able to destabilize the lipid rafts on the surface of macrophages which contain lactosylceramide, preventing the phagocytosis of encapsulated strains [10]. In this way, *S. suis* prevents phagocytosis and remains extracellular [3]. This effect would be attributed to the CPS, since the use of purified CPS was able to inhibit not only the phagocytosis of a non-encapsulated *S. suis* strain but also that of an heterologous species (Group B *Streptococcus*) [10]. We hypothesized that *S. suis* may prevent phagocytosis of low-virulent *H. parasuis* which would allow the latter to replicate extracellularly and increase the inflammatory reaction and causing disease. However, our results do not seem to support such hypothesis. A pre-treatment of the cells with encapsulated *S. suis* for 30 or 60 min did not affect the phagocytosis of the *H. parasuis* low-virulent F9 strain as shown by similar levels of bacteria recovered from the wells (Figure 6). It has been suggested that phagocytosis of *H. parasuis* is probably not dependent on a specific receptor, since phagocytosis of low-virulence strains was not affected by the presence high-virulent strains [16].

## CONCLUSIONS

This study showed that a low-virulence strain of *H. parasuis* adheres to swine respiratory epithelial cells and PAMs at higher levels than a virulent strain as well as both *S. suis* strains. In addition, *H. parasuis* induce a significant higher level of pro-inflammatory cytokines than *S. suis* from both cell types. Within *H. parasuis* strains, the low-virulent F9 strain induces in general higher levels of pro-inflammatory cytokines than the virulent Nagasaki strain. Finally, this study has shown that, overall and under *in vitro* conditions, *S. suis* and *H. parasuis* have limited interactions between them, regardless to their level of virulence. Although it has been previously described that the CPS of *S. suis* serotype 2 has anti-phagocytic properties against an heterologous bacterial species, pre-treatment of PAMs did not have a clear effect on the phagocytosis of a low-virulence strain of *H. parasuis*. Although not clear interactions could be observed between the two bacterial species in the present study, further *in vitro* experiments (such as biofilm formation), a higher number of tested strains as well as *in vivo* studies should be carried out to reach more definitive conclusions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr. Paul Lemire and Léa Martelet (University of Montreal) for their technical help. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC grant #154280 to MG) and partially by the IX<sup>e</sup> Comité mixte Québec-Catalogne 2017-2019 to MG, MS and VA.

## TABLES

**Table 1. *Streptococcus suis* serotype 2 and *Haemophilus parasuis* strains used in this study**

Strain	ST or serovar	Country	Host	Virulence/Sly	Reference
<b><i>S. suis</i> serotype 2</b>					
P1/7	1	UK	Pig	High virulent/Yes	[35]
89-1591	25	Canada	Pig	Intermediate virulent/No	[36,37]
<b><i>H. parasuis</i></b>					
F9	6	Spain	Pig	Low-virulent	[28]
Nagasaki	5	Japan	Pig	Virulent	[38]

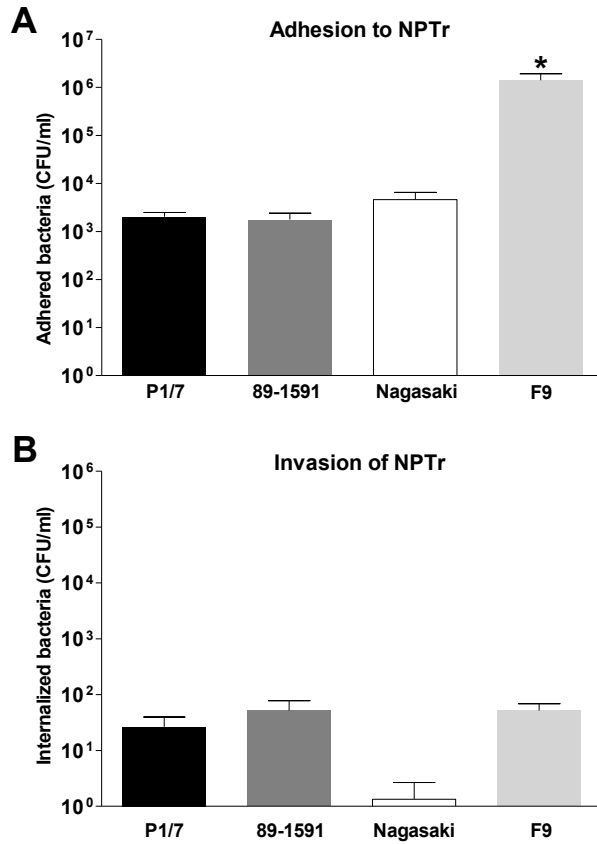
ST, sequence type as describe by multilocus sequence typing; Sly, presence of suilysin.

**Table 2. Porcine-specific primer sequences used in the study for pro-inflammatory cytokine detection by real-time quantitative RT-qPCR**

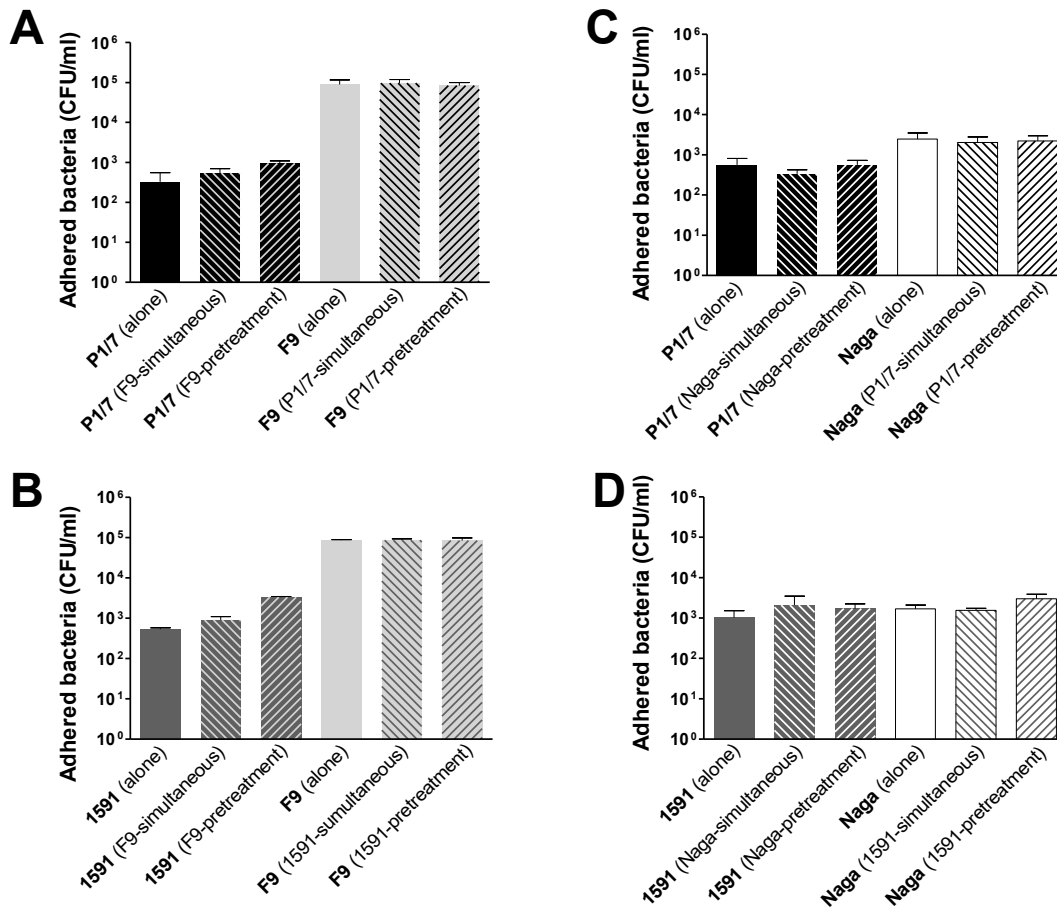
Gene name	Forward	Reverse
<b>IL-6</b>	ACTCCCTCTCCACAAGCGCCTT	TGGCATCTTCTTCCAGGCGTCCC
<b>IL-8</b>	TGTGAGGCTGCAGTTCTGGCAAG	GGGTGGAAAGGTGTGGAATGCGT
<b>Hypox</b>	GCAGCCCCAGCGTCGTGATT	CGAGCAAGCCGTTTCAGTCCTGT
<b>PPIA</b>	TGCAGACAAAGTTCCAAAGACAG	GCCACCAGTGCCATTATGG

**Hypox**, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; **PPIA**, Peptidylprolyl isomerase A.

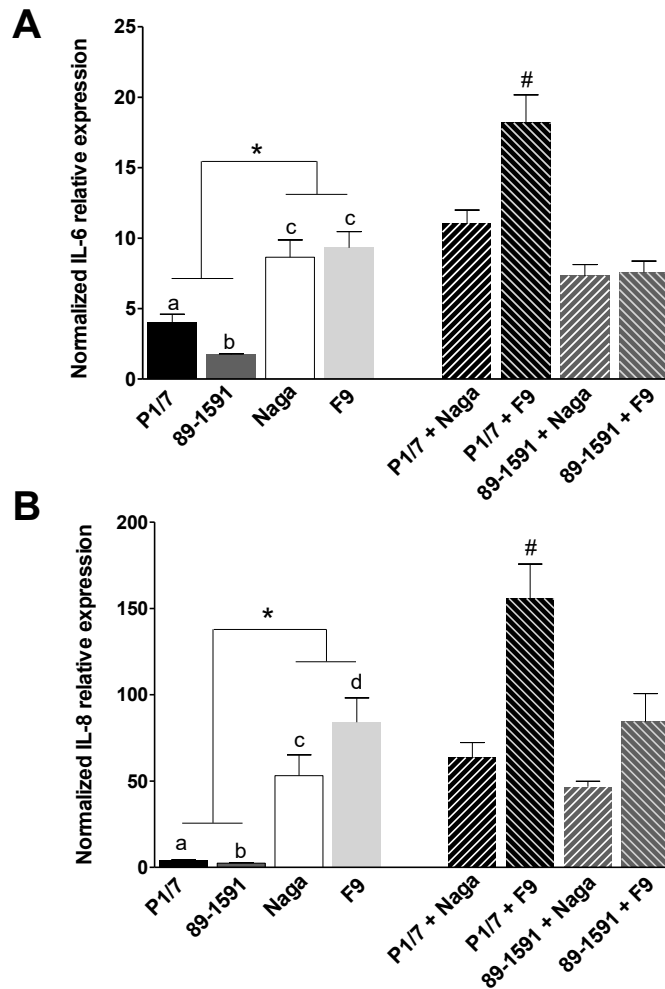
# FIGURES



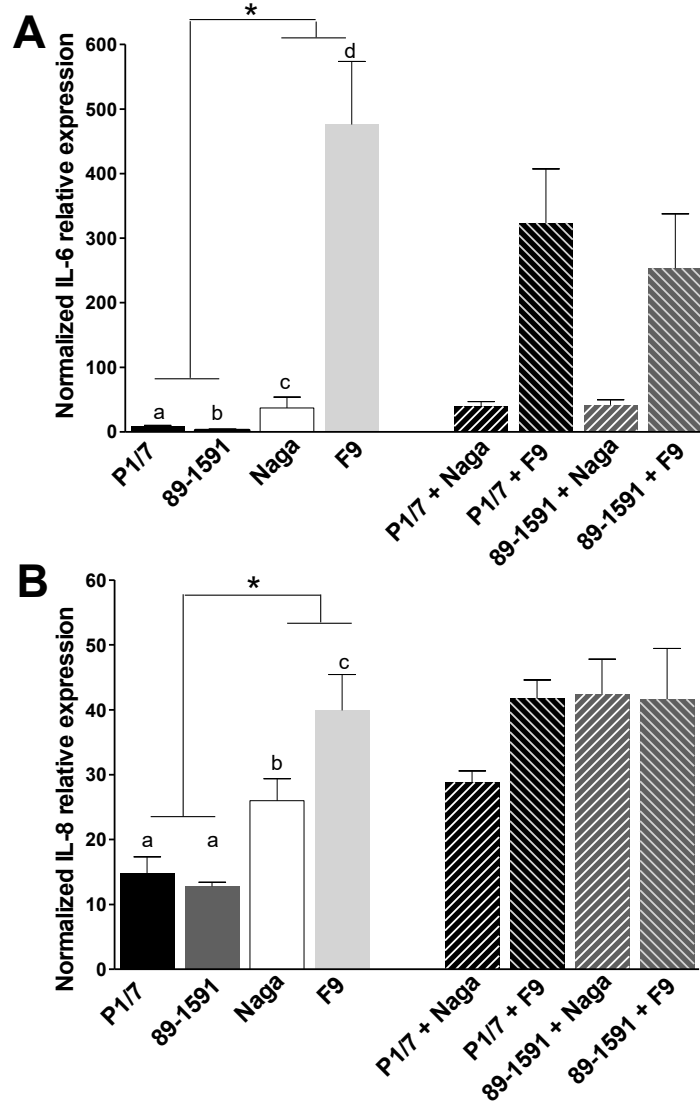
**Figure 1.** Adhesion to and invasion of neonatal porcine tracheal (NPTr) epithelial cells by *S. suis* or *H. parasuis* strains of different virulence. NPTr cells were infected with *S. suis* serotype 2 strains P1/7 (high virulence) or 89-1591 (intermediate virulence), or with *H. parasuis* strains Nagasaki (high virulence) or F9 (low virulence) with a MOI of 5 for 2 h. (A) After the incubation time, cells were washed to remove non-adherent bacteria and lysed in pure water to determine the number of adherent bacteria per well. (B) Infected cells were washed and cell culture media was replaced by fresh media with antibiotics and further incubated for 2 h in order to kill extracellular bacteria. Cells were washed to remove the antibiotics and lysed in pure cold water to release internalized bacteria. Levels of adhesion/invasion are expressed as the total number of colony forming units (CFU) recovered per well. Data are expressed as means  $\pm$  standard errors from at least four independent experiments. An asterisk indicates significant differences between samples ( $p < 0.05$ ).



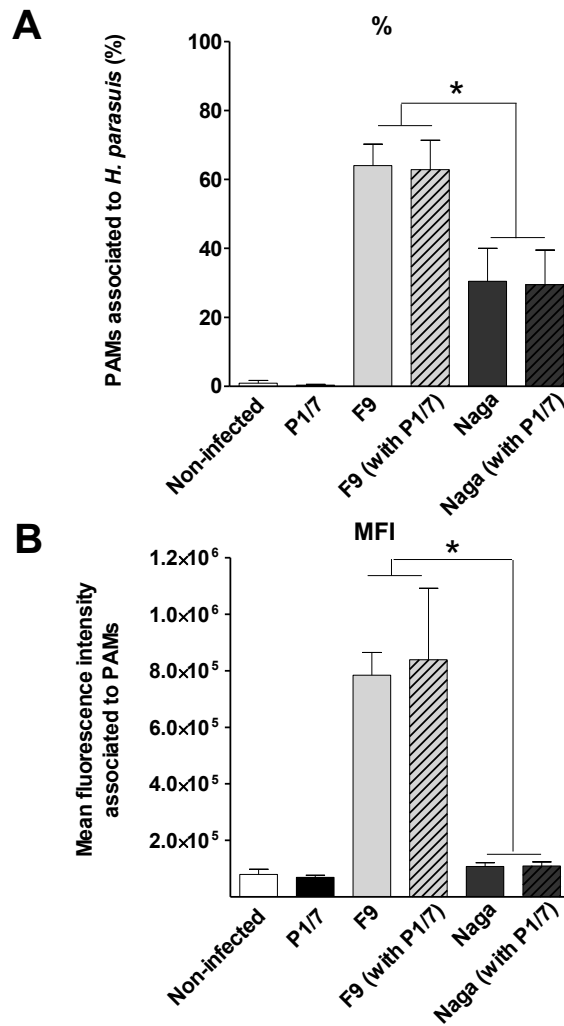
**Figure 2.** Adhesion of *S. suis* and *H. parasuis* strains of different virulence to neonatal porcine tracheal (NPTTr) epithelial cells either alone or in simultaneous or sequential co-infections. NPTTr cells were pre-infected with *S. suis* or with *H. parasuis* strains (MOI of 5) for 15 min. Cells were then washed and infected with *H. parasuis* or *S. suis* strains, respectively (MOI of 5) and further incubated for 2 h. Separate wells were also kept with cell culture media (mock infected) as controls. In parallel experiments, cells were infected with both bacterial species simultaneously and also incubated for 2 h. Cells were washed to remove non-adherent bacteria and lysed in pure water to liberate adherent bacteria. Levels of adhesion are expressed as the total number of colony forming units (CFU) recovered per well. Full bars match single infections. Hatched bars match co-infections. A) Adhesion of high-virulent P1/7 and low-virulent F9 in co-infection. B) Adhesion of intermediate-virulent 89-1591 and low-virulent F9 in co-infection. C) Adhesion of high-virulence P1/7 and high-virulent Nagasaki (Naga) during co-infection. D) Adhesion of intermediate virulent 89-1591 and high-virulent Nagasaki in co-infection. Data are expressed as means  $\pm$  standard errors from at least four independent experiments.



**Figure 3.** Normalized relative expression of IL-6 (A) and IL-8 (B) by neonatal porcine tracheal (NPTr) epithelial cells during single and simultaneous co-infections with *S. suis* and *H. parasuis*. Cells were infected with *S. suis* (high-virulent P1/7 or intermediate virulent 89-1591 strains) or with *H. parasuis* (low-virulent F9 or high-virulent Nagasaki [Naga] strains) alone or in simultaneous co-infections for 6 h. Gene expression levels were analysed by RT-qPCR and normalized with the expression of PPIA and Hypox. Relative fold differences were calculated compared to non-infected cells. Data represent mean values  $\pm$  standard errors of the mean from at least four independent experiments. Full bars show results from single infections. Hatched bars show results from simultaneous co-infections. A letter indicates significant differences between samples ( $p < 0.05$ ). \*, indicates significant differences between *S. suis* and *H. parasuis* strains ( $p < 0.05$ ). #, indicates significant synergistic effect on cytokine production when compared respective single infections ( $p < 0.05$ ).



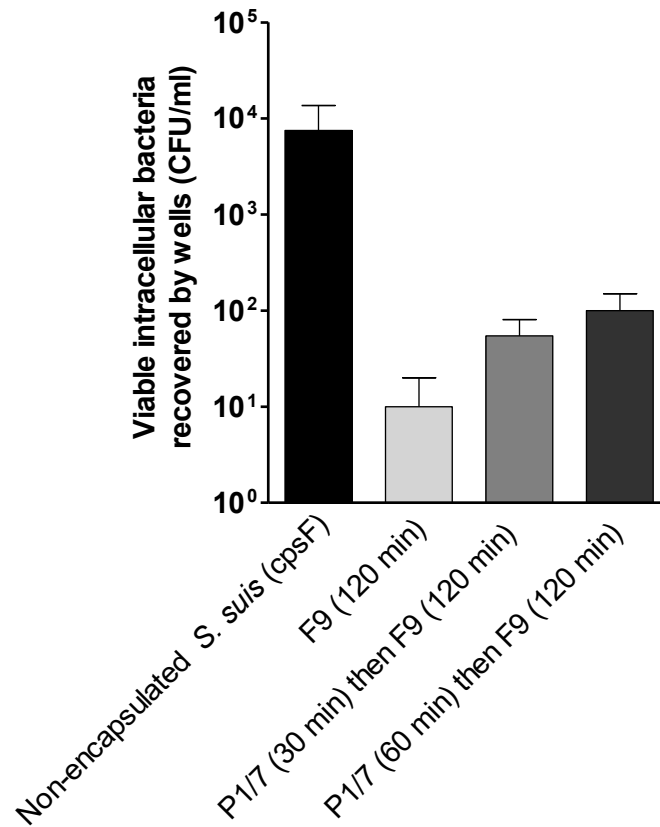
**Figure 4.** Normalized IL-6 (A) and IL-8 (B) relative expression by primary alveolar macrophages (PAMs) after single and simultaneous co-infections with *S. suis* and *H. parasuis*. PAMs were infected with either *S. suis* (high and intermediate virulent P1/7 and 89-1591 strains, respectively) or with *H. parasuis* (high and low virulent Nagasaki [Naga] and F9 strains, respectively) alone or in simultaneous co-infection for 12 h. Expression of genes was analysed by RT-qPCR and normalized with the expression of PPIA and Hypox genes. Relative fold differences were calculated compared to the non-infected cells. Data represent mean values  $\pm$  standard errors of the mean from at least four independent experiments. Full bars show results from single infections. Hatched bars show results from simultaneous co-infections. A letter indicates significant differences between samples ( $p < 0.05$ ). \*, indicates significant differences between *S. suis* and *H. parasuis* strains ( $p < 0.05$ ).



**Figure 5.** Association of *H. parasuis* to primary alveolar macrophages (PAMs) assessed by FACS. PAMs were incubated with a FITC-stained *H. parasuis* bacterial suspension at a MOI of 500 for 2 h. Cells were then washed and harvested in PBS with bovine serum albumine. The percentage of cells associated with *H. parasuis* (A) and the quantity of *H. parasuis* associated per cells, given by the mean fluorescence intensity (MFI) values (B), were determined by FACS. The effect of a pre-infection with *S. suis* on the association of *H. parasuis* to PAMs was evaluated through a pre-treatment of the cells with unstained *S. suis* P1/7 strain (MOI: 50) for 1 h. Mock infected and cells infected with unstained *S. suis* P1/7) alone were used as negative controls. Data are expressed as means  $\pm$  standard errors from at least four independent experiments. An asterisk indicates significant differences between samples ( $p < 0.05$ ).

**Naga** = Nagasaki





**Figure 6.** Phagocytosis of *H. parasuis* by primary alveolar macrophages (PAMs) as assessed by the antibiotic-protection assay. PAMs were incubated in presence of low-virulent *H. parasuis* F9 strain with a MOI: 100 for 120 min, washed and antibiotics were added to cell culture media and incubated for additional 120 min. PAMs were washed and lyzed in cold water to disrupt cell membranes in order to release intracellular bacteria. The suspension was plated on chocolate agar and colony forming units (CFU) were counted after an incubation time of 24-48 h. The effect of a pre-infection with *S. suis* P1/7 strain on the phagocytosis of *H. parasuis* to PAMs was evaluated after a pre-treatment of cells with *S. suis* (MOI: 100) for 30 or 60 min. Cells infected with non-encapsulated *S. suis* were used as positive control to confirm the phagocytosis capacity of the cells. Data are expressed as means ± standard errors from at least three independent experiments.

## REFERENCES

1. Gottschalk, M.; Segura, M.; Xu, J. *Streptococcus suis* infections in humans: The chinese experience and the situation in north america. *Anim Health Res Rev* **2007**, *8*, 29-45.
2. Costa-Hurtado, M.; Aragon, V. Advances in the quest for virulence factors of *Haemophilus parasuis*. *Vet J* **2013**, *198*, 571-576.
3. Fittipaldi, N.; Segura, M.; Grenier, D.; Gottschalk, M. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol* **2012**, *7*, 259-279.
4. Okura, M.; Osaki, M.; Nomoto, R.; Arai, S.; Osawa, R.; Sekizaki, T.; Takamatsu, D. Current taxonomical situation of *Streptococcus suis*. *Pathogens* **2016**, *5*.
5. Zheng, H.; Qiu, X.; Roy, D.; Segura, M.; Du, P.; Xu, J.; Gottschalk, M. Genotyping and investigating capsular polysaccharide synthesis gene loci of non-serotypeable *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in canada. *Vet Res* **2017**, *48*, 10.
6. 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.
7. Fittipaldi, N.; Xu, J.; Lacouture, S.; Tharavichitkul, P.; Osaki, M.; Sekizaki, T.; Takamatsu, D.; Gottschalk, M. Lineage and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from north america. *Emerg Infect Dis* **2011**, *17*, 2239-2244.
8. Segura, M.; Calzas, C.; Grenier, D.; Gottschalk, M. Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: Fighting against nonspecific defenses. *FEBS Lett* **2016**, *590*, 3772-3799.
9. Segura, M.; Fittipaldi, N.; Calzas, C.; Gottschalk, M. Critical *Streptococcus suis* virulence factors: Are they all really critical? *Trends Microbiol* **2017**, *25*, 585-599.
10. Houde, M.; Gottschalk, M.; Gagnon, F.; Van Calsteren, M.R.; Segura, M. *Streptococcus suis* capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition. *Infect Immun* **2012**, *80*, 506-517.
11. Dang, Y.; Lachance, C.; Wang, Y.; Gagnon, C.A.; Savard, C.; Segura, M.; Grenier, D.; Gottschalk, M. Transcriptional approach to study porcine tracheal epithelial cells individually or dually infected with swine influenza virus and *Streptococcus suis*. *BMC Vet Res* **2014**, *10*, 86.

12. Oliveira, S.; Pijoan, C. *Haemophilus parasuis*: New trends on diagnosis, epidemiology and control. *Vet Microbiol* **2004**, *99*, 1-12.
13. Ma, L.; Wang, L.; Chu, Y.; Li, X.; Cui, Y.; Chen, S.; Zhou, J.; Li, C.; Lu, Z.; Liu, J., *et al.* Characterization of chinese *Haemophilus parasuis* isolates by traditional serotyping and molecular serotyping methods. *PLoS One* **2016**, *11*, e0168903.
14. Lacouture, S.; Rodriguez, E.; Strutzberg-Minder, E.; Gottschalk, M. Serotyping of *Haemophilus parasuis* field isolates from diseased pigs in quebec by indirect hemagglutination assay and multiplex polymerase chain reaction (pcr). *Can Vet J* **In Press**.
15. Frandoloso, R.; Martinez-Martinez, S.; Gutierrez-Martin, C.B.; Rodriguez-Ferri, E.F. *Haemophilus parasuis* serovar 5 nagasaki strain adheres and invades pk-15 cells. *Vet Microbiol* **2012**, *154*, 347-352.
16. Olvera, A.; Ballester, M.; Nofrarias, M.; Sibila, M.; Aragon, V. Differences in phagocytosis susceptibility in *Haemophilus parasuis* strains. *Vet Res* **2009**, *40*, 24.
17. Boerlin, P.; Poljak, Z.; Gallant, J.; Chalmers, G.; Nicholson, V.; Soltes, G.A.; MacInnes, J.I. Genetic diversity of *Haemophilus parasuis* from sick and healthy pigs. *Vet Microbiol* **2013**, *167*, 459-467.
18. Galofre-Mila, N.; Correa-Fiz, F.; Lacouture, S.; Gottschalk, M.; Strutzberg-Minder, K.; Bensaid, A.; Pina-Pedrero, S.; Aragon, V. A robust pcr for the differentiation of potential virulent strains of *Haemophilus parasuis*. *BMC Vet Res* **2017**, *13*, 124.
19. Ferrando, M.L.; de Greeff, A.; van Rooijen, W.J.; Stockhofe-Zurwieden, N.; Nielsen, J.; Wichgers Schreur, P.J.; Pannekoek, Y.; Heuvelink, A.; van der Ende, A.; Smith, H., *et al.* Host-pathogen interaction at the intestinal mucosa correlates with zoonotic potential of *Streptococcus suis*. *J Infect Dis* **2015**, *212*, 95-105.
20. Wang, Y.; Gagnon, C.A.; Savard, C.; Music, N.; Srednik, M.; Segura, M.; Lachance, C.; Bellehumeur, C.; Gottschalk, M. 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* **2013**, *81*, 4498-4508.
21. Ferrando, M.L.; Fuentes, S.; de Greeff, A.; Smith, H.; Wells, J.M. Apua, a multifunctional alpha-glucan-degrading enzyme of *Streptococcus suis*, mediates adhesion to porcine epithelium and mucus. *Microbiology* **2010**, *156*, 2818-2828.
22. Tenenbaum, T.; Asmat, T.; Seitz, M.; Schrotten, H.; Schwerk, C. Biological activities of suilysin: Role in *Streptococcus suis* pathogenesis. *Future Microbiol* **2016**, *11*, 941-954.

23. Seitz, M.; Baums, C.G.; Neis, C.; Benga, L.; Fulde, M.; Rohde, M.; Goethe, R.; Valentin-Weigand, P. Subcytolytic effects of sullysin on interaction of *Streptococcus suis* with epithelial cells. *Vet Microbiol* **2013**, *167*, 584-591.
24. Frandoloso, R.; Pivato, M.; Martinez-Martinez, S.; Rodriguez-Ferri, E.F.; Kreutz, L.C.; Martin, C.B. Differences in *Haemophilus parasuis* adherence to and invasion of aoc-45 porcine aorta endothelial cells. *BMC Vet Res* **2013**, *9*, 207.
25. Bouchet, B.; Vanier, G.; Jacques, M.; Auger, E.; Gottschalk, M. Studies on the interactions of *Haemophilus parasuis* with porcine epithelial tracheal cells: Limited role of los in apoptosis and pro-inflammatory cytokine release. *Microb Pathog* **2009**, *46*, 108-113.
26. Auger, E.; Deslandes, V.; Ramjeet, M.; Contreras, I.; Nash, J.H.; Harel, J.; Gottschalk, M.; Olivier, M.; Jacques, M. Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells. *Infect Immun* **2009**, *77*, 1426-1441.
27. de Greeff, A.; Benga, L.; Wichgers Schreur, P.J.; Valentin-Weigand, P.; Rebel, J.M.; Smith, H.E. Involvement of nf-kappab and map-kinases in the transcriptional response of alveolar macrophages to *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* **2010**, *141*, 59-67.
28. Costa-Hurtado, M.; Olvera, A.; Martinez-Moliner, V.; Galofre-Mila, N.; Martinez, P.; Dominguez, J.; Aragon, V. Changes in macrophage phenotype after infection of pigs with *Haemophilus parasuis* strains with different levels of virulence. *Infect Immun* **2013**, *81*, 2327-2333.
29. Fu, S.; Yuan, F.; Zhang, M.; Tan, C.; Chen, H.; Bei, W. Cloning, expression and characterization of a cell wall surface protein, 6-phosphogluconate dehydrogenase, of *Haemophilus parasuis*. *Res Vet Sci* **2012**, *93*, 57-62.
30. Chen, Y.; Liu, T.; Langford, P.; Hua, K.; Zhou, S.; Zhai, Y.; Xiao, H.; Luo, R.; Bi, D.; Jin, H., et al. *Haemophilus parasuis* induces activation of nf-kappab and map kinase signaling pathways mediated by toll-like receptors. *Mol Immunol* **2015**, *65*, 360-366.
31. Lecours, M.P.; Segura, M.; Fittipaldi, N.; Rivest, S.; Gottschalk, M. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS One* **2012**, *7*, e44746.
32. Chen, Y.; Zhou, S.; Hua, K.; Xiao, H.; Li, Z.; Liu, M.; Luo, R.; Bi, D.; Zhou, R.; Jin, H. *Haemophilus parasuis* infection activates chemokine rantes in pk-15 cells. *Mol Immunol* **2015**, *67*, 661-666.
33. 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*.

34. Vanier, G.; Segura, M.; Friedl, P.; Lacouture, S.; Gottschalk, M. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **2004**, *72*, 1441-1449.
35. Auger, J.P.; Christodoulides, M.; Segura, M.; Xu, J.; Gottschalk, M. Interactions of *Streptococcus suis* serotype 2 with human meningeal cells and astrocytes. *BMC Res Notes* **2015**, *8*, 607.
36. Athey, T.B.; Teatero, S.; Takamatsu, D.; Wasserscheid, J.; Dewar, K.; Gottschalk, M.; Fittipaldi, N. Population structure and antimicrobial resistance profiles of *Streptococcus suis* serotype 2 sequence type 25 strains. *PLoS One* **2016**, *11*, e0150908.
37. Holden, M.T.; Hauser, H.; Sanders, M.; Ngo, T.H.; Cherevach, I.; Cronin, A.; Goodhead, I.; Mungall, K.; Quail, M.A.; Price, C., *et al.* Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *PLoS One* **2009**, *4*, e6072.
38. Morozumi, T.; Nicolet, J. Some antigenic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification. *J Clin Microbiol* **1986**, *23*, 1022-1025.
39. Ferrari, M.; Scalvini, A.; Losio, M.N.; Corradi, A.; Soncini, M.; Bignotti, E.; Milanesi, E.; Ajmone-Marsan, P.; Barlati, S.; Bellotti, D., *et al.* Establishment and characterization of two new pig cell lines for use in virological diagnostic laboratories. *J Virol Methods* **2003**, *107*, 205-212.
40. McCaig, W.D.; Loving, C.L.; Hughes, H.R.; Brockmeier, S.L. Characterization and vaccine potential of outer membrane vesicles produced by *Haemophilus parasuis*. *PLoS One* **2016**, *11*, e0149132.
41. Lecours, M.P.; Segura, M.; Lachance, C.; Mussa, T.; Surprenant, C.; Montoya, M.; Gottschalk, M. Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. *Vet Res* **2011**, *42*, 72.

## **IV DISCUSSION**

*S. suis* et *H. parasuis* sont des colonisateurs du tractus respiratoire chez une majorité des porcs d'élevage à travers le monde (MacInnes & Desrosiers, Can J Vet Res, 1999; Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013; Segura *et al*, FEBS Lett, 2016). Bien qu'ils soient souvent présents dans la flore respiratoire normale, ils sont parmi les causes les plus fréquentes de mortalité dans les élevages, causant des maladies inflammatoires sévères (MacInnes & Desrosiers, Can J Vet Res, 1999; Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013; Segura *et al*, FEBS Lett, 2016). Les deux espèces bactériennes sont composées de plusieurs sérotypes, dont les souches possèdent différents niveaux de virulence.

La présence de CPS et la SLY ont été identifiés comme des facteurs de virulence critiques de *S. suis*, ayant notamment un rôle dans l'adhésion aux cellules hôtes et dans l'évasion face au système immunitaire (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012). Ainsi, bien qu'ils soient encore méconnus, *S. suis* possède de nombreux facteurs de virulence qui participent à l'établissement de l'infection, à la survie dans l'hôte ou encore à la réaction inflammatoire (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012). Le phénomène de redondance parmi ces facteurs de virulence, qu'il est possible d'observer avec les protéines liant le facteur H par exemple (Annexe 1 : Roy *et al*, Pathogens, 2016), ainsi que les résultats non homogènes entre les études, rendent difficile l'identification de facteurs de virulence critiques pour l'infection par *S. suis* (Annexe 2 : Auger *et al*, PLoS One, 2017). En effet, bien que nombreux soient les facteurs de virulence identifiés, le design expérimental, la route d'infection, les souches utilisées ainsi que l'absence de gènes dits critiques chez certaines souches virulentes rendent difficile l'analyse de l'importance de ces facteurs de virulence lors de l'infection puisqu'ils fournissent une grande quantité de résultats différents entre les laboratoires (Annexe 2 : Auger

*et al*, PLoS One, 2017). Aussi, la plupart des études ont été réalisées avec des souches provenant de ST les plus souvent isolés de cas cliniques et issus du sérotype 2, alors que d'autres sérotypes sont aussi prévalents chez le porc dans d'autres régions mais dont l'étendue des études les concernant est plus restreinte (sérotypes 1/2, 3, 4, 7, 9 et 14) (Goyette *et al*, Emerg Microbes Infect, 2014).

Le sérotype 2 étant divisé en plusieurs ST, les ST1 et ST7, prédominants en Europe et en Asie, sont associés à une forte virulence et font souvent l'objet des études sur les facteurs de virulence, tandis que les ST25 et ST28 surtout retrouvés en Amérique du Nord, sont associés à une plus faible virulence et sont moins documentés (Goyette-Desjardins *et al*, Emerg Microbes Notes, 2015). À titre comparatif, mais aussi afin d'investiguer l'effet du niveau de virulence de la souche sur les co-infections avec *H. parasuis*, la souche hautement virulente P1/7 (ST1) produisant l'hémolysine SLY (Auger *et al*, BMC Res Notes, 2015), ainsi que la souche 89-1591, de virulence moindre (ST25) et ne produisant pas la SLY (Holden *et al*, PLoS One, 2009; Athey *et al*, PLoS One, 2016), ont été utilisées lors de cette étude. Cette dernière permet aussi de documenter la situation présente en Amérique du Nord en utilisant une souche représentative moins étudiée.

*H. parasuis*, bien qu'il soit divisé en sérotypes, est très hétérogène au sein d'un même sérotype, et une grande partie des souches sont non-typables, ce qui est probablement dû à des problèmes liés aux méthodes utilisées pour la sérotypie (Boerlin *et al*, Vet Microbiol, 2013; Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013). On retrouve des souches virulentes et des souches



non-virulentes avec des localisations différentes chez le porc colonisé (Bello-Orti *et al*, Vet Microbiol, 2014). Les souches peu virulentes sont parfois isolées de porcs malades (Boerlin *et al*, Vet Microbiol, 2013). Plusieurs études comparent des souches virulentes et non ou peu virulentes afin d'identifier les facteurs de virulence associés à cette bactérie (Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013). Les souches virulentes peuvent envahir les cellules épithéliales, produisent une capsule qui les protège de la phagocytose dans les poumons, induisent une forte inflammation et peuvent persister dans le sang (Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013). La pathogenèse induite par *H. parasuis* et l'induction de la maladie chez le porc par des souches peu virulentes sont encore mal comprises. La souche F9 peu virulente (sérovary 6) et la souche virulente de référence Nagasaki (sérovary 5), ont été utilisées à des fins de comparaison, mais aussi pour tenter d'observer l'influence de la virulence de la souche sur les interactions de *H. parasuis* avec *S. suis* (Morozumi & Nicolet, J Clin Microbiol, 1986; Costa-Hurtado *et al*, Infect Immun, 2013). Il est à noter que le sérotype 5 est l'un des sérotypes de *H. parasuis* les plus couramment isolés au Canada (MacInnes & Desrosiers, Can J Vet Res, 1999).

Les premières étapes de colonisation et d'infection par *S. suis* ou *H. parasuis* prennent place dans le tractus respiratoire porcin (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012; Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013). *S. suis* peut coloniser plusieurs espèces animales, mais son hôte principal est le porc. L'Homme peut aussi être affecté (Gottschalk & Segura, Vet Microbiol, 2000). Plusieurs lignées cellulaires d'origine différente ont été utilisées lors des études d'interactions de *S. suis* avec les cellules épithéliales et phagocytaires. Or, *H. parasuis* est un pathogène exclusif du porc, la plupart des études s'y rapportant ont été exécutées avec des cellules d'origine porcine. Dans cette étude, afin d'obtenir des résultats représentatifs de

ce qui se passe *in vivo* lors des premières étapes d'infection lors de co-infections, des cellules épithéliales de trachée porcine et des macrophages alvéolaires porcins primaires ont été utilisés.

Ainsi, comme mentionné plus tôt, *S. suis* et *H. parasuis* colonisent tous deux le tractus respiratoire supérieur du porc, produisent de l'inflammation et induisent la maladie chez les porcelets après le sevrage (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012; Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013). De plus, il est de plus en plus accepté que les infections mixtes soient à l'origine d'un bon nombre de maladies (Opriessnig *et al*, Anim Health Res Rev, 2011). L'hypothèse a donc été émise que la présence des deux espèces bactériennes lors de la colonisation pourrait mener à des interactions entre elles. La CPS de *S. suis*, dont l'effet anti-phagocytaire a été démontré pour *S. suis* mais aussi pour d'autres espèces bactériennes, pourrait donc protéger des souches peu virulentes de *H. parasuis* aux poumons et y permettre sa répllication qui pourrait causer la maladie. L'inflammation induite par les deux espèces pourrait aussi être exacerbée, ayant comme conséquence l'aggravation de la maladie.

## **1. Croissance en co-culture sur milieu solide et planctonique dans le milieu de culture cellulaire en présence des NPTr**

Bien que quelques études portent sur des co-infections virales avec *S. suis* ou *H. parasuis*, pratiquement aucune étude ne s'est intéressée aux co-infections avec *S. suis* et *H. parasuis*. *H. parasuis* est ubiquitaire de la flore respiratoire porcine, et *S. suis* est présent chez bon nombre d'animaux sains, une coexistence au sein d'un même animal est donc

possible. Une étude récente sur leur croissance planctonique et par biofilm rapporte que, lors de co-cultures, la croissance bactérienne de *S. suis* et *H. parasuis* serait modifiée, mais que cet effet dépend des souches utilisées (Barre A.M.E., 2015). Ainsi, afin de s'assurer de la faisabilité des expériences et qu'une compétition ou qu'un désavantage de croissance engendrés par la co-culture n'affectent pas les résultats de cette étude, la croissance des souches utilisées a été testée sur gélose et dans le milieu de culture cellulaire en présence des NPTr.

La co-culture sur géloses a permis de déterminer que la morphologie des colonies pouvait permettre de différencier les deux espèces lors des comptes viables. Comme *H. parasuis* nécessite le NAD pour sa croissance (Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2014), des géloses chocolat, dont les globules rouges sont lysés pour libérer le NAD, ont été utilisées puisqu'elles permettent la croissance de *S. suis* et de *H. parasuis*. Les deux espèces sont facilement identifiables de par leur morphologie, les colonies de *S. suis* étant verdâtres et étendues, tandis que *H. parasuis* produit des colonies blanches, aux rebords réguliers et de plus petite taille, tel qu'illustré à la Figure S1.

Aussi, il n'a pas été possible d'observer dans cette étude les effets montrés précédemment par Barre A.M.E. (2015). En effet, sur gélose chocolat, la croissance de *S. suis* n'a pas désavantagé celle de *H. parasuis*. Une même quantité de bouillon à concentration égale en CFU de *S. suis* (souche P1/7) et de *H. parasuis* (souche F9) a étéensemencée sur gélose chocolat en culture mixte. Comme contrôle, une même quantité de chaque souche a été

inoculée seule sur gélose, et le nombre d'unités formatrices de colonies dénombrées entre les cultures simple et mixte a été comparé. Un nombre de colonies similaire a été dénombré lors de culture simple ou mixte pour *S. suis* et *H. parasuis* (Figure S2). Sur milieu solide, il n'existe donc pas de compétition entre les souches ou de facteurs pouvant moduler leur survie et fausser les résultats, dans les conditions utilisées et avec les souches utilisées.

Puisque différents temps d'incubation en milieu de culture cellulaire sont utilisés lors des expériences, la croissance bactérienne planctonique et l'effet de la culture mixte sur celle-ci a été testée (Figure S3). Durant les premières heures de co-culture, ni la croissance de *S. suis* ni celle de *H. parasuis* ne semble affectée par la co-culture, tel que démontré par les courbes de croissance similaires (Figure S3). Après 12 h de culture, les courbes de croissance en co-culture sont différentes de lors de la culture simple (Figure S3). Les résultats de Barre A.M.E. (2015) suggèrent que la croissance de *S. suis* est plus rapide en présence de *H. parasuis*, et que celle de *H. parasuis* est ralentie par la présence de *S. suis*, et ce, dès les premières heures d'incubation (Barre A.M.E., 2015). Il n'a pas été possible d'observer ces effets sur 24 h d'incubation, dans les conditions expérimentales utilisées. Il est difficile de déterminer l'effet spécifique de *S. suis* ou de *H. parasuis* sur l'autre espèce puisque des conditions de croissance en milieu fermé, une forte concentration bactérienne dès 6 h d'incubation et la génération de beaucoup de déchets pourraient expliquer l'effet sur la viabilité bactérienne après un long temps d'incubation.

## **2. Cytotoxicité des cellules épithéliales de la trachée et des macrophages alvéolaires primaires induite par *S. suis* et *H. parasuis* lors d'infections simples et mixtes**

Des tests de cytotoxicité, évaluée par le niveau de LDH relâché par les cellules lors des infections, ont été effectués en vue de définir la toxicité induite par l'infection des cellules par *S. suis* ou *H. parasuis*, ou lors de co-infections. Il a donc été possible de définir des conditions expérimentales non-toxiques, et de déterminer l'impact des co-infections sur l'induction de la cytotoxicité. Lors d'infections simples et de co-infections, des échantillons du surnageant de cellules ont été analysés à différents temps et la cytotoxicité a été mesurée, en comparaison à des cellules non-infectées ou lysées dans l'eau distillée froide, servant de contrôles négatif et positif, respectivement. Un seuil de 30 % de cytotoxicité a été établi pour déterminer que les conditions expérimentales étaient non-toxiques pour les cellules.

Pour les NPTr (Figure S4A), à une MOI de 10, les infections simples avec *S. suis* (P1/7 et 89-1591) et *H. parasuis* (F9 et Nagasaki) sont non-cytotoxiques à tous les temps, bien qu'une augmentation du pourcentage de cytotoxicité est observée en fonction du temps d'infection (Figure S4A). À 12 et 24 h, la cytotoxicité est généralement potentialisée lors des co-infections avec P1/7 et *H. parasuis* (12 et 24 h) et avec 89-1591 et F9 (24 h seulement) (Figure S4A). La colonisation des voies respiratoires par *S. suis* et *H. parasuis* simultanément pourrait donc favoriser le bris de la barrière épithéliale et favoriser l'entrée dans la circulation sanguine. Cependant, comme mentionné plus tôt, *S. suis* et *H. parasuis* croissent en présence des NPTr dans un système fermé, et une forte concentration bactérienne est atteinte après 6 h d'incubation, même lors d'infections simples (Figure S3). L'effet cytotoxique pourrait donc

plutôt être attribué au système *in vitro* qui accumule les déchets générés par la culture cellulaire et bactérienne. L'adhésion bactérienne élevée aux cellules et l'activation des cellules qui s'ensuit (voir point 6) pourraient aussi mener à cet effet cytotoxique. Il a déjà été démontré que la SLY est toxique à de fortes concentrations pour les cellules épithéliales (Lalonde *et al*, Microbiology, 2000; Seitz *et al*, Vet Microbiol, 2013). Cependant, des cellules rénales porcines ou laryngales humaines avaient été utilisées, et ceci pourrait expliquer que la divergence entre les observations (Lalonde *et al*, Microbiology, 2000; Seitz *et al*, Vet Microbiol, 2013). La souche P1/7, mais pas la souche 89-1591, produit la SLY, toutefois cette dernière n'a pas eu un effet significatif sur la toxicité cellulaire (Figure S4A). *H. parasuis*, bien qu'il soit non-toxique pour les cellules épithéliales, induit l'apoptose de ces cellules lorsque présent en grand nombre (Bouchet *et al*, Microb Pathog, 2009). Or, l'apoptose étant la mort programmée cellulaire menant à la formation de corps apoptotiques et non à la nécrose, elle ne peut être détectée avec le test de LDH. D'autres expériences devraient être exécutées afin de déterminer l'effet de la co-infection sur l'apoptose de ces cellules.

Même lors d'une infection de 24 h, les infections simples et les co-infections ne sont généralement pas cytotoxiques pour les PAMs (Figure S4B). Bien que les souches produisant la SLY peuvent induire des dommages aux macrophages murins (Segura & Gottschalk, Infect Immun, 2002), il n'a pas été possible d'observer une différence significative entre la souche SLY+ (P1/7) et la souche SLY- (89-1591). Par ailleurs, les résultats confirment que *H. parasuis* n'induit pas la cytotoxicité des PAMs (Bouchet *et al*, Microb Pathog, 2009).

### **3. Adhésion et invasion des cellules épithéliales de la trachée de porcelet par *S. suis* et *H. parasuis***

Puisque les premières étapes dans l'infection par *S. suis* et *H. parasuis* consistent en l'adhésion aux et l'invasion des cellules épithéliales du tractus respiratoire porcin (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012; Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013), l'adhésion et l'invasion des NPTr ont été évaluées pour des souches de *S. suis* et de *H. parasuis* de différents niveaux de virulence.

#### **3.1 Adhésion aux cellules épithéliales de la trachée de porcelet lors d'infections simples**

Dans un premier temps, l'adhésion de *S. suis* et de *H. parasuis* en fonction du temps avec une même multiplicité d'infection a été testée (Figure S5). Puis, différentes multiplicités d'infection ont été utilisées à un même temps afin d'évaluer le rôle de la concentration bactérienne sur l'adhésion (Figure S6). Pour la première fois, l'adhésion de ces deux espèces a été comparée. Ces résultats ont servi à la standardisation des tests d'adhésion et d'invasion lors des co-infections, en vue d'obtenir des conditions optimales. Puisque l'adhésion à 15 min et à 120 min étaient similaires, un temps de prétraitement de 15 min lors des co-infections a été choisi, suivi d'un temps d'adhésion de 120 min (Figure S5). La MOI n'ayant pas d'effet significatif sur l'adhésion des différentes souches (Figure S6), un MOI de 10, similaire à celui utilisé dans les autres études, a été choisi pour les tests d'adhésion aux NPTr.

Dans la littérature, l'adhésion de *S. suis* sérotype 2 aux cellules épithéliales a été rapportée avec des cellules de différentes origines (Lalonde *et al*, Microbiology, 2000;

Tenenbaum *et al*, Brain Res, 2006). L'adhésion de *S. suis* sérotype 2 aux NPTr a aussi déjà été rapportée dans peu d'études précédentes, et des résultats similaires ont été obtenus bien que des souches différentes (toujours des souches ST1) aient été utilisées (Ferrando *et al*, Microbiology, 2010; Wang *et al*, Infect Immun, 2013). Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'adhésion de *S. suis* aux cellules dont la CPS, de nombreuses protéines et la SLY (Lalonde *et al*, Microbiology, 2000; Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012). En ce qui concerne le rôle de la SLY, les résultats sont plutôt controversés (Seitz *et al*, Vet Microbiol, 2013; Tenenbaum *et al*, Future Microbiol, 2016). Les souches produisant la SLY seraient plus aptes à adhérer aux cellules épithéliales que celles n'en produisant pas, et cet effet serait dû aux ondulations de la membrane induites par la SLY et qui permettraient d'augmenter la surface de contact avec la bactérie (Tenenbaum *et al*, Future Microbiol, 20). De plus, en absence de CPS, la SLY augmente de façon significative l'adhésion aux cellules épithéliales (Seitz *et al*, Vet Microbiol, 2013), bien que cet effet n'ait pas été investigué pour les NPTr. Ici, la souche P1/7, produisant la SLY, n'a pas adhéré significativement plus aux NPTr que la souche 89-1591 n'en produisant pas (Figure 1A), suggérant que le rôle de la SLY dans l'adhésion aux cellules épithéliales n'est pas critique. Puisqu'il n'y a pas de différence dans l'adhésion de la souche hautement virulente ST1 et la souche moins virulente ST25 (Figure 1A), le niveau de virulence n'aurait donc pas d'impact dans les premières étapes de l'infection par *S. suis*, mais bien dans les étapes subséquentes lors de la phase systémique.

*H. parasuis* peut adhérer aux cellules épithéliales respiratoires porcines, dont les NPTr (Bouchet *et al*, Microb Pathog, 2009; Frandoloso *et al*, Vet Microbiol, 2012; Fu *et al*, Res Vet Sci, 2012). Alors que la souche virulente Nagasaki adhère plus aux cellules épithéliales rénales



PK-15 qu'une souche peu virulente SW114 (Frndoloso *et al*, Vet Microbiol, 2012), la souche F9 adhère significativement plus aux NPTr que la souche virulente Nagasaki, et que *S. suis* (Figure 1A). L'origine des cellules utilisées, plutôt que la virulence de la souche, pourrait être à l'origine de ces différences, les souches peu virulentes de *H. parasuis* pouvant coloniser le tractus respiratoire. En effet, ces souches peu-virulentes peuvent former davantage de biofilm que les souches virulentes, ce qui pourrait leur permettre une meilleure colonisation et adhérence aux cellules (Bello-Orti *et al*, Vet Res, 2014). Or, ici, la capacité de formation de biofilms n'a pas été étudiée et des études complémentaires sur la formation de biofilm à la surface des cellules épithéliales seraient nécessaires afin de déterminer l'importance de celle-ci sur l'adhésion aux cellules NPTr. L'adhésion de F9 aux NPTr est proportionnelle à la concentration bactérienne (Figure S6) et au temps d'infection (Figure S5). Dans toutes les conditions, l'adhésion de la souche peu virulente F9 est plus importante que celle de *S. suis* et de la souche virulente de *H. parasuis* (Figure 1A, S5 et S6).

### **3.2 Invasion des NPTr par *S. suis* et *H. parasuis***

L'invasion des cellules épithéliales pourrait aussi constituer une étape importante lors de la pathogenèse de *S. suis* et de *H. parasuis*, puisqu'elle permettrait l'accès à la circulation sanguine et ainsi la dissémination bactérienne dans l'hôte (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012; Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013), bien que ceci reste encore une hypothèse. Tel que mentionné plus tôt, l'invasion des cellules épithéliales par *S. suis* est controversée puisque des résultats inconstants sont obtenus selon les différentes études. Alors que certains rapportent que *S. suis* ne peut pas envahir les cellules épithéliales (Norton *et al*, FEMS

Immunol Med Microbiol, 1999), une autre étude rapporte que les souches virulentes envahissent plus les cellules que les souches moins virulentes (Benga *et al*, Cell Microbiol, 2004). Les souches ST1 sont en général plus virulentes que les souches ST25. Pourtant, vu les niveaux très faibles d'invasion des NPTr par P1/7 et 89-1591 (Figure 1B), il n'a pas été possible d'observer une différence significative entre les deux souches avec différents niveaux de virulence. Des niveaux similaires d'invasion avaient été rapportés avec le même type cellulaire et des souches ST1, et sont donc confirmés avec cette étude (Wang *et al*, Infect Immun, 2013). Comme pour l'adhésion, le niveau de virulence ne semble pas avoir d'impact sur l'invasion des NPTr, et donc sur l'installation de l'infection dans les voies respiratoires.

L'invasion des cellules épithéliales par *H. parasuis* a été étudiée et est aussi controversée. Lors d'une étude impliquant des cellules épithéliales rénales porcines, une souche virulente Nagasaki envahit davantage les cellules que la souche peu virulente SW114, qui n'a pas la capacité de le faire (Fransoloso *et al*, Vet Microbiol, 2012). Une fois de plus, ces résultats n'ont pas été observés dans ces travaux (Figure 1B), et les différences pourraient être dues à l'origine des cellules utilisées. En effet, des niveaux d'invasion des NPTr très bas ont été obtenus pour la souche virulente Nagasaki et la souche peu virulente F9 (Figure 1B); aucune différence significative entre les souches n'a pu être établie.

### 3.3 Adhésion et invasion des cellules épithéliales de la trachée de porcelet lors de co-infections avec *S. suis* et *H. parasuis*

En vue de déterminer si la présence simultanée ou au préalable de *S. suis* et de *H. parasuis* lors de la colonisation du porcelet pourrait modifier les interactions de ces bactéries avec les cellules de l'hôte, l'adhésion en co-infection a ensuite été étudiée. Des co-infections simultanées ou utilisant des prétraitements avec une espèce bactérienne suivie de la seconde espèce bactérienne ont été effectués (Figure 2). De telles interactions n'avaient jamais été étudiées auparavant. Indépendamment de la virulence des souches utilisées, de la séquence d'infection et de la concentration bactérienne lors du prétraitement (Figure S7), aucun effet sur l'adhésion n'a été observé en comparaison aux infections simples. *S. suis* et *H. parasuis* semblent utiliser des récepteurs cellulaires différents pour l'adhésion puisque l'utilisation d'une forte (MOI :500) ou d'une faible (MOI :0,1) quantité de bactéries lors du prétraitement des cellules n'a pas affecté l'adhésion de la seconde souche (Figure S7). Le fait que la co-infection n'ait eu aucun effet sur l'invasion des NPTr (Figure 2) ni par *S. suis* ni par *H. parasuis* supporte aussi cette hypothèse. Certaines molécules de surface cellulaires ont été identifiées comme étant de possibles récepteurs d'adhésion pour *S. suis* (Segura *et al*, FEBS Lett, 2016), ces récepteurs restent cependant à confirmer pour ce qui est de l'adhésion de *H. parasuis* aux cellules de l'hôte. Il serait aussi intéressant de confirmer que ces molécules utilisées par *S. suis* n'ont pas de rôle dans l'adhésion de *H. parasuis* aux cellules de l'hôte. Il semble donc que *S. suis* ou *H. parasuis* n'induisent pas l'expression de récepteurs d'adhésion à la surface de la cellule nécessaire à l'adhésion de l'autre espèce bactérienne.

#### **4. Expression de molécules pro-inflammatoires par les NPTr induite lors d'infections avec *S. suis* et *H. parasuis***

Comme *S. suis* et *H. parasuis* produisent toutes les deux des maladies inflammatoires, l'induction de l'expression de molécules pro-inflammatoires lors d'infections simples et mixtes a été évaluée par RT-qPCR dans des conditions non-toxiques. L'inflammation exacerbée de l'épithélium des voies respiratoires supérieures pourrait participer à la perméabilité de la barrière épithéliale, à l'entrée des bactéries dans la circulation sanguine et ainsi à la dissémination bactérienne nécessaire pour produire l'arthrite, la méningite ou encore la maladie de Glässer (Fittipaldi *et al*, Future Microbiol, 2012; Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013). Comme *S. suis* et *H. parasuis* induisent l'inflammation, l'hôte pourrait être compromis davantage lors d'une co-infection avec ces deux agents.

La production d'IL-6, d'IL-8 et de CCL5 par les NPTr infectés avec *S. suis* sérotype 2 ST1 a été rapportée précédemment (Dang *et al*, BMC Vet Res, 2014), mais aucune information n'est disponible quant aux souches ST25 de moindre virulence comme la souche 89-1591. Des cellules épithéliales alvéolaires porcines infectées avec la souche SH0165 (sérovir 5) et des NPTr infectés avec la souche virulente Nagasaki (sérovir 5) expriment un fort niveau d'IL-8 avec un niveau inférieur d'IL-6 (Bouchet *et al*, Microb Pathog, 2009; Fu *et al*, Res Vet Sci, 2012). Lors d'infections simples de 6 h, il a été possible d'observer que la souche ST1, P1/7, induit une plus forte production de médiateurs de l'inflammation (IL-6 et IL-8) par les NPTr que la souche moins virulente ST25, 89-1591 (Figure 3). *S. suis* a par ailleurs induit de plus faibles niveaux de ces médiateurs que *H. parasuis*, virulente ou peu

virulente, mais aucune différence significative n'est observée entre ces deux souches (Figure 3). Plus d'IL-8 que d'IL-6 a été exprimé par les NPTr infectées avec *H. parasuis* (Figure 3), confirmant les résultats déjà observés (Bouchet *et al*, Microb Pathog, 2009; Fu *et al*, Res Vet Sci, 2012).

Pour *S. suis*, des résultats similaires ont été obtenus à des temps d'infection plus longs (12 et 24 h; Figure S8 et S9, respectivement), la souche ST1 très virulente induisant généralement une plus forte expression d'IL-6 et d'IL-8 que la souche ST25. Aucune différence significative entre les souches de différents niveaux de virulence de *H. parasuis* n'a pu être observée à 12 et 24 h (Figure S8 et S9). À 12 h, mais pas après 24 h de stimulation, *H. parasuis* induit une plus forte expression de cytokines pro-inflammatoires que *S. suis* (Figure S8 et S9). À 24 h, l'expression des cytokines semble altérée, et cet effet pourrait être attribué à un épuisement cellulaire. Puisque les co-infections sont en général cytotoxiques à 12 et 24 h (Figure S4), il n'a pas été possible de déterminer l'effet d'une co-infection sur la stimulation des NPTr sur de plus longues périodes. Un temps de 6 h pour les co-infections a donc été choisi (Figure 3).

La co-infection des NPTr avec la souche ST1 très virulente, P1/7, et la souche peu virulente de *H. parasuis*, F9, mène à une expression synergique de cytokines pro-inflammatoires en comparaison aux infections simples (Figure 3). Cet effet n'a pas été observé en co-infection avec la souche virulente Nagasaki ou lors des co-infections avec la souche canadienne ST25, 89-1591, et *H. parasuis* (Figure 3). En augmentant l'inflammation au

niveau du tractus respiratoire lors de co-infection, *S. suis* ST1 pourrait donc avoir un effet modulateur sur la virulence d'une souche peu virulente de *H. parasuis*. Un tel effet reste toutefois à confirmer dans des expériences complémentaires. Les niveaux plus bas d'expression d'IL-6 et d'IL-8 par les NPTr infectés par 89-1591 que par P1/7 lors d'infections simples pourraient expliquer que la synergie n'est pas présente avec la souche moins virulente ST25 lors des co-infections. L'activation des cellules par *S. suis* et *H. parasuis* passe par plusieurs récepteurs cellulaires. Il a été rapporté que *H. parasuis* active les cellules par les TLR 1, 2, 4 et 6 (Chen *et al*, Mol Immunol, 2015), tandis que *S. suis* les active en utilisant le TLR 1, 2, 4 et 9 (Lecours *et al*, PLoS One, 2012).

En expériences complémentaires, l'expression de CCL5 par les NPTr infectés avec *S. suis* ou *H. parasuis* a été mesurée à 12 et 24 h par RT-qPCR (Figure S10). La souche ST1 n'a pas induit une plus forte expression de CCL5 par les NPTr que la souche de moindre virulence ST25 (Figure S10). L'induction de l'expression de CCL5 par *S. suis* avait déjà été démontrée, mais les ST1 et ST25 ont été comparés pour la première fois. Aucune différence significative dans l'expression de CCL5 n'a pu être observée entre les souches virulente et peu virulente de *H. parasuis*, et *H. parasuis* n'induit pas une plus forte expression de cette cytokine que *S. suis* dans les conditions utilisées (Figure S10).

## 5. Expression de molécules pro-inflammatoires par les PAM induite lors d'infections avec *S. suis* et *H. parasuis*

Une autre ligne de défense à laquelle les pathogènes respiratoires doivent faire face sont les macrophages alvéolaires. Ils contrôlent l'homéostasie et la réparation tissulaire, mais sont aussi les régulateurs de l'inflammation (Bieber *et al*, Immunobiology, 2015). Dans les poumons, l'homéostasie doit être strictement maintenue afin d'éviter les complications respiratoires comme les pneumonies. *S. suis*, mais particulièrement *H. parasuis*, peuvent causer la pneumonie (Costa-Hurtado & Aragon, Vet J, 2013). Les interactions de *S. suis* et de *H. parasuis* avec les PAM d'origine porcine sont très peu documentées. En effet, une seule étude porte sur les interactions de *S. suis* avec ces cellules dans laquelle une lignée cellulaire a été utilisée, et pas les macrophages primaires (de Greeff *et al*, Vet Microbiol, 2010). Les cellules immortalisées peuvent générer des réponses différentes des cellules primaires et ces cellules ne sont pas capables de phagocyter. De plus, il existe une diversité génétique entre les macrophages primaires issus de différents animaux qui génère des réponses différentes selon l'individu et sa susceptibilité à l'infection, contrairement aux lignées cellulaires. Il a été démontré que lorsqu'ils sont infectés avec *S. suis*, les PAM induisent l'expression de l'IL-6, de l'IL-8 et de l'IL-1 $\beta$ , mais aussi de TNF- $\alpha$  et de MIP-1- $\beta$  (de Greeff *et al*, Vet Microbiol, 2010). *H. parasuis* induit quant à lui l'expression d'IL-1 $\beta$ , de CCL5, d'IL-6 et d'IL-8 par les PAM infectés (Wang *et al*, BMC Genomics, 2012; Zhou *et al*, Vet J, 2014). L'expression de molécules inflammatoires par les PAM induite par *S. suis* et *H. parasuis* est comparée pour la première fois.

*H. parasuis* induit une expression plus élevée d'IL-6 et d'IL-8 par les PAM que *S. suis* (Figure 4). Plus d'IL-6 est exprimée par les macrophages infectés avec la souche très virulente P1/7 que par la souche 89-1591 (Figure 4). L'expression d'IL-6 et d'IL-8 est plus importante lorsque les cellules sont infectées avec la souche peu virulente F9 que la souche virulente Nagasaki. Une plus forte adhésion aux cellules (voir prochaine section) pourrait expliquer une activation plus intense des PAMs par F9 que par Nagasaki. Aussi, puisque la souche peu virulente peut être phagocytée et digérée par les macrophages contrairement aux souches virulentes (Olvera *et al*, Vet Res, 2009), F9 pourrait engendrer une activation optimale des PAMs et permettre une meilleure réponse inflammatoire et de clairance.

Contrairement à ce qui a été observé avec les NPTr lors des co-infections, des effets additifs, mais pas synergiques, sont observés dans l'expression d'IL-6 et d'IL-8 par les PAMs infectés (Figure 4). Il n'y a donc pas d'influence mutuelle entre *S. suis* et *H. parasuis* quant à l'induction de l'inflammation par les macrophages alvéolaires.

## **6. Association de *H. parasuis* aux macrophages alvéolaires primaires porcins et phagocytose**

Comme *H. parasuis* peut mener à la pneumonie, l'étude de ses interactions avec les macrophages alvéolaires mènerait à une meilleure compréhension de la pathogenèse de *H. parasuis*. Les co-infections avec d'autres agents pathogènes comme *S. suis* pourraient expliquer l'apparition de la maladie même en présence de souches considérées comme étant peu virulentes (Yu *et al*, Microb Pathog, 2014). Comme mentionné précédemment,



*H. parasuis* adhère aux PAM, et les souches peu virulentes semblent s'associer en plus grand nombre aux cellules que les souches virulentes (Olvera *et al*, Vet Res, 2009; Zhang *et al*, Vet Microbiol, 2012). De plus, les souches virulentes systémiques peuvent résister davantage à la phagocytose par les macrophages que les souches peu virulentes isolées du tractus respiratoire d'animaux sains (Olvera *et al*, Vet Res, 2009).

Des observations similaires ont été faites dans cette étude. Non seulement un plus grand nombre de cellules est associé à la souche peu virulente, mais la souche F9 a aussi montré des niveaux d'association par cellule, définis par la MFI, significativement plus élevés que la souche virulente Nagasaki (Figure 5). Une pré-infection des PAM avec *S. suis* ST1 a été effectuée en vue de déterminer l'effet de *S. suis* sur l'association de *H. parasuis* aux PAM. Comme pour les co-infections des NPTr, aucune différence significative dans l'association n'a pu être observée ni pour la souche virulente ni pour la souche peu virulente en présence de P1/7 (Figure 5). Ces observations renforcent l'hypothèse que *S. suis* et *H. parasuis* utilisent des récepteurs cellulaires différents lors de l'adhésion aux cellules de l'hôte.

La phagocytose de *H. parasuis* par les PAM a été évaluée par un test de protection aux antibiotiques (Figure 6). Comme il a déjà été rapporté, des niveaux très bas, en dessous du seuil de détection, de la souche virulente ont été récupérés sur géloses, indiquant que la phagocytose de la souche Nagasaki par les PAM est très peu efficace. À l'inverse, la souche peu virulente F9 a été phagocytée (Figure 6). Il est important de noter que les bactéries doivent survivre à l'intérieur du macrophage pour pouvoir être détectées. De ce fait, les niveaux de

phagocytose sont probablement sous-estimés. L'effet de *S. suis* ST1 sur la phagocytose de *H. parasuis* a été testé puisqu'il a été démontré que sa CPS interagit avec les radeaux lipidiques à la surface des phagocytes et diminue ainsi les capacités phagocytaires de ces cellules (Houde *et al*, Infect Immun, 2012). En plus de se protéger lui-même de la phagocytose, il peut aussi prévenir la phagocytose d'autres espèces bactériennes par les phagocytes (Houde *et al*, Infect Immun, 2012). Bien que cet effet ait été démontré, il n'a pas été possible de l'observer lors de co-infections avec *H. parasuis*, virulente ou peu virulente (Figure 6). Comme la phagocytose de *H. parasuis* n'est pas diminuée par *S. suis*, les souches peu virulentes seraient donc facilement phagocytées aux poumons, et ne pourraient donc pas persister pour causer la maladie.

## **V CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

## 1. Conclusions générales

Ce projet de maîtrise est la première étude d'interaction entre ces espèces bactériennes lors de co-infections de cellules de l'hôte et a permis de démontrer que :

- Les interactions entre *S. suis* et *H. parasuis* sont limitées lors de co-infections *in vitro* de cellules porcines.
- La souche peu virulente de *H. parasuis* s'associe davantage aux cellules porcines qu'une souche virulente et que *S. suis* sérotype 2. En général, *H. parasuis* induit une plus forte réponse inflammatoire que *S. suis* sérotype 2 par les cellules porcines.
- En général, une souche ST1 très virulente induit une plus forte réponse inflammatoire du tractus respiratoire porcin qu'une souche ST25 moins virulente, bien que leurs interactions avec les cellules soient semblables. Le niveau de virulence des souches ne serait donc pas déterminé par les premières étapes de l'infection. Le rôle de la suilysine dans l'induction des médiateurs de l'inflammation et dans la cytotoxicité reste à vérifier.
- En s'associant plus aux cellules et en étant phagocytée davantage, une souche peu virulente de *H. parasuis* induit une expression plus forte de médiateurs de l'inflammation qu'une souche virulente.
- La co-infection de cellules épithéliales avec *S. suis* et *H. parasuis* virulente ou peu virulente :
  - Potentialise la cytotoxicité, ce qui pourrait endommager la barrière épithéliale et faciliter le passage à la circulation sanguine. Cet effet reste toutefois à vérifier puisqu'il pourrait être une conséquence du système *in vitro*.
  - N'avantage pas les 2 espèces bactériennes lors de l'adhésion et de l'invasion des cellules épithéliales, suggérant qu'elles utilisent des récepteurs d'adhésion différents à la surface des cellules.
  - *S. suis* augmente le pouvoir inflammatoire d'une souche peu virulente de *H. parasuis*, mais cet effet est dépendant de la souche utilisée. Cet effet pourrait compromettre l'hôte davantage lors d'infections simultanées.

- La co-infection des PAM avec *S. suis* et *H. parasuis* :
  - N'a pas d'effet sur la cytotoxicité.
  - *S. suis* ne diminue pas l'association de *H. parasuis* aux PAMs, sans toutefois le protéger de la phagocytose.
  - N'augmente pas le pouvoir inflammatoire de l'une ou l'autre des souches, peu importe la virulence.

## 2. Perspectives

Afin de mieux comprendre le rôle des co-infections sur la virulence de *S. suis* et *H. parasuis*, d'autres étapes seront nécessaires et incluent :

- Dans les études *in vitro*
  - De déterminer si la co-infection a un effet sur l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales par *H. parasuis* qui pourrait faciliter la traversée de la barrière épithéliale.
  - Continuer d'explorer la modulation de l'expression de d'autres cytokines et de marqueurs de l'inflammation induite lors des co-infections.
  - Faire l'étude de la formation de biofilms mixtes en présence des cellules épithéliales.
  - Élargir le nombre de souches utilisées afin de déterminer si les effets observés sont généraux ou souches spécifiques, notamment pour la potentialisation de l'inflammation lors de co-infections avec *S. suis* ST1 et *H. parasuis* peu virulent.
- Dans les études *in vivo*
  - Déterminer si les effets observés *in vitro* sont applicables dans des conditions *in vivo* en présence d'un environnement plus complexe et représentatif et l'effet de la co-infection lors des premières étapes de l'infection.

## **VI BIBLIOGRAPHIE**

- Amano, H., Shibata, M., Takahashi, K. and Y. Sasaki (1997). "Effects on endotoxin pathogenicity in pigs with acute septicemia of *Haemophilus parasuis* infection". J Vet Med Sci 59 (6) : 451-455.
- Aragon, V., B. Bouchet and M. Gottschalk (2010). "Invasion of endothelial cells by systemic and nasal strains of *Haemophilus parasuis*." Vet J 186(2): 264-267.
- Athey, T. B., S. Teatero, D. Takamatsu, J. Wasserscheid, K. Dewar, M. Gottschalk and N. Fittipaldi (2016). "Population Structure and Antimicrobial Resistance Profiles of *Streptococcus suis* Serotype 2 Sequence Type 25 Strains." PLoS One 11(3): e0150908.
- Auger, J. P., M. Christodoulides, M. Segura, J. Xu and M. Gottschalk (2015). "Interactions of *Streptococcus suis* serotype 2 with human meningeal cells and astrocytes." BMC Res Notes 8: 607.
- Auger, J. P., S. Chuzeville, D. Roy, A. Mathieu-Denoncourt, J. Xu, D. Grenier and M. Gottschalk (2017). "The bias of experimental design, including strain background, in the determination of critical *Streptococcus suis* serotype 2 virulence factors." PLoS One 12(7): e0181920.
- Auger, E., V. Deslandes, M. Ramjeet, I. Contreras, J. H. Nash, J. Harel, M. Gottschalk, M. Olivier and M. Jacques (2009). "Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells." Infect Immun 77(4): 1426-1441.
- Barre, A. M. E. (2015). "The relationship between *Streptococcus suis* and *Haemophilus parasuis*, two important residents of the tonsils of the soft palate in swine" (Mémoire de maîtrise, University of Guelph, Ontario). Repéré à [https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/9204/Barre\\_Allison\\_201509\\_Msc.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/9204/Barre_Allison_201509_Msc.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- Bello-Orti, B., M. Costa-Hurtado, V. Martinez-Moliner, J. Segales and V. Aragon (2014). "Time course *Haemophilus parasuis* infection reveals pathological differences between virulent and non-virulent strains in the respiratory tract." Vet Microbiol 170(3-4): 430-437.
- Bello-Orti, B., Deslandes, V., Tremblay, Y. D., Labrie, J., Howell, K. J., Tucker, A. W., Maskell, D. J., Aragon, V. and M. Jacques (2014). "Biofilm formation by virulent and non-virulent strains of *Haemophilus parasuis*". Vet Res 45(1): 104.
- Benga, L., P. Friedl and P. Valentin-Weigand (2005). "Adherence of *Streptococcus suis* to porcine endothelial cells." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 52(9): 392-395.
- Benga, L., R. Goethe, M. Rohde and P. Valentin-Weigand (2004). "Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells." Cell Microbiol 6(9): 867-881.

Bieber, K. and S. E. Autenrieth (2015). "Insights how monocytes and dendritic cells contribute and regulate immune defense against microbial pathogens." Immunobiology 220(2): 215-226.

Boerlin, P., Z. Poljak, J. Gallant, G. Chalmers, V. Nicholson, G. A. Soltes and J. I. MacInnes (2013). "Genetic diversity of *Haemophilus parasuis* from sick and healthy pigs." Vet Microbiol 167(3-4): 459-467

Bouchet, B., G. Vanier, M. Jacques, E. Auger and M. Gottschalk (2009). "Studies on the interactions of *Haemophilus parasuis* with porcine epithelial tracheal cells: limited role of LOS in apoptosis and pro-inflammatory cytokine release." Microb Pathog 46(2): 108-113.

Bouchet, B., G. Vanier, M. Jacques and M. Gottschalk (2008). "Interactions of *Haemophilus parasuis* and its LOS with porcine brain microvascular endothelial cells." Vet Res 39(5): 42.

Brazeau, C., M. Gottschalk, S. Vincelette and B. Martineau-Doize (1996). "*In vitro* phagocytosis and survival of *Streptococcus suis* capsular type 2 inside murine macrophages." Microbiology 142 ( Pt 5): 1231-1237.

Cerda-Cuellar, M. and V. Aragon (2008). "Serum-resistance in *Haemophilus parasuis* is associated with systemic disease in swine." Vet J 175(3): 384-389.

Chabot-Roy, G., P. Willson, M. Segura, S. Lacouture and M. Gottschalk (2006). "Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils." Microb Pathog 41(1): 21-32.

Chen, Y., T. Liu, P. Langford, K. Hua, S. Zhou, Y. Zhai, H. Xiao, R. Luo, D. Bi, H. Jin and R. Zhou (2015). "*Haemophilus parasuis* induces activation of NF-kappaB and MAP kinase signaling pathways mediated by toll-like receptors." Mol Immunol 65(2): 360-366.

Costa-Hurtado, M. and V. Aragon (2013). "Advances in the quest for virulence factors of *Haemophilus parasuis*." Vet J 198(3): 571-576.

Costa-Hurtado, M., M. Ballester, N. Galofre-Mila, A. Darji and V. Aragon (2012). "VtaA8 and VtaA9 from *Haemophilus parasuis* delay phagocytosis by alveolar macrophages." Vet Res 43: 57.

Costa-Hurtado, M., A. Olvera, V. Martinez-Moliner, N. Galofre-Mila, P. Martinez, J. Dominguez and V. Aragon (2013). "Changes in macrophage phenotype after infection of pigs with *Haemophilus parasuis* strains with different levels of virulence." Infect Immun 81(7): 2327-2333.

Dang, Y., C. Lachance, Y. Wang, C. A. Gagnon, C. Savard, M. Segura, D. Grenier and M. Gottschalk (2014). "Transcriptional approach to study porcine tracheal epithelial cells individually or dually infected with swine influenza virus and *Streptococcus suis*." BMC Vet Res 10: 86.



- de Greeff, A., L. Benga, P. J. Wichgers Schreur, P. Valentin-Weigand, J. M. Rebel and H. E. Smith (2010). "Involvement of NF-kappaB and MAP-kinases in the transcriptional response of alveolar macrophages to *Streptococcus suis*." Vet Microbiol 141(1-2): 59-67.
- Doran, K. S., M. Fulde, N. Gratz, B. J. Kim, R. Nau, N. Prasadarao, A. Schubert-Unkmeir, E. I. Tuomanen and P. Valentin-Weigand (2016). "Host-pathogen interactions in bacterial meningitis." Acta Neuropathol 131(2): 185-209.
- Du, B., W. Ji, H. An, Y. Shi, Q. Huang, Y. Cheng, Q. Fu, H. Wang, Y. Yan and J. Sun (2014). "Functional analysis of c-di-AMP phosphodiesterase, GdpP, in *Streptococcus suis* serotype 2." Microbiol Res 169(9-10): 749-758.
- Esgleas, M., Y. Li, M. A. Hancock, J. Harel, J. D. Dubreuil and M. Gottschalk (2008). "Isolation and characterization of alpha-enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*." Microbiology 154(Pt 9): 2668-2679.
- Ezquerria, A., C. Revilla, B. Alvarez, C. Perez, F. Alonso and J. Dominguez (2009). "Porcine myelomonocytic markers and cell populations." Dev Comp Immunol 33(3): 284-298.
- Fang, L., H. Shen, Y. Tang and W. Fang (2015). "Superoxide dismutase of *Streptococcus suis* serotype 2 plays a role in anti-autophagic response by scavenging reactive oxygen species in infected macrophages." Vet Microbiol 176(3-4): 328-336.
- Fels, A. O. and Z. A. Cohn (1986). "The alveolar macrophage." J Appl Physiol (1985) 60(2): 353-369.
- Feng, Y., H. Zhang, Z. Wu, S. Wang, M. Cao, D. Hu and C. Wang (2014). "*Streptococcus suis* infection: an emerging/reemerging challenge of bacterial infectious diseases?" Virulence 5(4): 477-497.
- Ferrando, M. L., A. de Greeff, W. J. van Rooijen, N. Stockhofe-Zurwieden, J. Nielsen, P. J. Wichgers Schreur, Y. Pannekoek, A. Heuvelink, A. van der Ende, H. Smith and C. Schultsz (2015). "Host-pathogen Interaction at the Intestinal Mucosa Correlates With Zoonotic Potential of *Streptococcus suis*." J Infect Dis 212(1): 95-105.
- Ferrando, M. L., S. Fuentes, A. de Greeff, H. Smith and J. M. Wells (2010). "ApuA, a multifunctional alpha-glucan-degrading enzyme of *Streptococcus suis*, mediates adhesion to porcine epithelium and mucus." Microbiology 156(Pt 9): 2818-2828.
- Fittipaldi, N., M. Segura, D. Grenier and M. Gottschalk (2012). "Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*." Future Microbiol 7(2): 259-279.

- Fittipaldi, N., T. Sekizaki, D. Takamatsu, J. Harel, L. Dominguez-Punaro Mde, S. Von Aulock, C. Draing, C. Marois, M. Kobisch and M. Gottschalk (2008). "D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*." Infect Immun 76(8): 3587-3594.
- Frاندoloso, R., S. Martinez-Martinez, C. B. Gutierrez-Martin and E. F. Rodriguez-Ferri (2012). "*Haemophilus parasuis* serovar 5 Nagasaki strain adheres and invades PK-15 cells." Vet Microbiol 154(3-4): 347-352.
- Frاندoloso, R., M. Pivato, S. Martinez-Martinez, E. F. Rodriguez-Ferri, L. C. Kreutz and C. B. Martin (2013). "Differences in *Haemophilus parasuis* adherence to and invasion of AOC-45 porcine aorta endothelial cells." BMC Vet Res 9: 207.
- Fu, S., F. Yuan, M. Zhang, C. Tan, H. Chen and W. Bei (2012). "Cloning, expression and characterization of a cell wall surface protein, 6-phosphogluconate dehydrogenase, of *Haemophilus parasuis*." Res Vet Sci 93(1): 57-62.
- Gottschalk, M., S. Lacouture, L. Bonifait, D. Roy, N. Fittipaldi and D. Grenier (2013). "Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Quebec, Canada." Vet Microbiol 162(2-4): 819-825.
- Gottschalk, M. and M. Segura (2000). "The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions." Vet Microbiol 76(3): 259-272.
- Gottschalk, M., M. Segura and J. Xu (2007). "*Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America." Anim Health Res Rev 8(1): 29-45.
- Gottschalk, M., J. Xu, C. Calzas and M. Segura (2010). "*Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen?" Future Microbiol 5(3): 371-391.
- Goyette-Desjardins, G., J. P. Auger, J. Xu, M. Segura and M. Gottschalk (2014). "*Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing." Emerg Microbes Infect 3(6): e45.
- Graveline, R., M. Segura, D. Radzioch and M. Gottschalk (2007). "TLR2-dependent recognition of *Streptococcus suis* is modulated by the presence of capsular polysaccharide which modifies macrophage responsiveness." Int Immunol 19(4): 375-389.
- J. Han. (2006). "MyD88 beyond Toll." Nat Immunol 7(4):370-1.
- He, Z., Y. Pian, Z. Ren, L. Bi, Y. Yuan, Y. Zheng, Y. Jiang and F. Wang (2014). "Increased production of suilysin contributes to invasive infection of the *Streptococcus suis* strain 05ZYH33." Mol Med Rep 10(6): 2819-2826.

Holden, M. T., H. Hauser, M. Sanders, T. H. Ngo, I. Cherevach, A. Cronin, I. Goodhead, K. Mungall, M. A. Quail, C. Price, E. Rabbinowitsch, S. Sharp, N. J. Croucher, T. B. Chieu, N. T. Mai, T. S. Diep, N. T. Chinh, M. Kehoe, J. A. Leigh, P. N. Ward, C. G. Dowson, A. M. Whatmore, N. Chanter, P. Iversen, M. Gottschalk, J. D. Slater, H. E. Smith, B. G. Spratt, J. Xu, C. Ye, S. Bentley, B. G. Barrell, C. Schultsz, D. J. Maskell and J. Parkhill (2009). "Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*." PLoS One 4(7): e6072.

Horiguchi, Y. (2012). "Swine atrophic rhinitis caused by *Pasteurella multocida* toxin and *Bordetella dermonecrotic* toxin." Curr Top Microbiol Immunol 361: 113-129.

Houde, M., M. Gottschalk, F. Gagnon, M. R. Van Calsteren and M. Segura (2012). "*Streptococcus suis* capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition." Infect Immun 80(2): 506-517.

Huang, K., Z. Yuan, J. Li, Q. Zhang, Z. Xu, S. Yan, A. Zhang and M. Jin (2015). "Identification and characterisation a surface-associated arginine peptidase in *Streptococcus suis* serotype 2." Microbiol Res 170: 168-176.

Jacques, M., V. Aragon and Y. D. Tremblay (2010). "Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance." Anim Health Res Rev 11(2): 97-121.

Jin, H., Zhou, R., Kang, M., Luo, R. Cai, X. and H. Chen (2006). " Biofilm formation by field isolates and reference strains of *Haemophilus parasuis*." Vet Microbiol 118(1-2):117-23.

Jin, H., Wan, Y., Zhou, R., Li, L., Luo, R., Zhang, S., Hu, J., Langford, P.R. and H. Chen (2008). "Identification of genes transcribed by *Haemophilus parasuis* in necrotic porcine lung through the selective capture of transcribed sequences (SCOTS)." Environ Microbiol 10(12):3326-36.

Jobin, M. C., M. Gottschalk and D. Grenier (2006). "Upregulation of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase 9 production by human macrophage-like cells: synergistic effect of capsular material and cell wall from *Streptococcus suis*." Microb Pathog 40(1): 29-34.

Lachance, C., M. Segura, M. C. Dominguez-Punaro, G. Wojewodka, J. B. De Sanctis, D. Radzioch and M. Gottschalk (2014). "Deregulated balance of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids following infection by the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*." Infect Immun 82(5): 1778-1785.

Lacouture, S., E. Rodriguez, K. Strutzberg-Minder and M. Gottschalk (2017). "Canada: Serotyping of *Haemophilus parasuis* field isolates from diseased pigs in Quebec by indirect hemagglutination assay and multiplex polymerase chain reaction (PCR)". Can Vet J 58(8):802-804

- Lalonde, M., M. Segura, S. Lacouture and M. Gottschalk (2000). "Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines." Microbiology 146 ( Pt 8): 1913-1921.
- Lecours, M. P., N. Fittipaldi, D. Takamatsu, M. Okura, M. Segura, G. Goyette-Desjardins, M. R. Van Calsteren and M. Gottschalk (2012). "Sialylation of *Streptococcus suis* serotype 2 is essential for capsule expression but is not responsible for the main capsular epitope." Microbes Infect 14(11): 941-950.
- Lecours, M. P., M. Gottschalk, M. Houde, P. Lemire, N. Fittipaldi and M. Segura (2011). "Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells." J Infect Dis 204(6): 919-929.
- Lecours, M. P., M. Segura, N. Fittipaldi, S. Rivest and M. Gottschalk (2012). "Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells." PLoS One 7(9): e44746.
- Li, J., C. Tan, Y. Zhou, S. Fu, L. Hu, J. Hu, H. Chen and W. Bei (2011). "The two-component regulatory system CiaRH contributes to the virulence of *Streptococcus suis* 2." Vet Microbiol 148(1): 99-104.
- Li, P., J. Bai, J. X. Li, G. L. Zhang, Y. H. Song, Y. F. Li, X. W. Wang and P. Jiang (2012). "Molecular cloning, sequencing, and expression of the outer membrane protein P2 gene of *Haemophilus parasuis*." Res Vet Sci 93(2): 736-742.
- Li, W., Y. Wan, Z. Tao, H. Chen and R. Zhou (2013). "A novel fibronectin-binding protein of *Streptococcus suis* serotype 2 contributes to epithelial cell invasion and in vivo dissemination." Vet Microbiol 162(1): 186-194.
- Li, Y., J. X. Zheng, H. Zhang, H. J. Fan and C. P. Lu (2014). "Effect of Tran on virulence through regulating metabolism and stress tolerance of *Streptococcus suis* serotype 2." Microbiol Res 169(9-10): 666-674.
- Liu, P., Y. Pian, X. Li, R. Liu, W. Xie, C. Zhang, Y. Zheng, Y. Jiang and Y. Yuan (2014). "*Streptococcus suis* adenosine synthase functions as an effector in evasion of PMN-mediated innate immunity." J Infect Dis 210(1): 35-45.
- Lun, S., J. Perez-Casal, W. Connor and P. J. Willson (2003). "Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2." Microb Pathog 34(1): 27-37.
- Lun, Z. R., Q. P. Wang, X. G. Chen, A. X. Li and X. Q. Zhu (2007). "*Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen." Lancet Infect Dis 7(3): 201-209.

- MacInnes, J. I. and R. Desrosiers (1999). "Agents of the "suis-ide diseases" of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*." Can J Vet Res 63(2): 83-89.
- Meng, F., N. H. Wu, A. Nerlich, G. Herrler, P. Valentin-Weigand and M. Seitz (2015). "Dynamic Virus-Bacterium Interactions in a Porcine Precision-Cut Lung Slice Coinfection Model: Swine Influenza Virus Paves the Way for *Streptococcus suis* Infection in a Two-Step Process." Infect Immun 83(7): 2806-2815.
- Morozumi, T. and J. Nicolet (1986). "Some antigenic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification." J Clin Microbiol 23(6): 1022-1025.
- Norton, P. M., C. Rolph, P. N. Ward, R. W. Bentley and J. A. Leigh (1999). "Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of sullysin." FEMS Immunol Med Microbiol 26(1): 25-35.
- Okura, M.; M. Osaki, R. Nomoto, S. Arai, R. Osawa, T. Sekizaki and D. Takamatsu (2016). "Current taxonomical situation of *Streptococcus suis*." Pathogens, 5.
- Oliveira, S. and C. Pijoan (2004). "*Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control." Vet Microbiol 99(1): 1-12.
- Oliveira, S., Pijoan, C., and R. Morrison (2004). "Evaluation of *Haemophilus parasuis* control in the nursery using vaccination and controlled exposure." J Swine Health Prod 12(3):123-128.
- Olvera, A., M. Ballester, M. Nofrarias, M. Sibila and V. Aragon (2009). "Differences in phagocytosis susceptibility in *Haemophilus parasuis* strains." Vet Res 40(3): 24.
- Olvera, A., J. Segales and V. Aragon (2007). "Update on the diagnosis of *Haemophilus parasuis* infection in pigs and novel genotyping methods." Vet J 174(3): 522-529.
- Opriessnig, T., L. G. Gimenez-Lirola and P. G. Halbur (2011). "Polymicrobial respiratory disease in pigs." Anim Health Res Rev 12(2): 133-148.
- Park, C., J. Jeong, I. Kang, K. Choi, S. J. Park and C. Chae (2016). "Increased fucosyl glycoconjugate by *Mycoplasma hyopneumoniae* enhances adherences of *Pasteurella multocida* type A in the ciliated epithelial cells of the respiratory tract." BMC Vet Res 12: 25.
- Piriou-Guzylack, L. and H. Salmon (2008). "Membrane markers of the immune cells in swine: an update." Vet Res 39(6): 54.
- Rong, J., W. Zhang, X. Wang, H. Fan, C. Lu and H. Yao (2012). "Identification of candidate susceptibility and resistance genes of mice infected with *Streptococcus suis* type 2." PLoS One 7(2): e32150.

Roy, D., N. Fittipaldi, A. Dumesnil, S. Lacouture and M. Gottschalk (2014). "The protective protein Sao (surface antigen one) is not a critical virulence factor for *Streptococcus suis* serotype 2." Microb Pathog 67-68: 31-35.

Roy, D., D. Grenier, M. Segura, A. Mathieu-Denoncourt and M. Gottschalk (2016). "Recruitment of Factor H to the *Streptococcus suis* Cell Surface is Multifactorial." Pathogens 5(3).

Sack, M. and N. Baltes (2009). "Identification of novel potential virulence-associated factors in *Haemophilus parasuis*." Vet Microbiol 136(3-4): 382-386.

Segura, M. (2012). "Fisher scientific award lecture - the capsular polysaccharides of Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* differently modulate bacterial interactions with dendritic cells." Can J Microbiol 58(3): 249-260.

Segura, M. (2015). "*Streptococcus suis* vaccines: candidate antigens and progress." Expert Rev Vaccines 14(12): 1587-1608.

Segura, M., C. Calzas, D. Grenier and M. Gottschalk (2016). "Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: fighting against nonspecific defenses." FEBS Lett 590(21): 3772-3799.

Segura, M. and M. Gottschalk (2002). "*Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity." Infect Immun 70(8): 4312-4322.

Segura, M., M. Gottschalk and M. Olivier (2004). "Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis." Infect Immun 72(9): 5322-5330.

Segura, M., J. Stankova and M. Gottschalk (1999). "Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages." Infect Immun 67(9): 4646-4654.

Seitz, M., C. G. Baums, C. Neis, L. Benga, M. Fulde, M. Rohde, R. Goethe and P. Valentin-Weigand (2013). "Subcytolytic effects of sullysin on interaction of *Streptococcus suis* with epithelial cells." Vet Microbiol 167(3-4): 584-591.

Smith, H. E., M. Damman, J. van der Velde, F. Wagenaar, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden and M. A. Smits (1999). "Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor." Infect Immun 67(4): 1750-1756.

Sprenger, H., A. Rosler, P. Tonn, H. J. Braune, G. Huffmann and D. Gemsa (1996). "Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis." Clin Immunol Immunopathol 80(2): 155-161.

Staats, J. J., I. Feder, O. Okwumabua and M. M. Chengappa (1997). "*Streptococcus suis*: past and present." Vet Res Commun 21(6): 381-407.

Tanabe, S., L. Bonifait, N. Fittipaldi, L. Grignon, M. Gottschalk and D. Grenier (2010). "Pleiotropic effects of polysaccharide capsule loss on selected biological properties of *Streptococcus suis*." Can J Vet Res 74(1): 65-70.

Tang, Y., X. Zhang, W. Wu, Z. Lu and W. Fang (2012). "Inactivation of the *sodA* gene of *Streptococcus suis* type 2 encoding superoxide dismutase leads to reduced virulence to mice." Vet Microbiol 158(3-4): 360-366.

Tang, Y., H. Zhao, W. Wu, D. Wu, X. Li and W. Fang (2011). "Genetic and virulence characterization of *Streptococcus suis* type 2 isolates from swine in the provinces of Zhejiang and Henan, China." Folia Microbiol (Praha) 56(6): 541-548.

Tenenbaum, T., F. Essmann, R. Adam, A. Seibt, R. U. Janicke, G. E. Novotny, H. J. Galla and H. Schrotten (2006). "Cell death, caspase activation, and HMGB1 release of porcine choroid plexus epithelial cells during *Streptococcus suis* infection in vitro." Brain Res 1100(1): 1-12.

Tenenbaum, T., M. Seitz, H. Schrotten and C. Schwerk (2016). "Biological activities of suilysin: role in *Streptococcus suis* pathogenesis." Future Microbiol 11: 941-954.

Vanier, G., M. Segura, P. Friedl, S. Lacouture and M. Gottschalk (2004). "Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2." Infect Immun 72(3): 1441-1449.

Vanier, G., M. Segura and M. Gottschalk (2007). "Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2." Can J Vet Res 71(2): 81-89.

Vanier, G., M. Segura, M. P. Lecours, D. Grenier and M. Gottschalk (2009). "Porcine brain microvascular endothelial cell-derived interleukin-8 is first induced and then degraded by *Streptococcus suis*." Microb Pathog 46(3): 135-143.

Vanier, G., A. Szcotka, P. Friedl, S. Lacouture, M. Jacques and M. Gottschalk (2006). "*Haemophilus parasuis* invades porcine brain microvascular endothelial cells." Microbiology 152(Pt 1): 135-142.

Vecht, U., J. P. Arends, E. J. van der Molen and L. A. van Leengoed (1989). "Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type II after experimentally induced infection of newborn germ-free pigs." Am J Vet Res 50(7): 1037-1043.

Wang, Y., C. A. Gagnon, C. Savard, N. Music, M. Srednik, M. Segura, C. Lachance, C. Bellehumeur and M. Gottschalk (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(12): 4498-4508.

- Wang, Y., C. Liu, Y. Fang, X. Liu, W. Li, S. Liu, Y. Liu, Y. Liu, C. Charreyre, J. C. Audonnet, P. Chen and Q. He (2012). "Transcription analysis on response of porcine alveolar macrophages to *Haemophilus parasuis*." BMC Genomics 13: 68.
- Wangsomboonsiri, W., T. Luksananun, S. Saksornchai, K. Ketwong and S. Sungkanuparph (2008). "*Streptococcus suis* infection and risk factors for mortality." J Infect 57(5): 392-396.
- Weiss, G. and U. E. Schaible (2015). "Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria." Immunol Rev 264(1): 182-203.
- Wertheim, H. F., H. D. Nghia, W. Taylor and C. Schultz (2009). "*Streptococcus suis*: an emerging human pathogen." Clin Infect Dis 48(5): 617-625.
- Wewer, C., A. Seibt, H. Wolburg, L. Greune, M. A. Schmidt, J. Berger, H. J. Galla, U. Quitsch, C. Schwerk, H. Schrotten and T. Tenenbaum (2011). "Transcellular migration of neutrophil granulocytes through the blood-cerebrospinal fluid barrier after infection with *Streptococcus suis*." J Neuroinflammation 8: 51.
- Wu, N. H., F. Meng, M. Seitz, P. Valentin-Weigand and G. Herrler (2015). "Sialic acid-dependent interactions between influenza viruses and *Streptococcus suis* affect the infection of porcine tracheal cells." J Gen Virol 96(9): 2557-2568.
- Xu, C., L. Zhang, B. Zhang, S. Feng, S. Zhou, J. Li, Y. Zou and M. Liao (2013). "Involvement of lipooligosaccharide heptose residues of *Haemophilus parasuis* SC096 strain in serum resistance, adhesion and invasion." Vet J 195(2): 200-204.
- Xu, J., S. Fu, M. Liu, Q. Xu, W. Bei, H. Chen and C. Tan (2014). "The two-component system NisK/NisR contributes to the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2." Microbiol Res 169(7-8): 541-546.
- Yu, J., J. Wu, Y. Zhang, Y. Du, J. Peng, L. Chen, W. Sun, X. Cong, S. Xu, J. Shi, J. Li, B. Huang, X. Zhu and J. Wang (2014). "Identification of putative virulence-associated genes among *Haemophilus parasuis* strains and the virulence difference of different serovars." Microb Pathog 77: 17-23.
- Zhang, B., C. Tang, M. Liao and H. Yue (2014). "Update on the pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection and virulence factors." Vet Microbiol 168(1): 1-7.
- Zhang, B., C. Xu and M. Liao (2012). "Outer membrane protein P2 of the *Haemophilus parasuis* SC096 strain contributes to adherence to porcine alveolar macrophages cells." Vet Microbiol 158(1-2): 226-227.
- Zhang, B., C. Xu, L. Zhang, S. Zhou, S. Feng, Y. He and M. Liao (2013). "Enhanced adherence to and invasion of PUVeC and PK-15 cells due to the overexpression of RfaD,



ThyA and Mip in the DeltaompP2 mutant of *Haemophilus parasuis* SC096 strain." Vet Microbiol 162(2-4): 713-723.

Zhang, B., Y. Yu, Z. Zeng, Y. Ren and H. Yue (2014). "Deletion of the rfaE gene in *Haemophilus parasuis* SC096 strain attenuates serum resistance, adhesion and invasion." Microb Pathog 74: 33-37.

Zhang, H., Z. Ma, Y. Li, J. Zheng, L. Yi, H. Fan and C. Lu (2013). "Identification of a novel collagen type capital I, Ukrainian-binding protein from *Streptococcus suis* serotype 2." Vet J 197(2): 406-414.

Zhang, X., X. Jiang, L. Yang, L. Fang, H. Shen, X. Lu and W. Fang (2015). "DnaJ of *Streptococcus suis* Type 2 Contributes to Cell Adhesion and Thermotolerance." J Microbiol Biotechnol 25(6): 771-781.

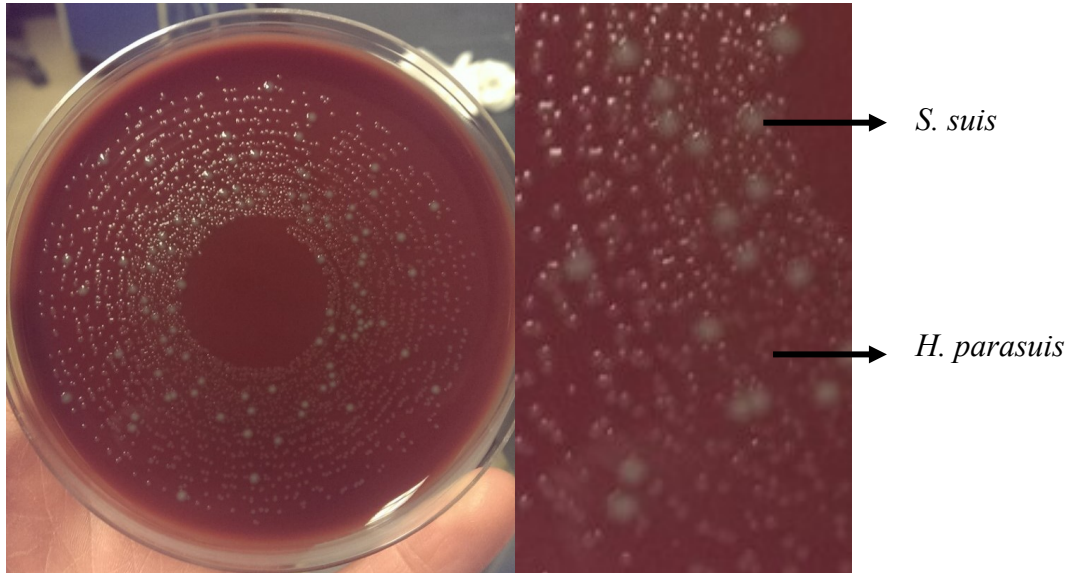
Zheng, H. X. Qiu, D. Roy, M. Segura, P. Du, J. Xu and M. Gottschalk (2017). "Genotyping and investigating capsular polysaccharide synthesis gene loci of non-serotypeable *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in canada." Vet Res, 48, 10.

Zheng, P., Y. X. Zhao, A. D. Zhang, C. Kang, H. C. Chen and M. L. Jin (2009). "Pathologic analysis of the brain from *Streptococcus suis* type 2 experimentally infected pigs." Vet Pathol 46(3): 531-535.

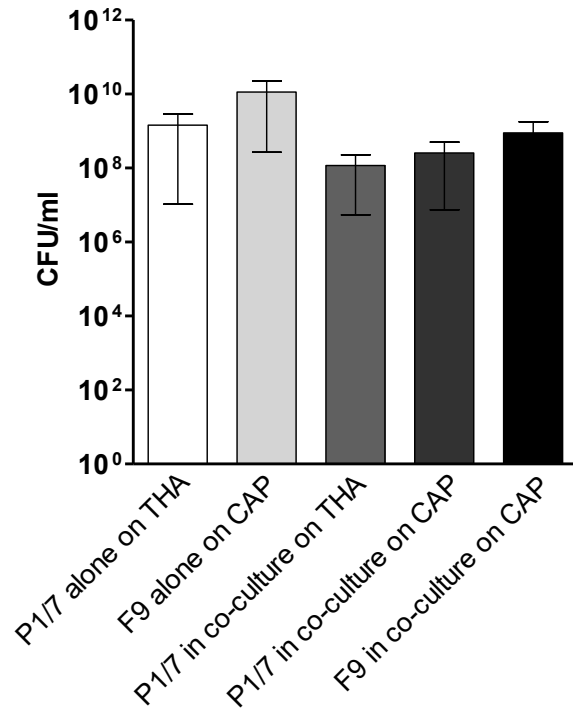
Zhou, S., X. He, C. Xu, B. Zhang, S. Feng, Y. Zou, J. Li and M. Liao (2014). "The outer membrane protein P2 (OmpP2) of *Haemophilus parasuis* induces proinflammatory cytokine mRNA expression in porcine alveolar macrophages." Vet J 199(3): 461-464.

## **VII ANNEXES**

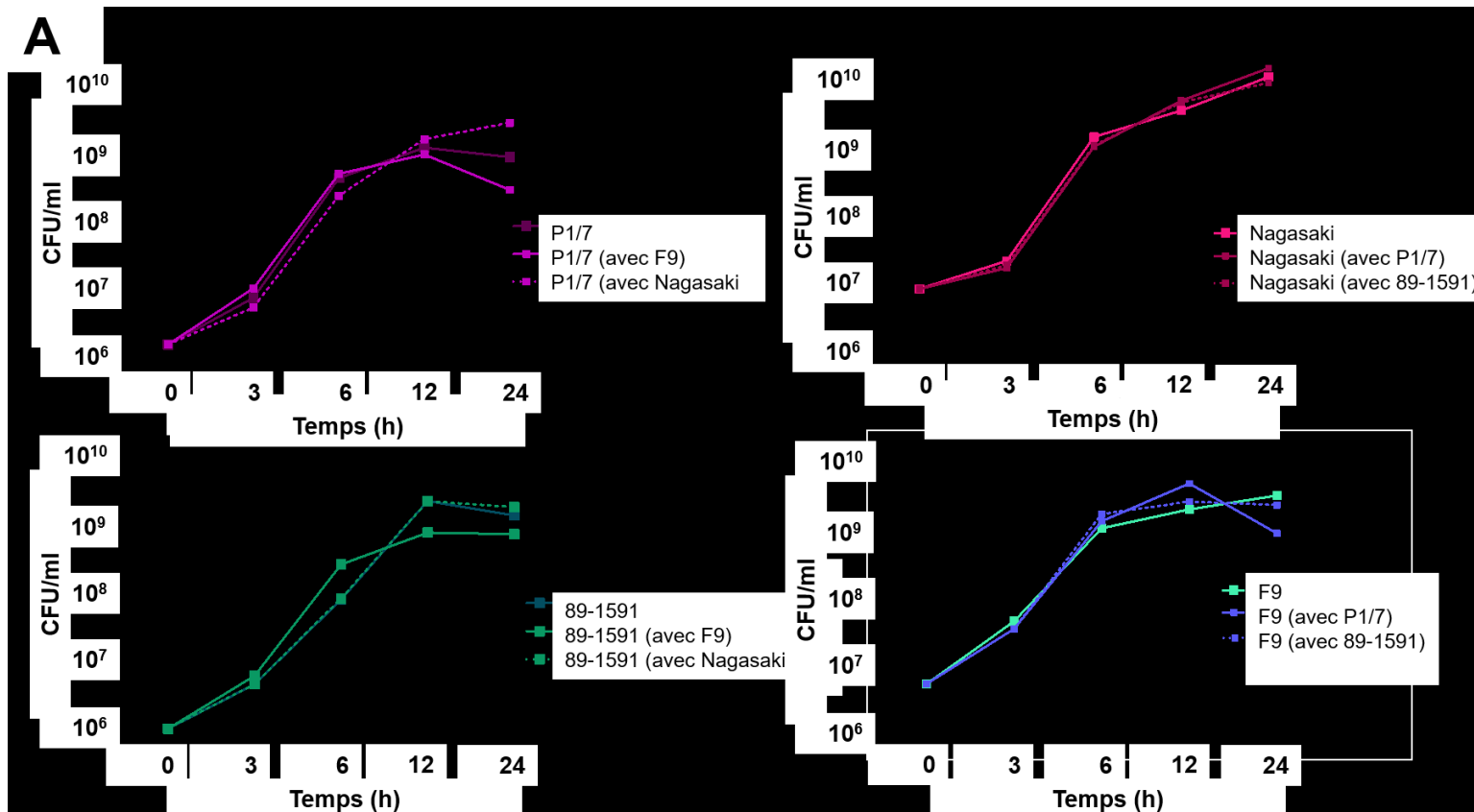
## FIGURES SUPPLÉMENTAIRES



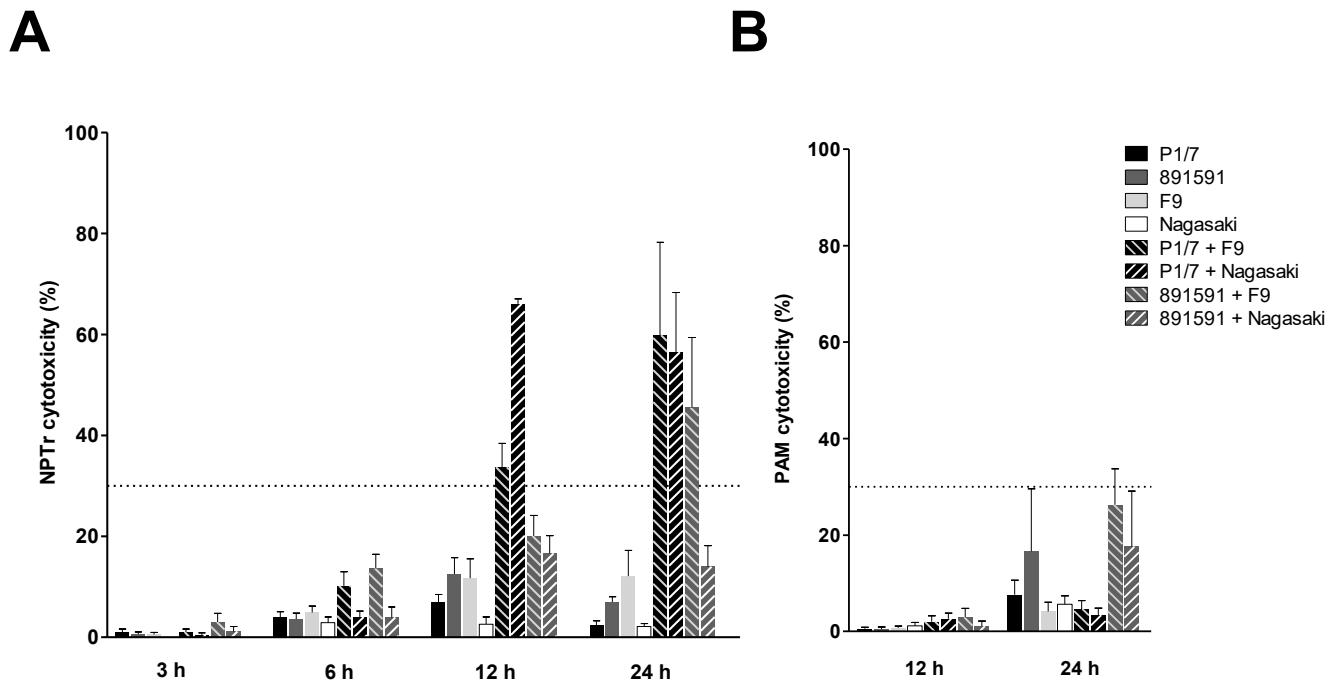
**Figure S1.** Photo d'une culture mixte de *S. suis* et *H. parasuis* sur gélose chocolat. La morphologie des colonies de *S. suis* et de *H. parasuis* est discriminante et permet l'identification et le dénombrement des colonies de *S. suis*, formant des grosses colonies verdâtres, et de *H. parasuis*, dont les colonies sont de plus petite taille, blanches et au contour régulier.



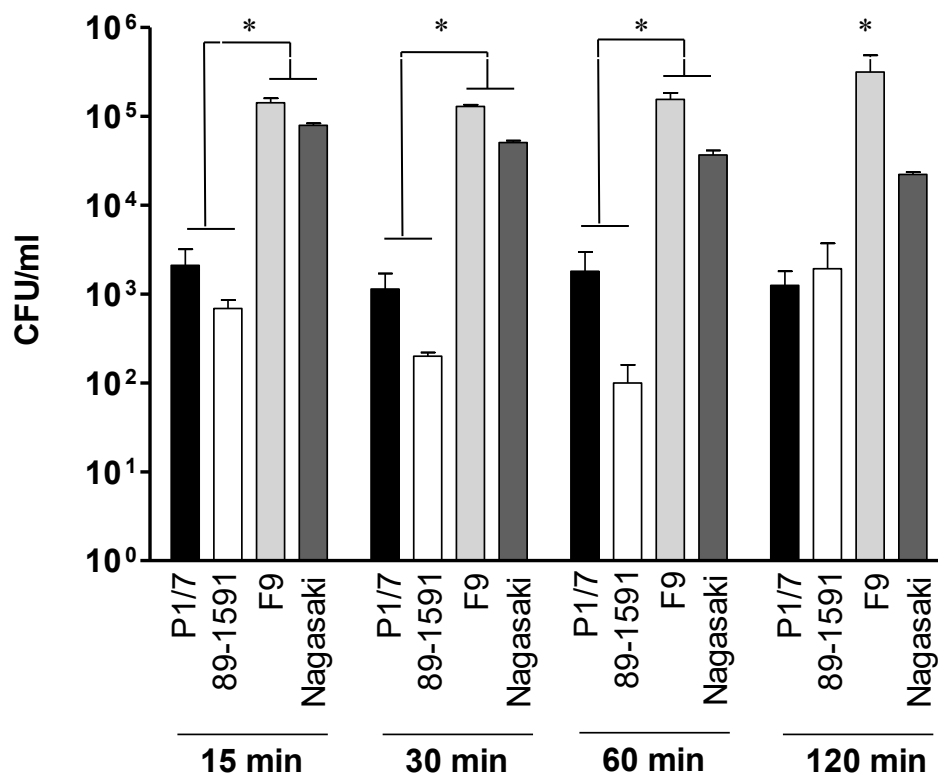
**Figure S2. Croissance de *S. suis* et *H. parasuis* en co-culture sur géloses.** Cent microlitres d'une suspension de même concentration viable bactérienne de *S. suis* et *H. parasuis* ont étéensemencés sur géloses Todd Hewitt (THA) ou sur géloses chocolat (CAP), respectivement. Un mélange contenant la même quantité des deux espèces bactériennes a été inoculé sur THA ou sur CAP. Après une incubation de 24-48 h, le nombre d'unités formatrices de colonies (CFU) a été compté. Les données sont exprimées en *means* ± *standard errors* provenant de 3 expériences indépendantes.



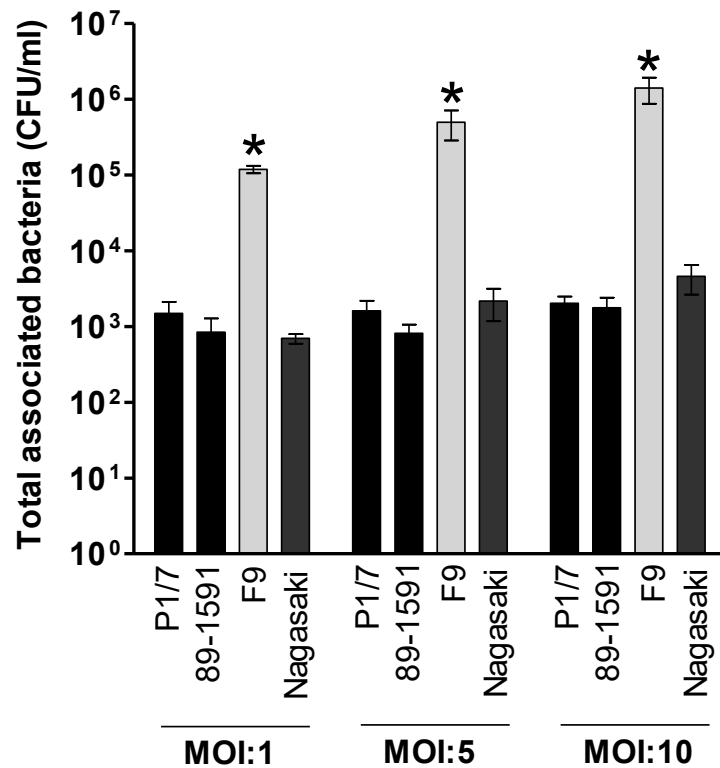
**Figure S3. Croissance bactérienne en milieu de culture cellulaire lors d'infections simples et mixtes de cellules épithéliales de la trachée de porcelet nouveau-né.** Les cellules ont été infectées avec *S. suis* et/ou *H. parasuis* pendant 24 h. À différents temps, des échantillons ont été prélevés et inoculés sur géloses chocolat afin de déterminer la concentration bactérienne dans le puits, déterminée par le nombre d'unités formatrices de colonies (CFU) par millilitres. A) Croissance de P1/7 B) Croissance de Nagasaki C) Croissance de 89-1591 D) Croissance de F9. Les données sont exprimées à l'aide de la moyenne provenant de 3 expériences indépendantes.



**Figure S4. Cytotoxicité induite par les co-infections avec *S. suis* et *H. parasuis*.** Les cellules ont été infectées avec *S. suis* sérotype 2 suilysine positive (P1/7) ou négative (89-1591), et/ou avec *H. parasuis* peu virulente (F9) ou virulente (Nagasaki) pour différents temps. Les surnageants ont été collectés et centrifugés pour retirer les bactéries. Le kit Cyto Tox 96 (Promega) a été utilisé pour mesurer les niveaux de LDH dans le surnageant. Le pourcentage de cellules mortes (% Cytotoxicity) a été calculé par rapport aux cellules non-infectées. Le milieu de culture cellulaire et des cellules lysées dans l'eau pure ont été utilisés comme contrôle négatif et positif, respectivement. A) Cellules épithéliales de la trachée de porcelet (NPTTr) and B) Macrophages alvéolaires primaires porcins (PAM). Les données sont exprimées à l'aide de la moyenne  $\pm$  erreur standard de 3 expériences indépendantes.

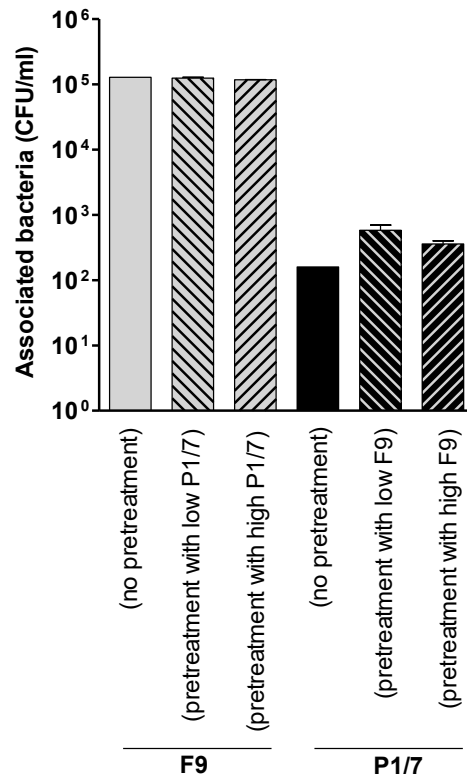


**Figure S5. Association totale de *S. suis* et *H. parasuis* aux cellules épithéliales de la trachée de porcelet (NPT<sub>r</sub>) à différents temps.** Les cellules ont été infectées avec *S. suis* ou *H. parasuis* lors d'infections simples avec une multiplicité d'infection de 10. Les plaques ont été incubées pendant différents temps, puis les cellules ont été lavées pour retirer les bactéries non adhérentes. Les cellules ont été lysées dans l'eau pure froide pour libérer les bactéries intracellulaires, puis le mélange a été inoculé sur géloses. Les unités formatrices de colonies (CFU) récupérées par puits ont été dénombrées. Les données sont exprimées à l'aide de la moyenne ± erreur standard de trois expériences indépendantes. Un astérisque indique une différence significative entre les groupes ( $p < 0.05$ )

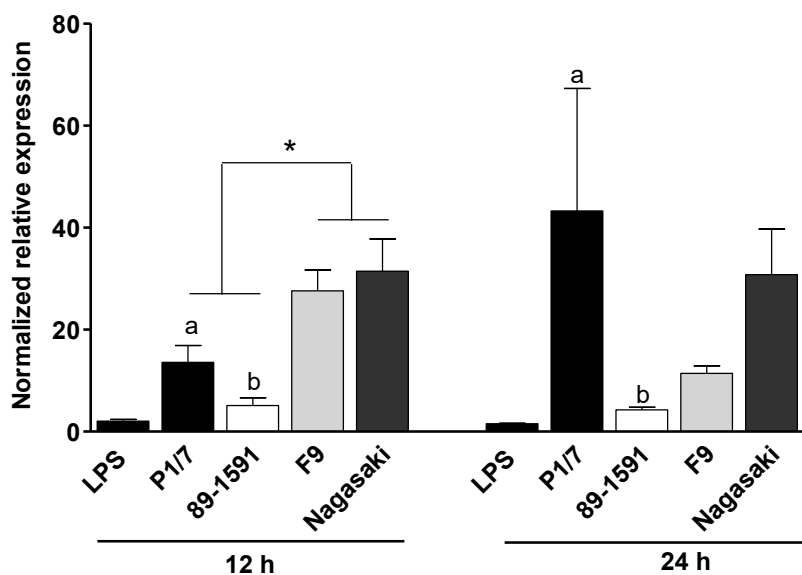


**Figure S6. Association totale de *S. suis* et *H. parasuis* aux cellules épithéliales de la trachée de porcelet (NPTr) avec différentes multiplicités d'infection (MOI), après 120 min d'incubation.** Les cellules ont été infectées avec *S. suis* ou *H. parasuis* lors d'infections simples avec une multiplicité d'infection de 1, 5 ou 10. Les plaques ont été incubées pendant 120 min, puis les cellules ont été lavées pour retirer les bactéries non adhérentes. Les cellules ont été lysées dans l'eau pure froide pour libérer les bactéries intracellulaires, puis le mélange a été inoculé sur géloses. Les unités formatrices de colonies (CFU) récupérées par puits ont été dénombrées. Les données sont exprimées à l'aide de la moyenne  $\pm$  erreur standard de trois expériences indépendantes. Un astérisque indique une différence significative entre les groupes ( $p < 0.05$ )

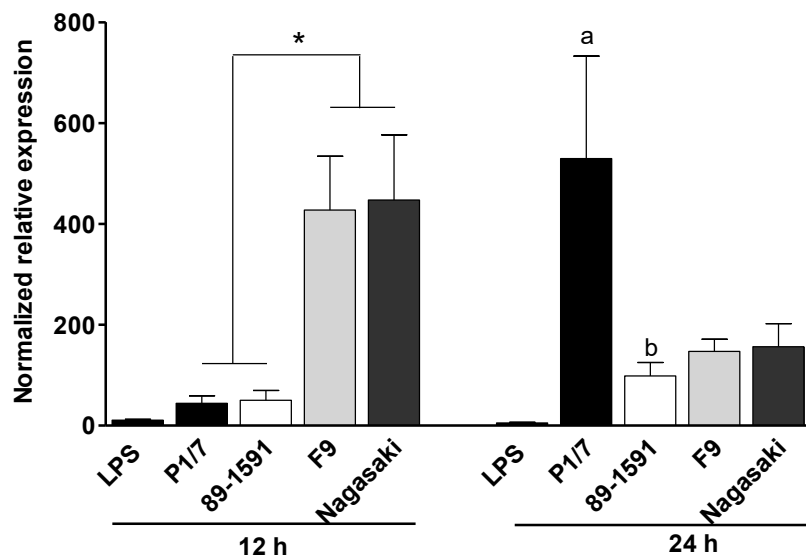




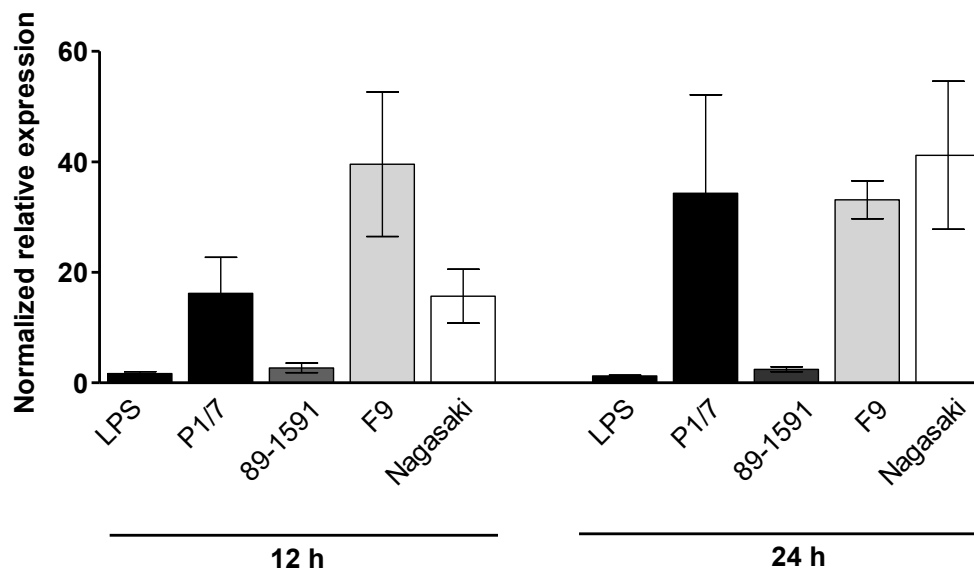
**Figure S7. Saturation des récepteurs lors de co-infections de cellules épithéliales de la trachée avec *S. suis* et *H. parasuis* en utilisant des faibles ou fortes multiplicités d'infection (MOI) lors des prétraitements.** Les NPT<sub>r</sub> ont été pré-infectées avec *S. suis* serotype 2 ou avec *H. parasuis* ou avec du milieu (*No pretreatment*) pendant 15 min avec une MOI de 0.1 ou de 500 (*low* et *high*, respectivement). Les cellules ont été lavées puis infectées avec *S. suis* ou *H. parasuis* pendant 2 h. Les cellules ont été lysées dans l'eau pure froide pour libérer les bactéries intracellulaires, puis le mélange a été inoculé sur géloses. Les unités formatrices de colonies (CFU) récupérées par puits ont été dénombrées et représentent les niveaux d'adhésion. Les barres pleines représentent les infections simples alors que les barres hachurées représentent les co-infections. Les valeurs sont représentées à l'aide de la moyenne  $\pm$  erreur standard provenant de 3 expériences indépendantes. Un astérisque indique une différence significative entre les groupes ( $p < 0.05$ )



**Figure S8. Expression relative normalisée de l'IL-6 par les cellules épithéliales de la trachée de porcelet infectées avec *S. suis* ou *H. parasuis* comparée au milieu.** Les cellules ont été infectées avec *S. suis* serotype 2 ou avec *H. parasuis* peu virulent ou virulent, pendant 12 ou 24 h. L'expression du gène de l'IL-6 a été analysée par RT-qPCR et normalisée avec l'expression des gènes PPIA et Hypox de cellules non-infectées. Les différences relatives ont été calculées en comparaison aux cellules non-infectées. Les résultats sont représentés à l'aide de la moyenne  $\pm$  erreur standard d'au moins 4 expériences indépendantes. Une lettre indique une différence significative entre les souches de *S. suis* ( $p < 0.05$ ). Un astérisque indique une différence significative entre *S. suis* et *H. parasuis* ( $p < 0.05$ ).



**Figure S9. Expression relative normalisée de l'IL-8 par les cellules épithéliales de la trachée de porcelet infectées avec *S. suis* et *H. parasuis* comparée au milieu.** Les cellules ont été infectées avec *S. suis* sérotype 2 ou avec *H. parasuis* virulent ou peu virulent pendant 12 ou 24 h. L'expression du gène de l'IL-8 a été analysée par RT-qPCR et normalisée avec l'expression des gènes PPIA et Hypox de cellules non-infectées. Les différences relatives ont été calculées en comparaison aux cellules non-infectées. Les résultats sont présentés à l'aide de la moyenne  $\pm$  erreur standard d'au moins 4 expériences indépendantes. Une lettre indique une différence significative entre les souches de *S. suis* ( $p < 0.05$ ). Un astérisque indique une différence significative entre *S. suis* et *H. parasuis* ( $p < 0.05$ ).



**Figure S10. Expression relative normalisée du CCL5 par les cellules épithéliales de la trachée de porcelet infectées avec *S. suis* ou *H. parasuis* comparée au milieu.** Les cellules ont été infectées avec *S. suis* sérotype 2 ou *H. parasuis* virulent ou peu virulent pendant 12 et 24 h. L'expression du gène a été analysée par RT-qPCR et normalisée avec l'expression des gènes PPIA et Hypox de cellules non-infectées. Les différences relatives ont été calculées en comparasion aux cellules non-infectées. Les résultats sont présentés à l'aide de la moyenne  $\pm$  erreur standard de 4 expériences indépendantes. Une lettre indique une différence significative entre les souches de *S. suis* ( $p < 0.05$ ). Un astérisque indique une différence significative entre *S. suis* et *H. parasuis* ( $p < 0.05$ ).

## ***ARTICLE II***

### **Recruitment of Factor H to the *Streptococcus suis* Cell Surface is Multifactorial**

**David Roy<sup>1</sup>, Daniel Grenier<sup>2</sup>, Mariela Segura<sup>1</sup>, Annabelle Mathieu-Denoncourt<sup>1</sup>, Marcelo Gottschalk<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Research Group on Infectious Diseases in Production Animals and Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Quebec, Canada

<sup>2</sup> Oral Ecology Research Group, Faculty of Dentistry, Laval University, Quebec City, J2S 7C6, Quebec, Canada

Publié dans MDPI Pathogens

Academic Editor: Lawrence S. Young

Received: 16 May 2016; Accepted: 4 July 2016; Published: 7 July 2016

Pathogens. 2016 Jul 7;5(3). pii: E47. doi: 10.3390/pathogens5030047.

#### **Rôle de la candidate dans la conception de l'article :**

J'ai participé à l'obtention des mutants utilisés dans les expériences et effectué les manipulations en lien avec l'adhésion aux cellules. J'ai participé à l'analyse de ces résultats et à la conception des graphiques.

## ABSTRACT

*Streptococcus suis* is an important bacterial swine pathogen and a zoonotic agent. Recently, two surface proteins of *S. suis*, Fhb and Fhbp, have been described for their capacity to bind factor H—a soluble complement regulatory protein that protects host cells from complement-mediated damages. Results obtained in this study showed an important role of host factor H in the adhesion of *S. suis* to epithelial and endothelial cells. Both Fhb and Fhbp play, to a certain extent, a role in such increased factor H-dependent adhesion. The capsular polysaccharide (CPS) of *S. suis*, independently of the presence of its sialic acid moiety, was also shown to be involved in the recruitment of factor H. However, a triple mutant lacking Fhb, Fhbp and CPS was still able to recruit factor H resulting in the degradation of C3b in the presence of factor I. In the presence of complement factors, the double mutant lacking Fhb and Fhbp was similarly phagocytosed by human macrophages and killed by pig blood when compared to the wild-type strain. In conclusion, this study suggests that recruitment of factor H to the *S. suis* cell surface is multifactorial and redundant.

**Keywords:** *Streptococcus suis*; factor H; factor H-binding proteins; adhesion; polysaccharide capsule; phagocytosis; C3b; complement

## INTRODUCTION

Infections caused by *Streptococcus suis* represent an economic problem for the swine industry, being one of the most important bacterial pathogens for weaned piglets [1]. It usually causes septicemia with sudden death, meningitis, arthritis, endocarditis and other infections [1]. Moreover, *S. suis* is a zoonotic agent causing meningitis, septicemia and toxic shock-like syndrome in humans [2]. In Western countries, human *S. suis* infections are mainly associated with the swine industry, whereas, in some Asian countries, the general population is at risk and *S. suis* is one of the main causes of adult meningitis [3]. Serotype 2 is the most virulent and the most commonly isolated serotype in swine and humans [4]. The pathogenesis of the *S. suis* infection is only partially known; it has been proposed that, in swine, bacteria first colonize epithelial cells of the respiratory tract, and then reach the bloodstream where they can survive and multiply [5]. The capsular polysaccharide (CPS), rich in sialic acid, plays an important antiphagocytic role [5]. In addition, *S. suis* possesses different surface proteins implicated in host colonization and resistance to host immune response. While several of these surface proteins have already been characterized, many remain poorly studied and their physiological and pathological roles uncharacterized [5].

Factor H is a soluble complement regulatory protein that protects host cells from complement-mediated damages [6]. This plasma glycoprotein is the key fluid phase regulator of the alternative complement pathway and acts as a cofactor in the factor I-mediated proteolysis of C3b. Proteolytic cleavage of C3b results in the formation of the inactive iC3b fragment, which remains covalently linked to the surface [7]. It also competes with factor B for binding to C3b, therefore interfering with the formation of the C3bBb complex [7]. However, many bacterial pathogens have the ability to bind factor H to their cell surface in order to avoid complement attack and opsonophagocytosis. In several bacterial pathogens, surface-exposed proteins and/or sialic acid-rich polysaccharide components have been shown to be able to bind factor H [8]. In addition to its complement regulatory function—which may

modulate opsonophagocytosis—factor H has been shown to contribute to bacterial adherence to different host cells [9].

It is known that *S. suis* is able to bind factor H as a cofactor in order to degrade C3b in the presence of complement factor I [10]. Two different surface proteins of *S. suis*, Fhb and Fhbp, have so far been described for their capacity to bind factor H [10,11]. Recombinant Fhb and Fhbp proteins have a molecular weight of 130 kDa, and 95 kDa, respectively [10,11]. Although both proteins share low protein identity (33%), they possess a LPXTG sequence followed by hydrophobic domains recognized by the sortase A anchoring enzyme [10,11]. Thus far, only Fhb was characterized for its role in the pathogenesis of *S. suis* in a piglet model [11]. However, fhop expression was shown to be upregulated in brain and lungs during experimental infection of pigs with *S. suis* [12].

In order to evaluate the individual or combined contribution of Fhb, Fhbp as well as the CPS in the ability of *S. suis* to bind factor H, we constructed single isogenic as well multiple knock-out mutants of *S. suis* serotype 2 deficient for the above surface constituents. Our results show that binding of factor H to the *S. suis* surface increases adhesion to both epithelial and endothelial cells. However, recruitment of factor H to the bacterial surface is multifactorial.



# RESULTS

## 2.1. Mutant Characterization

Inactivation of *fhb* and *cps* genes was previously done and mutants were already characterized; consequently, no further characterization of our equivalent mutants was done [11,13]. In order to further investigate the role of Fhbp in *S. suis* serotype 2, the gene encoding this surface protein [10] was inactivated by a specific in-frame allelic deletion in the wild-type strain P1/7. Western blotting using an anti-Fhbp polyclonal antibody depicted in Figure 1 clearly shows that the resulting  $\Delta fhb$  mutant does not express Fhbp (Figure 1). Complementation by the *fhb* gene restored the expression of Fhbp. Inactivation of *fhb* (or previously described inactivation of *fhb* and *cps2F*) had no major consequence on bacterial growth when compared to the wild-type strain (data not shown). Coagglutination and dot-ELISA tests showed that all mutants (with the exception of those including a *cps2F* deletion) were as encapsulated as the wild-type strain (results not shown). Consequently, hydrophobicity tests showed low hydrophobicity (<5%) for the wild type strain as well as all mutants, except for those with the *cps2F* deletion (90%).

## 2.2. Adhesion and Invasion Assays

The interactions (adhesion and invasion) of the *S. suis* wild-type strain (P1/7) as well as mutants defective for factor H binding proteins with human epithelial cells (A549) and human endothelial cells (hBMEC) in presence or absence of human factor H was investigated. As shown in Figure 2A,B, adhesion of *S. suis* wild-type strain to A549 human epithelial and hBMEC human endothelial cells was significantly increased in presence of factor H, especially for the epithelial cells ( $p = 0.006$  and  $p = 0.04$ , respectively). In contrast, no significant differences were observed regarding invasion of both cell types (Figure 2C,D). The role of different factor H binding proteins in such interactions was further investigated. Adhesion levels to hBMEC and A549 cells of single knock-out  $\Delta fhb$  and  $\Delta fhbp$  mutants in the presence of factor H were similar to those obtained with the wild-type strain P1/7 (Figure

3A,B). The double knock-out  $\Delta fhb/\Delta fhbp$  mutant showed a significant decrease in adhesion levels to epithelial cells ( $p = 0.0279$ ) and to endothelial cells ( $p = 0.0214$ ) (Figure 3A,B). It has to be noted that the double knock out mutant adhered similarly to the wild-type strain to both cell types in absence of factor H ( $p > 0.05$ , Figure 3C,D).

### 2.3. Evaluation of the Role of Factor H Binding Proteins on *S. suis* Factor H Deposition

The deposition of factor H to *S. suis* strains was further evaluated. *Streptococcus mutans* was used as a negative control and showed only a weak deposition of factor H. Surprisingly, no significant differences were observed between the wild-type and *S. suis* mutant strains as depicted in Figure 4. Indeed, they were all similarly able to bind factor H ( $p > 0.05$ ).

### 2.4. Evaluation of the Role of CPS for *S. suis* Factor H Deposition

Aforementioned results suggest the presence of additional factors involved in factor H recruitment to the surface of *S. suis*, we further evaluated whether the CPS is also able to bind factor H at the bacterial surface. The recruitment of factor H in the absence of CPS was investigated using the non-encapsulated  $\Delta cps2F$  and the triple  $\Delta fhb/\Delta fhbp/\Delta cps2F$  mutants. As shown in Figure 5A, the  $\Delta cps2F$  mutant was significantly affected in its capacity to recruit factor H when compared to the wild-type strain ( $p = 0.0376$ ). Moreover, the additional effect of CPS and factor H binding proteins can be observed with the triple mutant ( $\Delta fhb/\Delta fhbp/\Delta cps2F$ ), for which significant differences were observed when compared not only to the wild-type strain ( $p = 0.0004$ ) but also to the  $\Delta cps2F$  mutant ( $p = 0.0181$ ).

To confirm that the CPS is able to bind factor H, and to evaluate the importance of the sialic acid moiety in such an interaction, an ELISA test using highly purified native and desialylated CPS was performed. Both native and desialylated CPS (at a concentration of at least 1  $\mu\text{g/mL}$ ) could significantly bind factor H ( $p = 0.0006$  and 0.0012, respectively) (Figure 5B).

### 2.5. C3b Cleavage Assay

The functional activity of factor H bound to the surface of *S. suis* was tested using a factor I-cofactor assay. C3b degradation products were identified by SDS-PAGE/Western blot. As depicted in Figure 6, all strains tested retained the capacity to degrade C3b as shown by the appearance of the  $\alpha'$  68 kDa cleavage product in addition to the  $\alpha$ -chain (116 kDa) and the  $\beta$ -chain (75 kDa) of C3b. Positive control with wild-type strain P1/7 (lane 6) shows normal C3b cleavage product ( $\alpha'$  68 kDa) by factor I in presence of factor H. The 68 kDa band does not appear with the wild-type strain P1/7 in the absence of factor H (lane 3; negative control).

### 2.6. Phagocytosis Assay

We investigated the role of both Fhb and Fhbp on the resistance capacity of *S. suis* to complement-mediated opsonophagocytosis. As shown in Figure 7, no significant differences were observed when comparing the wild-type strain with the single or double  $\Delta fhb/\Delta fhbp$  mutant. In contrast, the non-encapsulated strain  $\Delta cps2F$ , used as control, was susceptible to phagocytosis by macrophages showing significant difference with both wild-type and mutants strains ( $p < 0.0001$ ) (Figure 7).

### 2.7. Whole Blood Bacterial Killing Assay

Bacterial killing by whole swine blood showed no differences between the wild-type strain P1/7 and either of the  $\Delta fhb$ ,  $\Delta fhbp$  or  $\Delta fhb/\Delta fhbp$  mutants (Figure 8). Percentage of killing varied from 40 to 60% for all strains. Only the non-encapsulated  $\Delta cps2F$  mutant strain was shown to be highly susceptible, as expected, with 90% of bacteria being killed (Figure 8).

## DISCUSSION

The role of complement during the systemic infection caused by *S. suis* is still controversial. In an early report, Brazeau et al. suggested a limited role of complement in phagocytosis and killing of well encapsulated *S. suis* [14]. More recent studies showed that the complement limits *S. suis* invasion when using an intranasal mouse model of infection [15]. However, the role of complement in the *S. suis* systemic infection still remains to be confirmed.

Factor H is the key fluid phase regulator of the alternative complement pathway and acts as a cofactor in the factor I-mediated proteolysis of C3b [16]. Hence, pathogenic bacteria have developed mechanisms to recruit factor H to their surface to avoid complement attack and opsonophagocytosis. Indeed, several pathogens possess adhesins that are able to recruit factor H to their surface to degrade C3b in iC3b in order to reduce opsonophagocytosis by host cells [17,18]. Recruitment of factor H may also help bacteria to adhere and to invade epithelial and endothelial cells [19]. For most pathogens, different proteins expressed at the bacterial surface are responsible for factor H deposition [20]. In the case of *S. suis*, two factor H-binding proteins (Fhb and Fhbp) have been reported and characterized so far [10,11]. In the present study, we investigated the role of factor H, as well as those played by Fhb and Fhbp, as adhesion/invasion molecules for *S. suis* during bacterial interaction with host cells. In addition to these proteins, the role of CPS in the recruitment of factor H was also studied.

Results showed that factor H acts as an enhancing adhesion molecule for *S. suis* to epithelial and, to a lesser extent, endothelial cells. This function had been previously described for other human pathogens, including *S. pneumoniae* [19]. It has been suggested that factor H binds to pneumococci, and bound factor H is oriented in a way that it can interact with polyanionic molecules (glycoamynoglycans) on the surface of host cells [19]. Receptors used by the factor H bound to the *S. suis* surface in order to promote bacterial adhesion are still

unknown. The fact that the increased adhesion was considerably more significant with epithelial cells may indicate that this mechanism could mainly benefit bacteria during the early steps of the infection. Interestingly, although single  $\Delta fhb$  and  $\Delta fhbp$  mutants adhered similarly to the wild-type strain, a slight but significant reduction in adhesion to both cell types was observed with the double  $\Delta fhb/\Delta fhbp$ , suggesting, to a certain extent, an additive role when the two proteins are present. However, the possibility that the inactivation of one *S. suis* factor H binding protein (Fhb or Fhbp) induces the overexpression of the second protein (Fhbp or Fhb, respectively) cannot be ruled out. The actual role in vivo of factor H-dependent increased adhesion should be confirmed. In contrast to what has been described for *S. pneumoniae* [19], factor H does not increase the invasion properties of *S. suis* to the epithelial or endothelial cells tested. As expected, the absence of Fhb and Fhbp did not influence host cell invasion.

Interestingly, the bacterial proteins evaluated in this study do not play a critical role in adhesion/invasion to cells per se, since  $\Delta fhb$ ,  $\Delta fhbp$  single mutants as well as the double  $\Delta fhb/\Delta fhbp$  mutant behave similarly to the wild-type strain in the absence of factor H. These results were unexpected, since the pneumococcal surface protein C (PspC), which presents homology to the *S. suis* Fhbp, directly participates in *S. pneumoniae* cell adhesion by binding to host glycoconjugates and sialic acid residues [21]. In addition, the Fhb protein has been reported to be responsible for the *S. suis* binding to Gal $\alpha$ 1-4Gal present in glycolipid Gb03—abundant in epithelial and endothelial cells [22,23]. We could not find any previous work indicating that the Gb03 is precisely present in the epithelial cell line A549. However, this glycolipid has previously been shown to be present in the hBMEC line used in this study [24]. If the factor H-binding proteins of *S. suis* do not play any role in adhesion to epithelial and endothelial cells or if such a hypothetical role is redundant due to the presence of additional adhesins remains to be studied.

Surprisingly, although both Fhb and Fhbp proteins together play a limited but certain role in factor H-mediated adhesion to cells together, the absence of either one or both of these

proteins had no effect on the overall capacity of *S. suis* to recruit factor H at the bacterial surface. It might be possible that, although similar amounts of factor H may be recruited to the bacterial surface by other factor H binding factors, specific binding of factor H to both studied proteins may induce steric modifications that could slightly modify the enhanced capacity of bacteria to adhere to host cells. It has been previously shown that very specific domains of factor H are involved in the interactions with factor H-binding proteins [25]. However, this hypothesis remains to be elucidated.

Since factor H is still recruited at the bacterial surface of factor H-binding protein defective mutants, we hypothesized that additional bacterial factors may play important roles in such activity. It has been reported that some sialylated pathogens are able to recruit factor H due to the presence of sialic acid at their surface, as it is the case of *Neisseria gonorrhoeae* and *Pasteurella aeruginosa* [26,27]. Since the CPS of *S. suis* serotype 2 is rich in sialic acid [28], the capacity of such a CPS to interact with factor H was evaluated. To carry out such studies, a capsule-deficient ( $\Delta cps2F$ ) mutant and a triple mutant deficient in both factor H binding proteins and the CPS ( $\Delta fhb/\Delta fhbp/\Delta cps2F$ ) were produced. Interestingly, the non-encapsulated mutant recruited significantly less factor H to the bacterial surface than the wild-type strain. Although the CPS is thought to limit the exposition of cell surface components [29], it does not seem to be the case for factor H binding proteins. It has also been suggested for other pathogens that the presence of CPS does not reduce surface availability of factor H binding proteins [30,31]. Indeed, a clear collaborative and additive factor H-recruitment activity between Fhb and Fhbp proteins together with the CPS can be suggested, since the triple mutant ( $\Delta fhb/\Delta fhbp/\Delta cps2F$ ) recruited significantly less factor H deposition at the surface than both, the wild-type and the double-mutant ( $\Delta fhb/\Delta fhbp$ ) mutant.

Marques et al. (1992) demonstrated that wild-type Group B *Streptococcus* binds lower levels of active C3b as compared to mutants deficient in capsule and sialic acid expression, postulating that this could be due to the binding of factor H to sialic acid [32]. However, the sialic acid mutant used in that particular study was poorly encapsulated [33] and differences

observed could have been the result of the absence of sialic acid, CPS or both. A function of the CPS in resistance to complement deposition has already been shown for *S. suis* [13]. In addition, it has been recently demonstrated that the CPS would play an important role in the protection against the complement system in a *S. suis* experimental mucosal infection model [15]. In this study, and for the first time, we report that the CPS from a Gram-positive pathogen is able to recruit factor H. Desialylated CPS was, unexpectedly, also able to bind similar amounts of factor H than the native CPS, indicating that sialic acid is not the main sugar involved in binding such host factor. An encapsulated but sialic-acid negative mutant cannot be used to confirm these results, since such mutants are either non-encapsulated [33,34] or lethal [35] for *S. suis*. The mechanisms by which the CPS binds the factor H, as well as the ability of CPS from different *S. suis* serotypes to bind factor H remain to be elucidated. It has been previously shown that different serotypes of *S. pneumoniae* were able to differently recruit human factor H to their cell surface [30], although the specific role of the CPS was never investigated. Finally, the role of factor H interactions with a non-encapsulated *S. suis* strain on bacterial adhesion studies could not be performed, since capsule deficient mutants already adhere at very high levels to cells [36].

As mentioned, the triple ( $\Delta fhb/\Delta fhbp/\Delta cps2F$ ) mutant is still able to bind factor H to a certain extent, as compared to the *S. mutans* used as negative control. In addition, the wild-type strain of *S. suis* as well as all mutant strains tested in the factor-I cofactor assay equally retained the capacity to degrade C3b in the presence of factor H. These results strongly suggest the presence of additional *S. suis* surface components able to recruit factor H. For example, Shao et al. (2011) identified an immunogenic cell surface-associated protein (histidine triad protein of *S. suis*) involved in evasion of complement-mediated host innate immune responses by preventing C3 deposition on the bacterial surface of *S. suis* by so far unknown mechanisms [37]. Hence, other proteins redundantly being able to bind factor H may also exist.

Results obtained with the factor-I cofactor assay were confirmed by phagocytosis and killing assays. Single as well as the double  $\Delta fhb/\Delta fhbp$  mutants were as resistant to phagocytosis as the wild-type strain. This is the first time that the Fhbp is evaluated. However, these results are in disagreement with those previously published with a Fhb deficient mutant derived from a highly virulent Chinese strain [11], where the authors showed that the Fhb mutant was highly susceptible to phagocytosis by human neutrophils [11]. In addition, although that study also reported that the  $\Delta fhb$  mutant was sensitive to the blood-killing test and was less virulent in pigs (with lower levels of bacteremia) [11], no differences could be observed with the whole cell blood-killing test in the present study. Besides some technical details in the methodology as well as the use of different strains, we do not have clear explanations to explain such differences; in our hands, both Fhb and Fhbp proteins do not seem to be highly involved in factor H recruitment, resistance to phagocytosis or killing, and it would be highly surprising that these proteins play a critical role in virulence. In fact, single- and double-factor H binding proteins mutants used in the present study were shown to be as virulent as the wild-type strain in a mouse model of infection (unpublished). Finally, the role of the CPS in phagocytosis and killing has largely been shown [13,34], and it is probably not linked to the factor H recruitment activity.

In conclusion, binding of factor H to the *S. suis* surface increases bacterial adhesion to host cells, especially epithelial cells, and allows degradation of C3b. This factor H recruitment seems to modestly occur through Fhb, Fhbp and the CPS. However, these factors do not seem to be critical for such factor H binding activity as well as its consequences. It seems that recruitment of factor H to *S. suis* surface is multifactorial and redundant.



## **MATERIALS AND METHODS**

### *4.1. Bacterial Strains and Culture Conditions*

The virulent serotype 2 strain P1/7 was used as the wild-type strain for in-frame allelic deletion mutagenesis. *Streptococcus mutans* strain 25175 (ATCC, Manassas, VA, USA) was used as a negative control for factor H deposition studies. Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Streptococcus* strains were grown in Todd-Hewitt broth (THB) or agar (THA) (Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) at 37 °C. *Escherichia coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth or agar (Becton-Dickinson) at 37 °C. When needed, antibiotics (Sigma-Aldrich Canada Co., Oakville, ON, Canada) were added to the culture media at the following concentrations: for *S. suis*, spectinomycin (Sp) at 100 µg/mL; for *E. coli*: kanamycin (Km) and Sp at 50 µg/mL; and ampicillin at 100 µg/mL.

### *4.2. Cell Lines and Cell Culture*

The human lung epithelial cell line A549 (ATCC CCL-185) was used and cultured until confluent as previously described [19]. The human brain microvascular endothelial cell line (hBMEC, gift from Dr. K. S. Kim, Johns Hopkins University School of Medicine, MD, USA) was used and cultured until confluent as previously described [42]. THP-1 human monocytic cell line (ATCC TIB-202) was used and cultured as previously described [43].

### *4.3. DNA Manipulations*

*S. suis* genomic DNA was purified using InstaGene Matrix solution (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Oligonucleotide primers used in this study are listed in Table 2. Transformations of *Escherichia coli* were performed following the manufacturers' recommendations (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Extraction and purification of recombinant plasmids were performed using QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen Valencia, CA, USA). Restriction enzymes and DNA-modifying enzymes were purchased from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada) and used according to the manufacturers' recommendations.

PCR reactions were carried out with an iProof high-fidelity DNA polymerase (BioRad Laboratories) or with Taq DNA polymerase (Qiagen). Oligonucleotide primers were ordered from Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA). Amplification products were purified using the QIAgen PCR purification kit (Qiagen) and sequenced with an ABI 310 automated DNA sequencer using the ABI PRISM dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

#### *4.4. Construction of Allelic Deletion Mutants*

Fhb protein and CPS deficient mutants ( $\Delta$ fhb and  $\Delta$ cps2F) have been previously obtained and characterized [11,13]. Fhbp, double Fhb/Fhbp and triple Fhb/Fhbp/CPS deletion mutants were obtained for the first time in the present study. Precise in-frame deletions were achieved using splicing-by-overlap-extension PCR [44]. Overlapping PCR-products generated by PCR were cloned into plasmid pCR2.1 (Invitrogen), extracted using EcoRI, and cloned into the thermosensitive *E. coli*-*S. suis* shuttle vector pSET4s previously digested with EcoRI, giving rise to the p4 $\Delta$ fhb, p4 $\Delta$ fhbp and p4 $\Delta$ cps2F mutation vectors. Final constructions of pSET4s vector were electroporated into *S. suis* competent cells with a Biorad Gene Pulser Xcell apparatus (BioRad Laboratories) under specific conditions (12.5 kV/cm, 200  $\Omega$  and 25  $\mu$ F) and cells were plated on THA supplemented with Sp (THA + SP) and incubated for 3 days at 28 °C. Several Sp-resistant colonies were then subcultured again on THA + SP for 3 days at 28 °C. The candidates were next cultured on THA + SP and incubated at 37 °C for two successive passages and then screened for first crossing-over event. Loss of vector was induced by incubation of candidates at 28 °C. Temperature- and Sp-resistant clones were successively cultured on THA and THA + SP to obtain Sp-sensitive candidates. Deletion of the genes was confirmed by PCR and sequence analysis.

The lack of expression of Fhbp in the  $\Delta$ fhbp mutant was evaluated by immunoblot. Briefly, bacteria from 10 mL of overnight cultures of the wild-type, mutant and complemented strains under investigation were harvested by centrifugation and resuspended in PBS at OD600 = 0.600. Ten microliters of bacteria were mixed with 10  $\mu$ L of denaturing

electrophoresis buffer and boiled for 10 min. Samples were then electrophoresed on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide (SDS) gels. Western blotting was carried out as previously described by Burnette [45], using antisera from immunized rabbit with recombinant Fhbp protein, which was cloned, expressed and purified as previously described [10].

The presence of the CPS in  $\Delta$ fhb,  $\Delta$ fhbp and  $\Delta$ cps2F mutants were tested by the coagglutination and dot-ELISA tests using anti-serotype 2 polyclonal and monoclonal antibodies, respectively [46,47]. In addition, surface hydrophobicity was tested as previously described [34].

#### *4.5. Construction of Complemented $\Delta$ fhbp Mutant*

Complemented  $\Delta$ fhb and  $\Delta$ cps2F mutants had previously been done [11,13]. Since the Fhbp deficient mutant was obtained for the first time in this study, a complemented strain was also produced. Intact fhbp gene was amplified from genomic DNA of the wild-type strain with primers containing specific restriction sites (Table 2). PCR products and pMX1 vectors were then digested with the appropriate restriction enzyme before ligation. Final constructions were cloned into E. coli MC1061. Plasmid pMX1 is a derivative of the S. suis–E. coli shuttle cloning vector pSET2 and possesses the S. suis malX promoter for transgene expression in S. suis [40]. Complementation of  $\Delta$ fhbp mutant was achieved by transformation with pMXfhbp by electroporation under the same aforementioned conditions. Presence of the plasmid within the mutant was confirmed by PCR. Expression of the Fhbp was studied as described above.

#### *4.6. Adhesion and Invasion Assays*

The A549 and hBMEC cells were used to evaluate the adhesion properties of the different mutants and wild-type strains in presence or absence of factor H. Bacteria were grown to mid-logarithmic phase, harvested by centrifugation, washed three times and resuspended in PBS at OD600 = 0.600. One-hundred microliters of bacterial suspension (equivalent to  $1 \times 10^7$  CFU) were preincubated with 2  $\mu$ g of human factor H (Quidel, San

Diago, CA, USA) for 20 min at 37 °C. Four-hundred microliters of RPMI were then added to bacteria without washing out unbound factor H, as previously described for other streptococci [19]. Cells were infected with *S. suis* strains ( $1 \times 10^7$  CFU/well, multiplicity of infection (MOI): 50) and incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 1 hour. An adhesion assay—which in fact quantifies total intracellular bacteria and surface-adherent bacteria—was performed as previously described [48]. Cell monolayers were washed five times with PBS and lysed with sterile cold water. Viable bacteria were determined by plating samples onto THA using an Autoplate® 4000 Automated Spiral Plater (Spiral Biotech, Norwood, MA, USA). The invasion assay was performed using the antibiotic protection assay as previously described [48]. Briefly, after the initial incubation time, cell monolayers were washed twice with PBS and incubated for an additional 1 h with medium containing 5 µg/mL penicillin G (Sigma) and 100 µg/mL of gentamicin (Gibco, Burlington, ON, Canada) in order to kill extracellular bacteria. Cell monolayers were then washed three times with PBS and lysed with sterile cold water. Viable intracellular bacteria were determined as described above. Optimal incubation time and MOI for both adhesion and invasion tests were chosen based on published studies [42,49] and preliminary tests done with the wild-type strain. Adhesion and invasion tests were done in duplicates and repeated at least four times in independent experiments.

#### *4.7. Evaluation of Factor H Deposition to S. suis Strains*

Cell-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to evaluate the factor H deposition at the bacterial surface of different mutants obtained in this study, as previously described with some modifications [10]. Briefly, washed harvested bacteria were adjusted to an OD<sub>600</sub> of 0.2 in 50 mM carbonate buffer (pH 9.6). One-hundred microliters per well were added to flat-bottom 96-well microplates (Nunc-immuno® Polysorp; Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) and incubated for 2 h at room temperature. Bacterial suspension was removed and bound bacteria were fixed with glutaraldehyde (0.05%) for 45 min. Wells were then washed three times with PBS-Tween 0.05% (PBS-T) and blocked with PBS-T supplemented with 2% fat-free milk for 1 hour. After washing, fixed bacteria were then incubated in presence of 100 µL of human factor H (10 µg/mL in PBS) for 2 hours at 37 °C. Plates were then washed three times to remove unbound factor H. The deposition of factor H

at the bacterial surface was detected by goat antisera against human factor H (Quidel) and HRP-conjugated donkey anti-goat IgG antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). The OD450 was recorded with a microplate reader after adding horseradish peroxidase substrate. Each assay was repeated in duplicates in four independent experiments.

#### *4.8. Factor H Recruitment by the Capsular Polysaccharide*

In order to investigate the potential role of the CPS of *S. suis* serotype 2 as well as its sialic acid component in factor H recruitment, an ELISA was performed as previously described [50], with some modifications. Briefly, 100  $\mu$ L of native or desialylated CPS (0.1 or 1  $\mu$ g/mL in carbonate buffer), highly purified as previously described [28], was used to coat wells of Polysorp flat-bottom 96-well microplate and incubated at 37 °C for 2 h. Unbound CPS was washed with PBS-T three times and wells were blocked as described above. After washing, purified factor H (10  $\mu$ g/mL, chosen based on preliminary dose-response studies; not shown) was added to the wells and incubated for 2 h at room temperature. Correct binding of purified CPS to the wells was verified as described [50]. Deposition of factor H was detected as described above.

#### *4.9. C3b Cleavage Assay*

The functional activity of factor H bound to *S. suis* was assayed using a factor I-cofactor assay as described by Vaillancourt et al. [10]. Briefly, *S. suis* cells were incubated with human factor H (0.7  $\mu$ g/mL) for 2 h at 37 °C. Bacteria were then washed three times in PBS and suspended in the same buffer, and human C3b (4.5  $\mu$ g/mL; Calbiochem EMD chemicals, Billerica, MA, USA) as well as human factor I (2.5  $\mu$ g/mL; Quidel) were added. Following incubation at 37 °C for 2 h, denaturing electrophoresis buffer was added and the mixture was subjected to SDS-10% PAGE. Proteins were electrophoretically transferred onto a nitrocellulose membrane and C3b degradation products were visualized by Western blotting using goat anti-human C3b (1:500; Quidel) and then AP-conjugated mouse anti-goat IgG antibody (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Bands were revealed by adding the AP substrate.

#### *4.10. Phagocytosis Assays*

Activation of THP-1 monocytes was carried out as described by Segura et al. with some modifications [43]. Briefly, differentiation of monocytes was carried out by pre-treatment with phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma) (100 ng/mL) for 48 h prior to the test. Following differentiation, cells were washed three times with PBS and medium without antibiotics was added to each well. Bacteria were grown to mid-logarithmic phase and harvested by centrifugation. After incubation, 450  $\mu$ L of freshly thawed human serum (complement preserved, Quidel) were added to bacteria. Cells were infected with bacterial preparation ( $1 \times 10^7$  CFU/well, MOI: 10) and incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 90 min. Optimal incubation time and MOI were chosen based on preliminary studies (data not shown). After incubation, cell monolayers were washed twice with PBS and incubated for 1 h with medium containing 5  $\mu$ g/mL penicillin G (Sigma) and 100  $\mu$ g/mL of gentamicin (Gibco) to kill extracellular bacteria. Cell monolayers were washed three times with PBS and lysed with sterile cold water. Viable intracellular bacteria were determined by plating serial dilutions on THA as described above. Each test was repeated twice in three independent experiments.

#### *4.11. Whole Blood Bacterial Killing Assay*

Whole blood bacterial killing assay was adapted from whole blood culture system as previously described [51]. Blood from three 5-week-old healthy pigs was collected from the jugular vein using Vacutainer Heparin blood collection tubes. Animals originated from a specific pathogen-free herd, which had not presented any isolation of *S. suis* from diseased animals for at least the last 2 years. Blood was then diluted in RPMI 1640 culture medium (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) in order to obtain a concentration of  $1 \times 10^7$  leucocytes/mL. Plasma was used as control and similarly processed as the blood sample. Bacteria were grown and washed as described for phagocytosis assays and suspended in RPMI 1640 medium to a concentration of  $1 \times 10^6$  CFU/mL. For killing assay, 250  $\mu$ L of bacterial preparation were then added to 250  $\mu$ L of blood mixture. Infected blood cells and reference control (plasma) samples were collected after 2 h of incubation at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> with

manual agitation every 20 min. To determine bacterial counts, serial dilutions of infected blood cultures were plated onto THB agar to accurately determine the CFU/mL. The percentage of killed bacteria was calculated as follows:  $1 - (\text{Bacteria recovered in blood} / \text{Bacteria in plasma}) \times 100\%$ . Each test was repeated twice in three independent experiments.

#### *4.12. Statistical Analysis*

All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed for significance using the one-way ANOVA test followed by a Dunnett post-hoc test for multiple comparisons or with Student's t-test for comparisons between two groups. A p value  $< 0.05$  was used as a threshold for significance (\*). Values  $< 0.01$  were considered as highly significant (\*\*).

## CONCLUSION

Results obtained in this study showed a role of factor H in the adhesion of *S. suis* to epithelial and, to a lesser extent, endothelial cells. Both Fhb and Fhbp proteins play a certain role in such increased factor H-dependent adhesion. None of these proteins were a critical adhesin per se (in the absence of factor H). The CPS, independently of the presence of its sialic acid moiety, was also shown to bind factor H. The absence of both factor H-binding proteins does not influence the resistance of *S. suis* to phagocytosis by human macrophages and to bacterial killing by swine blood. It seems that recruitment of factor H to *S. suis* surface is multifactorial and redundant.

## ACKNOWLEDGMENTS

Katy Vaillancourt is acknowledged for her technical assistance. This study was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, grant #154280 to Marcelo Gottschalk, with a collaboration of NSERC grant #342150 to Mariela Segura and NSERC grant #04146 to Daniel Grenier). David Roy is the recipient of a scholarship from the Swine and Poultry Infectious Disease Research Center.



## TABLES

**Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study.**

Strains/Plasmid	General Characteristics	Source/References
<i>Escherichia coli</i>		
TOP 10	F-mrcAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)φ80 lacZΔM5 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen
MC1061	araD139 Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 galU galK hsdR2(rK-mK+) mcrB1 rpsL	[38]
<i>Streptococcus suis</i>		
P1/7	Wild-type strain, highly encapsulated serotype 2 strain isolated from a clinical swine case of infection in the United Kingdom	[39]
Δ <i>cps2F</i>	Non-encapsulated isogenic mutant strain derived from strain P1/7. Deletion of the <i>cps2F</i> gene	[13]
Δ <i>fhb</i>	Fhb expression-deficient strain derived from strain P1/7. Deletion of the <i>fhb</i> gene (SSU0253)	This work
Δ <i>fhbp</i>	Fhbp expression-deficient strain derived from strain P1/7. Deletion of the <i>fhbp</i> gene (SSU0186)	This work
Δ <i>fhb</i> /Δ <i>fhbp</i>	Fhb and Fhbp expression-deficient strain derived from strain P1/7. Deletion of the <i>fhb</i> and <i>fhbp</i> genes	This work
Δ <i>fhb</i> /Δ <i>fhbp</i> /Δ <i>cps2F</i>	Non-encapsulated mutant derived from strain Δ <i>fhb</i> /Δ <i>fhbp</i> . Deletion of the <i>cps2F</i> gene	This work
compΔ <i>fhbp</i>	Mutant Δ <i>fhbp</i> complemented with pMX <i>fhbp</i> complementation vector	This work
<i>Streptococcus mutans</i> 25175	Wild-type strain, isolated from a carious dentine case	ATCC 25175
Plasmids		
pCR2.1	Apr, Kmr, oriR(f1) MCS oriR (ColE1)	Invitrogen
pSET-4s	Thermosensitive vector for allelic replacement. Replication functions of pG+host3, MCS oriR pUC19 lacZ SpR	[40]
pMX1	Replication functions of pSSU1, MCS pUC19 lacZ SpR, malX promoter of <i>S. suis</i> , derivative of pSET2	[40,41]
p4Δ <i>fhb</i>	pSET-4s carrying the construct for <i>fhb</i> allelic replacement	This work

p4Δ <i>fhbp</i>	pSET-4s carrying the construct for <i>fhbp</i> allelic replacement	This work
p4Δ <i>cps2F</i>	pSET-4s carrying the construct for <i>cps2F</i> allelic replacement	This work
pMX <i>fhbp</i>	pMX1 complementation vector carrying intact <i>fhbp</i> gene	This work

---

**Table 2 Oligonucleotide primers used in this study**

	Oligonucleotide primers, Sequence (5' – 3') <sup>a</sup>	Constructs
fhbp-ID1	ACTGACAACATGACCGACCTCC	p4Δ <i>fhbp</i>
fhbp-ID2	TGTTGAAGTCTCTGTCGTCGC	p4Δ <i>fhbp</i>
fhbp-ID3	AAGTCATAAGGGCGCACCTTC	p4Δ <i>fhbp</i>
fhbp-ID4	TGTAGCCAGCGATAAAGGCTCTG	p4Δ <i>fhbp</i>
fhbp-ID5	AACAGCCAGGCTTATGGAAGG	p4Δ <i>fhbp</i>
fhbp-ID6	TATAGCTGTAGCGACACGAATACTATATCT	p4Δ <i>fhbp</i>
fhbp-ID7	AGATATAGTATTCGTGTCGCTACAGCTATA	p4Δ <i>fhbp</i>
fhbp-ID8	TGTCAAGCCAATCCATGTCTGG	p4Δ <i>fhbp</i>
fhb-ID1	TCGGTGCTATCTTGCGTAGTC	p4Δ <i>fhb</i>
fhb-ID2	CATCTGGTTCTAGCGATTCTGC	p4Δ <i>fhb</i>
fhb-ID3	TGATGCCAAAAGCAGAGGCAC	p4Δ <i>fhb</i>
fhb-ID4	TGGAAC <del>TTTC</del> GAGGTCGGTG	p4Δ <i>fhb</i>
fhb-ID5_EcoRI <sup>b</sup>	GGCGC <u>GAAATTC</u> CAAAGTTCTTGCCAGATGCCAC	p4Δ <i>fhb</i>
fhb-ID6	CCAGCCTATTGCGCTCCCTAATACGACTGT	p4Δ <i>fhb</i>
fhb-ID7	ACAGTCGTATTAGGGAGCGCAATAGGCTGG	p4Δ <i>fhb</i>
fhb-ID8_PstI <sup>b</sup>	GGCGC <u>CTGCAG</u> AAATTTCCGCCCTGACACAC	p4Δ <i>fhb</i>
pFHBP_F_PsI <sup>b</sup>	GCGC <u>CTGCAG</u> CACATCCGACCACCTGAATATC	pMX <i>fhbp</i>
pFHBP_R_PstI <sup>b</sup>	GGCGC <u>CTGCAG</u> GTTCTAAAAAGAGGCTGGGCG	pMX <i>fhbp</i>
cps-ID1	CCAGCAAAGTATGGTGGTTTCG	p4Δ <i>cps2F</i>
cps-ID2	GCGCACCAACTTCTCTTAATGC	p4Δ <i>cps2F</i>
cps-ID3	CTTAGTCACTCCGAACTCACCG	p4Δ <i>cps2F</i>
cps-ID4	CCACGCCAGATTCAATGAGC	p4Δ <i>cps2F</i>
cps-ID5	AGACGGTCATGAATGGCTACG	p4Δ <i>cps2F</i>
cps-ID6	GAGGGAGGTGTAGACTTCTGCTCCAGCATG	p4Δ <i>cps2F</i>

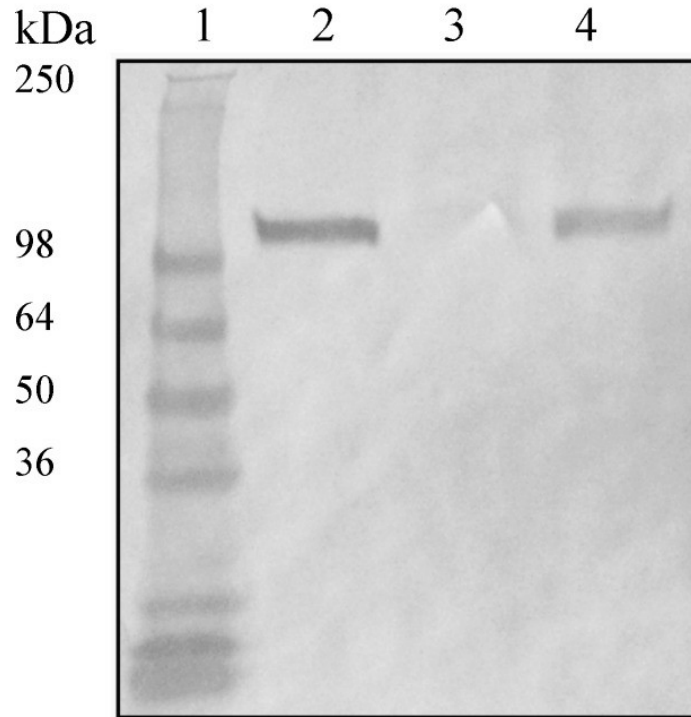
---

cps-ID7	CATGCTGGAGCAGAAGTCTACACCTCCCTC	p4Δ <i>cps2F</i>
cps-ID8	CATCAGAATGATGCCAAACAGG	p4Δ <i>cps2F</i>

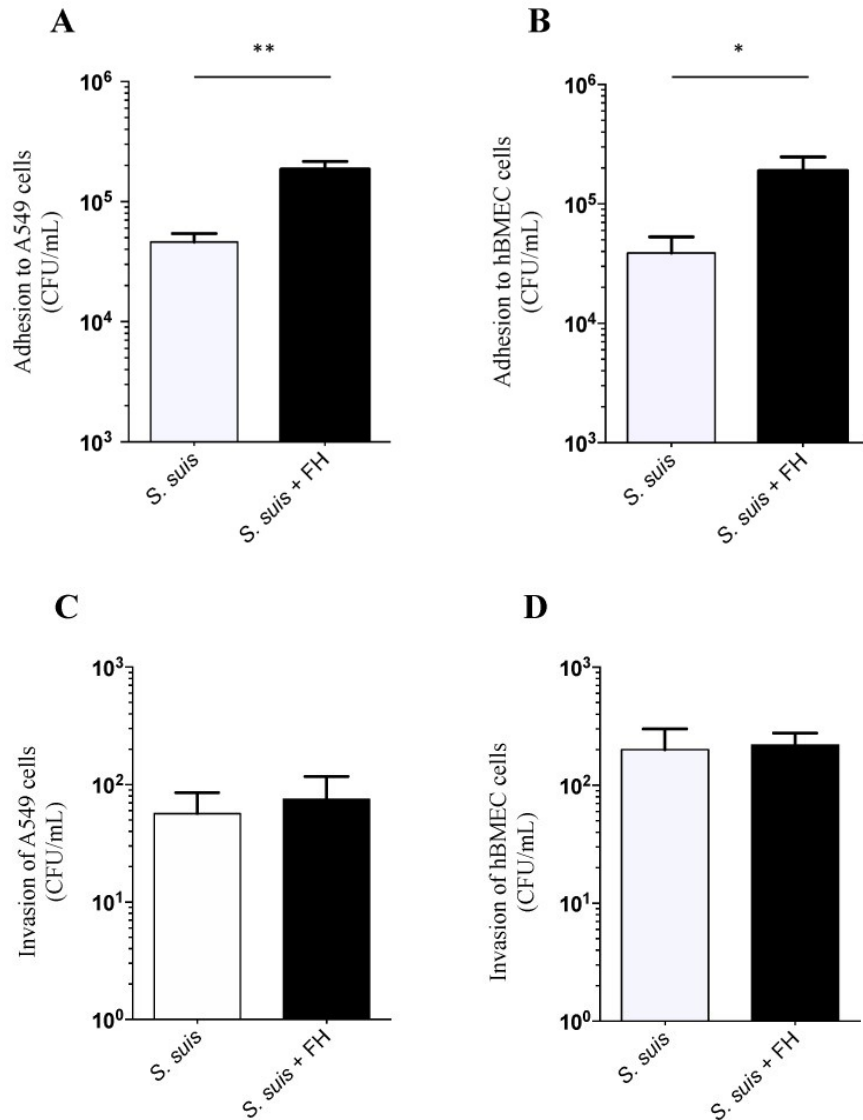
---

<sup>a</sup> Oligonucleotide primers were from IDT; <sup>b</sup> Restriction sites are underlined.

## FIGURES

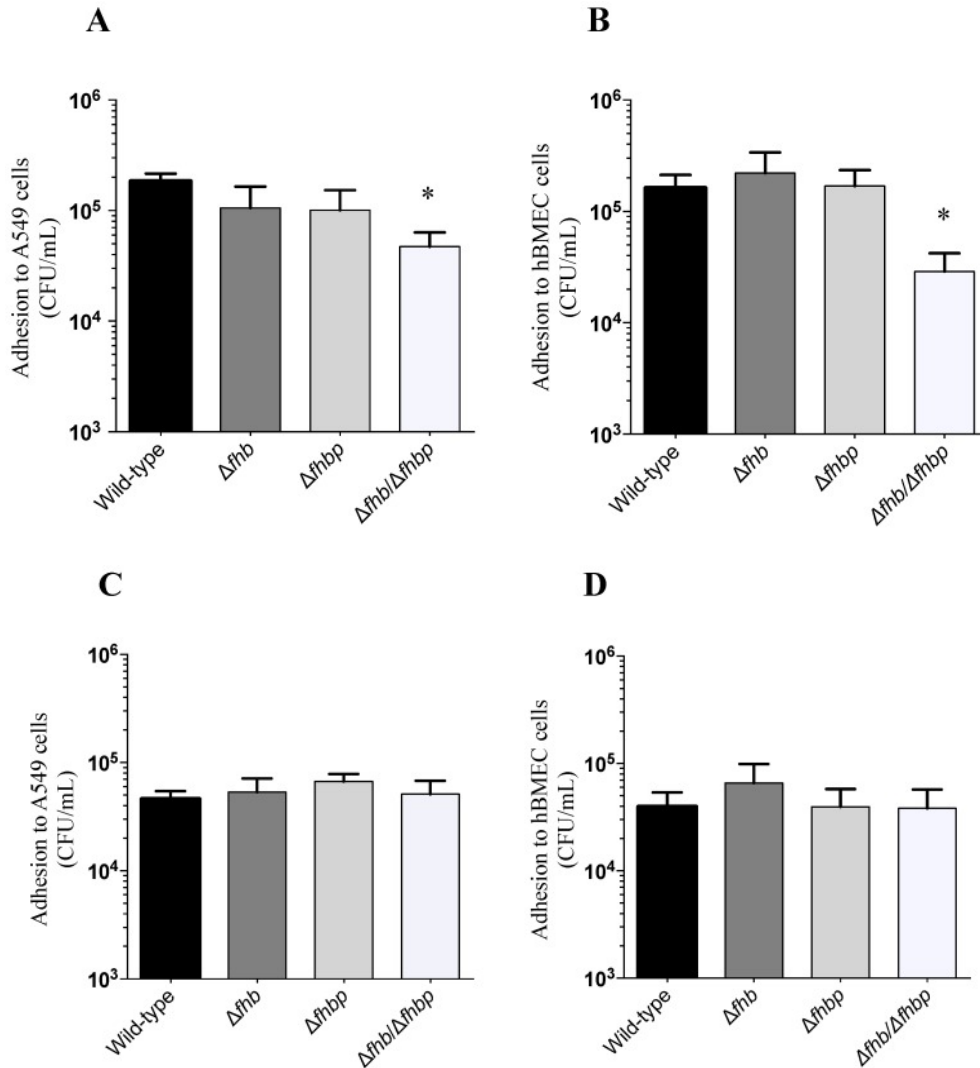


**Figure 1.** Western blot showing factor H binding protein (Fhbp) expression in *S. suis* wild-type strain P1/7 and complemented  $\Delta f h b p$  mutant but not in the isogenic  $\Delta f h b p$  mutant. Whole bacteria of *S. suis* wild-type strain P1/7 (lane 2),  $\Delta f h b p$  mutant (lane 3) and complemented  $\Delta f h b p$  mutant (lane 4) were tested for Fhbp expression. Samples were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. Fhbp protein was detected with a monospecific rabbit polyclonal antiserum against Fhbp. Fhbp protein was not detected in  $\Delta f h b p$  mutant, whereas a clear positive reaction was obtained for the wild-type strain and the complemented mutant. Molecular weights in kDa are indicated on the left side of the figure.



**Figure 2.** Effect of factor H on cell adhesion and invasion by *S. suis* wild-type strain P1/7. *S. suis* adhesion to (A) human lung epithelial cells A549 and (B) human brain microvascular endothelial cells (hBMEC). Results were determined after 1 h exposure of A549 and hBMEC cells to *S. suis*, followed by extensive washing of non-adherent bacteria and cell lysis to obtain *S. suis* viable counts. Results are expressed as recovered CFU/mL. Significant differences between the wild-type strain P1/7 preincubated with factor H and the same strain preincubated in phosphate buffered saline (PBS) were observed for both A549 and hBMEC cells (\*\*  $p = 0.006$  for A549 and \*  $p = 0.04$  for hBMEC), as determined by one-way ANOVA. *S. suis* invasion of (C) human lung epithelial cells A549 and (D) hBMEC. Results were determined after 1 h exposure of cells to *S. suis*, followed by antibiotic treatment to kill

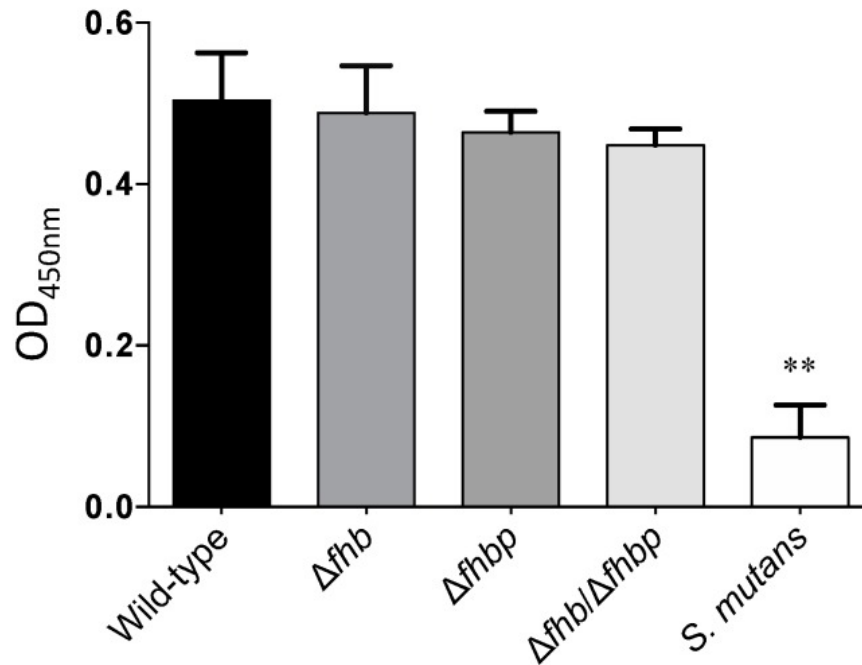
extracellular bacteria and by cell lysis to obtain *S. suis* viable counts. No significant differences were observed. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) of at least four independent experiments.



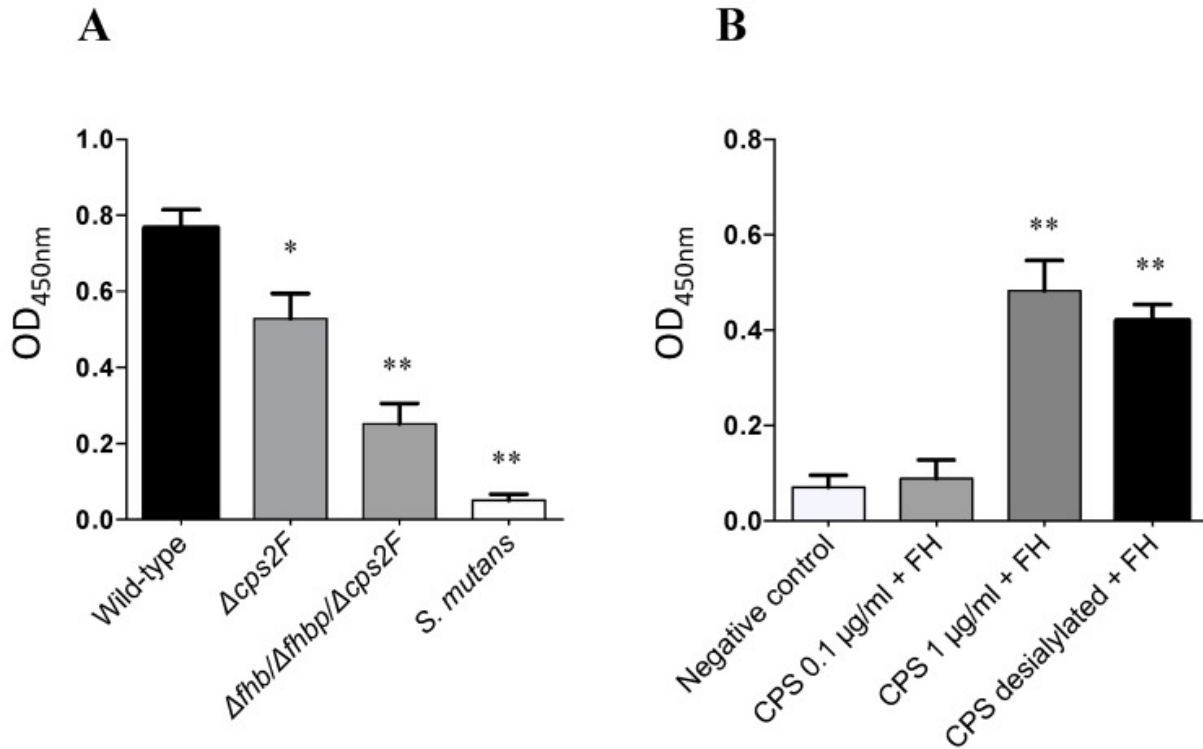
**Figure 3.** Effect of the deletion of *fhb* and *fhop* on the *S. suis* adhesion to A549 and hBMEC cells in the presence or absence of factor H. Adhesion of *S. suis* factor H binding (Fhb) and Fhop deficient mutants to (A,C) human lung epithelial cells A549 and to (B,D) hBMEC in presence (A,B) or absence (C,D) of human factor H. Experiments were performed as described in [Figure 2](#). Results are expressed as recovered CFU/mL. Significant differences between the double knock-out  $\Delta fhb/\Delta fhop$  mutant and wild-type strain P1/7 as well as single mutants were observed in presence of factor H for both A549 (\*  $p = 0.0279$ ) and hBMEC cells (\*  $p = 0.0214$ ), as determined by one-way ANOVA. No significant differences were observed



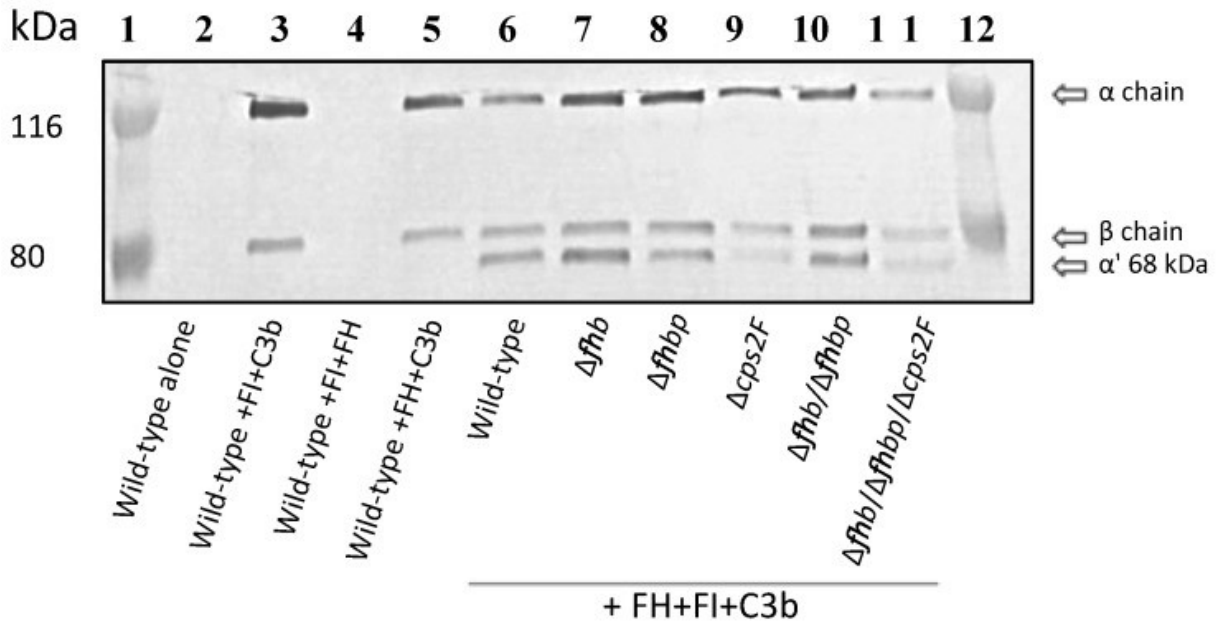
between the wild-type strain P1/7 and single deletion mutants ( $\Delta fhb$  and  $\Delta fhbp$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of at least four independent experiments.



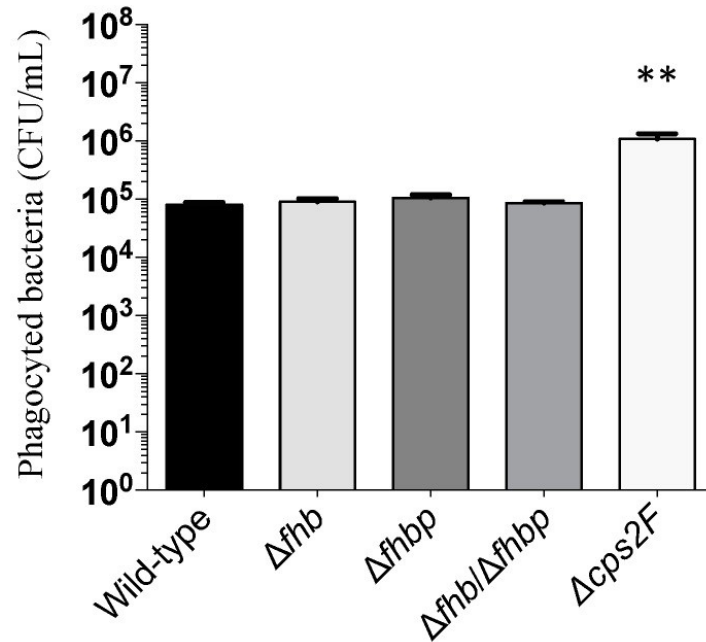
**Figure 4.** Deposition of factor H to the *S. suis* cell surface: role of Fhb and Fhbp. Deposition of factor H to the bacterial cell surface was detected using an ELISA assay. *Streptococcus mutans* was included as a negative control for factor H binding. There were statistically significant differences between all *S. suis* strains and *S. mutans* as determined by one-way ANOVA (\*\*  $p < 0.01$ ). No significant differences were observed between the *S. suis* wild-type strain P1/7 and isogenic mutants  $\Delta fhb$ ,  $\Delta fhbp$  and  $\Delta fhb/\Delta fhbp$ .



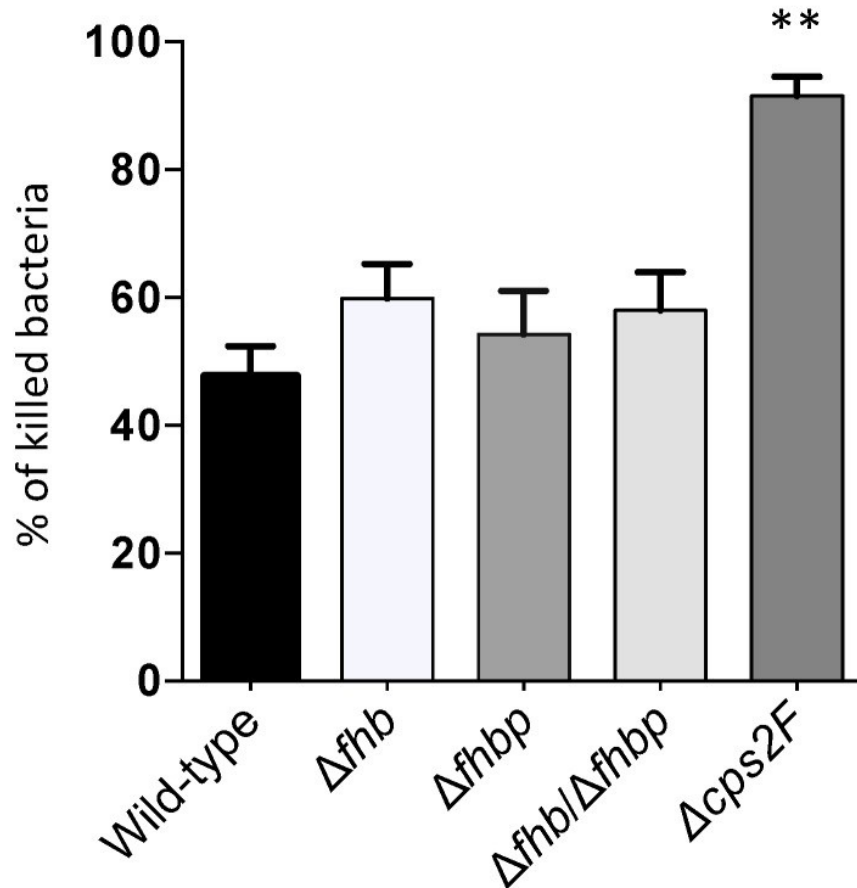
**Figure 5.** Deposition of factor H to the *S. suis* cell surface: role of capsular polysaccharide (CPS) and its sialic acid moiety. Results of ELISA showing binding of factor H to (A) non-encapsulated *S. suis* and to (B) *S. suis* purified CPS. There were statistically significant differences between groups for Figure 5A,B as determined by one-way ANOVA. In Figure 5A, significant differences with the wild-type strain are depicted with asterisks (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. In Figure 5B, different concentrations (0.1 and 1  $\mu$ g/mL) of precoated purified *S. suis* native and desialylated CPS were incubated with factor H (10  $\mu$ g/mL). Significant differences were observed with factor H incubated with native and desialylated CPS at 1  $\mu$ g/mL vs. control incubated without CPS (\*\*  $p = 0.0006$  and \*\*  $p = 0.0012$ , respectively). No significant differences were observed between native and desialylated CPS in their capacity to bind factor H ( $p > 0.05$ ).



**Figure 6.** Factor-I cofactor assay showing C3b degradation by *S. suis* strains. Immunoblot shows that factor H bound to *S. suis* strains serves as cofactor for factor I (FI)-mediated cleavage of C3b, resulting in formation of an  $\alpha'$ 68 kDa chain. Lane: 1, molecular mass marker; 2, Wild-type strain P1/7 alone; 3, Wild-type strain P1/7 + FI + C3b; 4, Wild-type strain P1/7 + FI + FH; 5, Wild-type strain P1/7 + FH + C3b; 6, Wild-type strain P1/7 + FH + FI + C3b; 7,  $\Delta fhb$  mutant strain + FH + FI + C3b; 8,  $\Delta fhb$  mutant strain + FH + FI + C3b; 9,  $\Delta fhb/\Delta fhb$  mutant strain + FH + FI + C3b; 10,  $\Delta cps2F$  mutant strain + FH + FI + C3b; 11,  $\Delta fhb/\Delta fhb/\Delta cps2F$  mutant strain + FH + FI + C3b; and 12, molecular mass marker. All strains retained the capacity to bound factor H in a way that serves as cofactor for factor I-mediated cleavage.



**Figure 7.** Phagocytosis of *S. suis* strains by THP-1 human macrophages in presence of complement-rich serum. Bacteria ( $1 \times 10^7$  CFU/mL) were incubated for 90 min with cells (MOI = 100) in presence of human serum, followed by gentamicin/penicillin G treatment to kill any remaining extracellular bacteria after incubation. Intracellular counts were done after three washes and cell lysis with water. Results represent the mean (CFU/mL)  $\pm$  SEM of four independent experiments. There were no statistical differences between the *S. suis* wild-type and any of the factor H-binding protein mutants. The non-encapsulated mutant (positive control) was significantly more phagocytosed as determined by one-way ANOVA (\*\*  $p < 0.01$ ).



**Figure 8.** Killing of *S. suis* by swine whole blood cells. Bacteria ( $5 \times 10^5$  CFU) were incubated for 120 min with swine whole blood or with blood serum (bacteria alone). The percentage of killed bacteria was calculated as follows:  $1 - (\text{Bacteria recovered in blood} / \text{bacteria recovered in serum}) \times 100\%$ . Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. There were not statistical differences between the *S. suis* wild-type and any of the factor H-binding protein mutants. The non-encapsulated mutant (positive control) was significantly more killed as determined by one-way ANOVA (\*\*  $p < 0.01$ ).

## REFERENCES

1. Gottschalk M. *Streptococcus*. 10th ed. Wiley-Blackwell; Ames, IA, USA: 2012.
2. Gottschalk M., Xu J., Calzas C., Segura M. *Streptococcus suis*: A new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol.* 2010;5:371–391. doi: 10.2217/fmb.10.2.
3. Wertheim H.F., Nghia H.D., Taylor W., Schultz C. *Streptococcus suis*: An emerging human pathogen. *Clin. Infect. Dis.* 2009;48:617–625. doi: 10.1086/596763.
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 Microb. Infect.* 2014;3:e45. doi: 10.1038/emi.2014.45.
5. Fittipaldi N., Segura M., Grenier D., Gottschalk M. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol.* 2012;7:259–279. doi: 10.2217/fmb.11.149.
6. Zipfel P.F. Complement factor h: Physiology and pathophysiology. *Semin. Thromb. Hemost.* 2001;27:191–199. doi: 10.1055/s-2001-15248.
7. de Cordoba S.R., de Jorge E.G. Translational mini-review series on complement factor h: Genetics and disease associations of human complement factor h. *Clin. Exp. Immunol.* 2008;151:1–13. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03552.x.
8. Welsch J.A., Ram S. Factor h and neisserial pathogenesis. *Vaccine.* 2008;26(Suppl. 8):I40–I45. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.11.060. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
9. Keller L.E., Jones C.V., Thornton J.A., Sanders M.E., Swiatlo E., Nahm M.H., Park I.H., McDaniel L.S. Pspk of *Streptococcus pneumoniae* increases adherence to epithelial cells and enhances nasopharyngeal colonization. *Infect. Immun.* 2013;81:173–181. doi: 10.1128/IAI.00755-12.
10. Vaillancourt K., Bonifait L., Grignon L., Frenette M., Gottschalk M., Grenier D. Identification and characterization of a new cell surface protein possessing factor h-binding

activity in the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. J. Med. Microbiol. 2013;62:1073–1080. doi: 10.1099/jmm.0.057877-0.

11. Pian Y., Gan S., Wang S., Guo J., Wang P., Zheng Y., Cai X., Jiang Y., Yuan Y. Fhb, a novel factor h-binding surface protein, contributes to the antiphagocytic ability and virulence of *Streptococcus suis*. Infect. Immun. 2012;80:2402–2413. doi: 10.1128/IAI.06294-11.

12. Li W., Liu L., Qiu D., Chen H., Zhou R. Identification of *Streptococcus suis* serotype 2 genes preferentially expressed in the natural host. Int. J. Med. Microbiol. 2010;300:482–488. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.04.018.

13. Lecours M.P., Gottschalk M., Houde M., Lemire P., Fittipaldi N., Segura M. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. J. Infect. Dis. 2011;204:919–929. doi: 10.1093/infdis/jir415.

14. Brazeau C., Gottschalk M., Vincelette S., Martineau-Doize B. In vitro phagocytosis and survival of *Streptococcus suis* capsular type 2 inside murine macrophages. Microbiology. 1996;142:1231–1237. doi: 10.1099/13500872-142-5-1231.

15. Seitz M., Beineke A., Singpiel A., Willenborg J., Dutow P., Goethe R., Valentin-Weigand P., Klos A., Baums C.G. Role of capsule and suilysin in mucosal infection of complement-deficient mice with *Streptococcus suis*. Infect. Immun. 2014;82:2460–2471. doi: 10.1128/IAI.00080-14.

16. Rodriguez de Cordoba S., Esparza-Gordillo J., Goicoechea de Jorge E., Lopez-Trascasa M., Sanchez-Corral P. The human complement factor h: Functional roles, genetic variations and disease associations. Mol. Immunol. 2004;41:355–367. doi: 10.1016/j.molimm.2004.02.005.

17. Horstmann R.D., Sievertsen H.J., Knobloch J., Fischetti V.A. Antiphagocytic activity of streptococcal m protein: Selective binding of complement control protein factor h. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988;85:1657–1661. doi: 10.1073/pnas.85.5.1657.



18. Biedzka-Sarek M., Jarva H., Hyytiainen H., Meri S., Skurnik M. Characterization of complement factor h binding to *Yersinia enterocolitica* serotype o:3. *Infect. Immun.* 2008;76:4100–4109. doi: 10.1128/IAI.00313-08.
19. Agarwal V., Asmat T.M., Luo S., Jensch I., Zipfel P.F., Hammerschmidt S. Complement regulator factor h mediates a two-step uptake of *Streptococcus pneumoniae* by human cells. *J. Biol. Chem.* 2010;285:23486–23495. doi: 10.1074/jbc.M110.142703.
20. Meri T., Amdahl H., Lehtinen M.J., Hyvarinen S., McDowell J.V., Bhattacharjee A., Meri S., Marconi R., Goldman A., Jokiranta T.S. Microbes bind complement inhibitor factor h via a common site. *PLoS Pathog.* 2013;9:47 doi: 10.1371/annotation/41169409-3260-4295-baf4-ala4621a8e48.
21. Quin L.R., Onwubiko C., Moore Q.C., Mills M.F., McDaniel L.S., Carmicle S. Factor h binding to pspc of *Streptococcus pneumoniae* increases adherence to human cell lines in vitro and enhances invasion of mouse lungs in vivo. *Infect. Immun.* 2007;75:4082–4087. doi: 10.1128/IAI.00474-07.
22. Zhang C.M., Hao H.J., Yu Y., Kong D.C., Chen S.L., Jiang H., Yuan Y., Zheng Y.L., Yang M.J., Jiang Y.Q. Structural basis of the interaction between the meningitis pathogen *Streptococcus suis* adhesin fhb and its human receptor. *FEBS Lett.* 2016 doi: 10.1002/1873-3468.12174.
23. Kouki A., Haataja S., Loimaranta V., Pulliainen A.T., Nilsson U.J., Finne J. Identification of a novel streptococcal adhesin p (sadb) protein recognizing galactosyl- $\alpha$ 1–4-galactose-containing glycoconjugates: Convergent evolution of bacterial pathogens to binding of the same host receptor. *J. Biol. Chem.* 2011;286:38854–38864. doi: 10.1074/jbc.M111.260992.
24. Schweppe C.H., Bielaszewska M., Pohlentz G., Friedrich A.W., Bunttemeyer H., Schmidt M.A., Kim K.S., Peter-Katalinic J., Karch H., Muthing J. Glycosphingolipids in vascular endothelial cells: Relationship of heterogeneity in gb3cer/cd77 receptor expression with differential shiga toxin 1 cytotoxicity. *Glycoconj. J.* 2008;25:291–304. doi: 10.1007/s10719-007-9091-7.
25. Hammerschmidt S., Agarwal V., Kunert A., Haelbich S., Skerka C., Zipfel P.F. The host immune regulator factor h interacts via two contact sites with the pspc protein of

*Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells. J. Immunol. 2007;178:5848–5858. doi: 10.4049/jimmunol.178.9.5848.

26. Ram S., Sharma A.K., Simpson S.D., Gulati S., McQuillen D.P., Pangburn M.K., Rice P.A. A novel sialic acid binding site on factor h mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. J. Exp. Med. 1998;187:743–752. doi: 10.1084/jem.187.5.743. 27. Langford-Smith A., Day A.J., Bishop P.N., Clark S.J. Complementing the sugar code: Role of gags and sialic acid in complement regulation. Front. Immunol. 2015;6:25. doi: 10.3389/fimmu.2015.00025.

28. Van Calsteren M.R., Gagnon F., Lacouture S., Fittipaldi N., Gottschalk M. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide. Biochem. Cell. Biol. 2010;88:513–525. doi: 10.1139/O09-170.

29. Meijerink M., Ferrando M.L., Lammers G., Taverne N., Smith H.E., Wells J.M. Immunomodulatory effects of *Streptococcus suis* capsule type on human dendritic cell responses, phagocytosis and intracellular survival. PLoS ONE. 2012;7:47 doi: 10.1371/journal.pone.0035849.

30. Hyams C., Trzcinski K., Camberlein E., Weinberger D.M., Chimalapati S., Noursadeghi M., Lipsitch M., Brown J.S. *Streptococcus pneumoniae* capsular serotype invasiveness correlates with the degree of factor h binding and opsonization with c3b/ic3b. Infect. Immun. 2013;81:354–363. doi: 10.1128/IAI.00862-12.

31. McNeil L.K., Murphy E., Zhao X.J., Guttmann S., Harris S.L., Scott A.A., Tan C., Mack M., DaSilva I., Alexander K., et al. Detection of Ip2086 on the cell surface of *Neisseria meningitidis* and its accessibility in the presence of serogroup b capsular polysaccharide. Vaccine. 2009;27:3417–3421. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.01.075.

32. Marques M.B., Kasper D.L., Pangburn M.K., Wessels M.R. Prevention of c3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III Group B Streptococci. Infect. Immun. 1992;60:3986–3993.

33. Lecours M.P., Fittipaldi N., Takamatsu D., Okura M., Segura M., Goyette-Desjardins G., Van Calsteren M.R., Gottschalk M. Sialylation of *Streptococcus suis* serotype 2 is essential for

capsule expression but is not responsible for the main capsular epitope. *Microb. Infect.* 2012;14:941–950. doi: 10.1016/j.micinf.2012.03.008.

34. Roy D., Auger J.P., Segura M., Fittipaldi N., Takamatsu D., Okura M., Gottschalk M. Role of the capsular polysaccharide as a virulence factor for *Streptococcus suis* serotype 14. *Can. J. Vet. Res.* 2015;79:141–146.

35. Lakkitjaroen N., Takamatsu D., Okura M., Sato M., Osaki M., Sekizaki T. Capsule loss or death: The position of mutations among capsule genes sways the destiny of *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2014;354:46–54. doi: 10.1111/1574-6968.12428.

36. Roy D., Fittipaldi N., Dumesnil A., Lacouture S., Gottschalk M. The protective protein sao (surface antigen one) is not a critical virulence factor for *Streptococcus suis* serotype 2. *Microb. Pathog.* 2014;67–68:31–35. doi: 10.1016/j.micpath.2014.02.002.

37. Shao Z., Pan X., Li X., Liu W., Han M., Wang C., Wang J., Zheng F., Cao M., Tang J. Htps, a novel immunogenic cell surface-exposed protein of *Streptococcus suis*, confers protection in mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 2011;314:174–182. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02162.x

38. Casadaban M.J., Cohen S.N. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 1980;138:179–207. doi: 10.1016/0022-2836(80)90283-1.

39. Slater J.D., Allen A.G., May J.P., Bolitho S., Lindsay H., Maskell D.J. Mutagenesis of *Streptococcus equi* and *Streptococcus suis* by transposon tn917. *Vet. Microbiol.* 2003;93:197–206. doi: 10.1016/S0378-1135(03)00030-0.

40. Takamatsu D., Osaki M., Sekizaki T. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid.* 2001;46:140–148. doi: 10.1006/plas.2001.1532.

41. Okura M., Osaki M., Fittipaldi N., Gottschalk M., Sekizaki T., Takamatsu D. The minor pilin subunit sgp2 is necessary for assembly of the pilus encoded by the srtg cluster of *Streptococcus suis*. *J. Bacteriol.* 2011;193:822–831. doi: 10.1128/JB.01555-09.

42. Charland N., Nizet V., Rubens C.E., Kim K.S., Lacouture S., Gottschalk M. *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* 2000;68:637–643. doi: 10.1128/IAI.68.2.637-643.2000.

43. Segura M., Vadeboncoeur N., Gottschalk M. Cd14-dependent and-independent cytokine and chemokine production by human thp-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. Clin. Exp. Immunol. 2002;127:243–254. doi: 10.1046/j.1365-2249.2002.01768.x.
44. Warrens A.N., Jones M.D., Lechler R.I. Splicing by overlap extension by pcr using asymmetric amplification: An improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. Gene. 1997;186:29–35. doi: 10.1016/S0378-1119(96)00674-9.
45. Burnette W.N. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate—Polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein a. Anal. Biochem. 1981;112:195–203. doi: 10.1016/0003-2697(81)90281-5.
46. Gottschalk M., Higgins R., Jacques M., Mittal K.R., Henrichsen J. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol. 1989;27:2633–2636.
47. Charland N., Jacques M., Lacouture S., Gottschalk M. Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 1/2. Microbiology. 1997;143:3607–3614. doi: 10.1099/00221287-143-11-3607.
48. Wang Y., Gagnon C.A., Savard C., Music N., Srednik M., Segura M., Lachance C., Bellehumeur C., Gottschalk M. 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. 2013;81:4498–4508. doi: 10.1128/IAI.00818-13.
49. Lalonde M., Segura M., Lacouture S., Gottschalk M. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. Microbiology. 2000;146:1913–1921. doi: 10.1099/00221287-146-8-1913.
50. Calzas C., Lemire P., Auray G., Gerdt V., Gottschalk M., Segura M. Antibody response specific to the capsular polysaccharide is impaired in *Streptococcus suis* serotype 2-infected animals. Infect. Immun. 2015;83:441–453. doi: 10.1128/IAI.02427-14.

51. Segura M., Vanier G., Al-Numani D., Lacouture S., Olivier M., Gottschalk M. Proinflammatory cytokine and chemokine modulation by *Streptococcus suis* in a whole-blood culture system. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2006;47:92–106. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00067.x.

## ***ARTICLE III***

### **The bias of experimental design, including strain background, in the determination of critical *Streptococcus suis* serotype 2 virulence factors**

**Jean-Philippe Auger<sup>1,2</sup>, Sarah Chuzeville<sup>1,2</sup>, David Roy<sup>1,2</sup>, Annabelle Mathieu-Denoncourt<sup>1,2</sup>, Jianguo Xu<sup>3</sup>, Daniel Grenier<sup>1,4</sup>, Marcelo Gottschalk<sup>1,2</sup>.**

<sup>1</sup> Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA), Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

<sup>2</sup> Research Group on Infectious Diseases in Production Animals (GREMIP), Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

<sup>3</sup> Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China

<sup>4</sup> Oral Ecology Research Group (GREB), Faculty of Dentistry, Laval University, Quebec City, Quebec, Canada

Publié dans PLOS One

Academic Editor: Jens Kreth

Received: April 18, 2017; Accepted: June 30, 2017; Published: July 28, 2017

doi: 10.1371/journal.pone.0181920

**Rôle de la candidate dans la conception de l'article :**

J'ai participé aux manipulations en lien avec l'adhésion aux cellules et à l'analyse de ces résultats.

## **ABSTRACT**

*Streptococcus suis* serotype 2 is an important porcine bacterial pathogen and emerging zoonotic agent mainly responsible for sudden death, septic shock, and meningitis. However, serotype 2 strains are genotypically and phenotypically heterogeneous. Though a multitude of virulence factors have been described for *S. suis* serotype 2, the lack of a clear definition regarding which ones are truly “critical” has created inconsistencies that have only recently been highlighted. Herein, the involvement of two factors previously described as being critical for *S. suis* serotype 2 virulence, whether the dipeptidyl peptidase IV and autolysin, were evaluated with regards to different ascribed functions using prototype strains belonging to important sequence types. Results demonstrate a lack of reproducibility with previously published data. In fact, the role of the dipeptidyl peptidase IV and autolysin as critical virulence factors could not be confirmed. Though certain *in vitro* functions may be ascribed to these factors, their roles are not unique for *S. suis*, probably due to compensation by other factors. As such, variations and discrepancies in experimental design, including *in vitro* assays, cell lines, and animal models, are an important source of differences between results. Moreover, the use of different sequence types in this study demonstrates that the role attributed to a virulence factor may vary according to the *S. suis* serotype 2 strain background. Consequently, it is necessary to establish standard experimental designs according to the experiment and purpose in order to facilitate comparison between laboratories. Alongside, studies should include strains of diverse origins in order to prevent erroneous and biased conclusions that could affect future studies.



## INTRODUCTION

*Streptococcus suis* is an important porcine bacterial pathogen and emerging zoonotic agent mainly responsible for sudden death (pigs), septic shock (humans), and meningitis (both species) [1]. Of the different described serotypes based on the presence of the capsular polysaccharide or its respective genes, serotype 2 is regarded as not only the most widespread worldwide, but also the most virulent, responsible for the majority of porcine and human cases of *S. suis* infection [2]. Using multilocus sequence typing, the distribution of the most important sequence types (STs) of *S. suis* serotype 2 has been determined worldwide [2]. Moreover, recent studies have evaluated the virulence of these important STs using well-characterized mouse models of infection, where virulence is defined based on the capacity of a strain to induce clinical disease and mortality [3, 4]. The ST7 strain responsible for the human outbreaks of 1998 and 2005 in China [5] is highly virulent whereas European ST1 strains are virulent; on the other hand, ST25 strains, typically recovered in North America, are of intermediate virulence [3].

Over the years, a multitude of virulence factors, presently totaling more than 150, have been described to be implicated in the *S. suis* serotype 2 pathogenesis in pigs and humans [6-9]. However, the lack of a clear definition regarding what constitutes a virulence factor for *S. suis*, which generally differs from one laboratory to another, and the fact that many of these have redundant roles, have greatly hindered the identification of truly “critical” virulence factors and created inconsistencies throughout the literature [9]. Indeed, of the different factors described so far, at least 76 have been reported to be implicated in virulence, while 35 of these were critical for virulence since their absence resulted in avirulence [9]. Alongside, many putative virulence factors are present in certain virulent strains but not in others, such as the suilysin, muramidase-released protein (MRP), and extracellular protein factor, which currently serve as virulence markers for Eurasian *S. suis* serotype 2 strains only, since these are often absent in North American strains [2, 9, 10]. In fact, the North American strains that do possess the MRP are associated with lower virulence [4, 10]. Moreover, the important roles played by a putative virulence factor might depend on the genetic background of the selected strain.

Finally, the use of differing experimental designs, including in vitro assays, cell lines, and animal models, have made it extremely difficult to accurately compare results between laboratories [9].

Herein, the involvement of two *S. suis* serotype 2 virulence factors previously described as being critical were evaluated with regards to different ascribed functions using prototype strains belonging to three of the most important STs (ST1, ST7, and ST25). These proteins, which served as tools, were chosen among the more than 150 putative virulence factors described for *S. suis* on the basis of being present in strains from these three backgrounds. The dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), originally studied using a ST7 isolate recovered from a human case during the 2005 Chinese outbreak [11], is a serine protease widely distributed in eukaryotes and bacteria that has been suggested to contribute to bacterial pathogenesis [12]. Meanwhile, the autolysin [13], originally studied using a ST378 strain recovered from a diseased pig in China [14], is a peptidoglycan hydrolase implicated in various bacterial functions such as cell wall turnover, cell division, and cell separation [13]. Consequently, the aim of this study was to determine the bias of experimental design, including strain background, in the determination of *S. suis* serotype 2 virulence factors in order to better clarify the recently highlighted controversy caused by inconsistencies plaguing this field of research.

## MATERIALS AND METHODS

### *2.1 Ethics statement*

This study was carried out in accordance with the recommendations of the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The protocols and procedures were approved by the Animal Welfare Committee of the University of Montreal (Permit Number: Rech-1570).

### *2.2 Bacterial strains and growth conditions*

The three well-characterized and highly encapsulated intermediate to highly virulent prototype wild-type *S. suis* serotype 2 strains and their isogenic mutants used in this study are listed in Table 1. Strains are minimally passaged and virulence of strains is routinely tested using cell-based assays and experimental infection models. The *S. suis* strains were cultured in Todd Hewitt broth (THB; Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada). For adhesion assays, bacterial cultures were prepared as previously described [15]. Briefly, upon reaching the mid-exponential phase, bacteria were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, and resuspended in PBS for adhesion to fibronectin or cell culture medium (Gibco, Burlington, ON, Canada) for adhesion to porcine epithelial cells (described below). For experimental infections, early stationary phase bacteria were washed twice in PBS and resuspended in THB [4, 16, 17]. Bacterial cultures were appropriately diluted and plated on THB agar to accurately determine bacterial concentrations. mRNA expression of the *dppIV* and *atl* genes was determined to be similar between the three wild-type strains under the growth conditions used in this study as quantified by RT-qPCR (data not shown). The *Escherichia coli* strain and different plasmids used in this study are also listed in Table 1. When needed, antibiotics (Sigma, Oakville, ON, Canada) were added to the media at the following concentrations: for *S. suis*, spectinomycin at 100 µg/mL and chloramphenicol at 5 µg/mL; for *E. coli*, kanamycin and spectinomycin at 50 µg/mL and chloramphenicol at 30 µg/mL.

### 2.3 DNA manipulations

*S. suis* genomic DNA was extracted using the InstaGene Matrix solution (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Mini-preparations of recombinant plasmids were carried out using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Restriction enzymes and DNA-modifying enzymes (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) were used according to the manufacturer's recommendations. Oligonucleotide primers (Table 2) were obtained from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) and PCRs carried out with the iProof proofreading DNA polymerase (BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) or with the Taq DNA polymerase (Qiagen). Amplification products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and sequenced using an ABI 310 Automated DNA Sequencer and the ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

### 2.4 Construction of the isogenic dipeptidyl peptidase IV and autolysin mutants

The DNA genome sequences of the wild-type *S. suis* strains were used. In-frame deletions of the *dppIV* or *atl* genes were constructed using splicing-by-overlap-extension PCRs as previously described [11, 13, 22]. Overlapping PCR products were cloned into pCR2.1 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), extracted with EcoRI, recloned into the thermosensitive *E. coli*-*S. suis* shuttle plasmid pSET4s, and digested with the same enzyme, giving rise to the knockout vector p4Δ*dppIV* or p4Δ*atl*. Electroporation of the three *S. suis* wild-type strains and procedures for isolation of the mutants were previously described [23]. Allelic replacement was confirmed by PCR and DNA sequencing analysis. Amplification products were purified with the QIAGEN PCR Purification Kit (Qiagen) and sequenced as described above. mRNA expression of upstream and downstream genes flanking the *dppIV* and *atl* genes in the mutant strains was confirmed by RT-PCR, validating in-frame gene deletion (data not shown). Growth of the different mutant strains was similar to that of the wild-type strains (data not shown).

### 2.5 *S. suis* adhesion to human fibronectin (microtiter plate binding assay)

Fibronectin adhesion assays were carried out as previously described [24]. Briefly, microtiter plates were coated with different concentrations of human plasma fibronectin

(Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), ranging from 0 to 10 µg/mL, in 0.1 M carbonate buffer, pH 9.6. Formaldehyde-killed bacterial suspensions (equivalent to 1 x 10<sup>8</sup> colony forming units [CFU]/mL) of the different wild-type and mutant strains were added and the plates incubated for 2 h at 37°C. It was previously demonstrated that killing of *S. suis* using 0.2% formaldehyde does not affect its capacity to bind fibronectin [24]. An anti-*S. suis* serotype 2 rabbit serum followed by a horseradish peroxidase-labelled anti-rabbit IgG conjugate (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) were used. The anti-*S. suis* serum equally recognized the wild-type and mutant strains by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [24]. The enzyme substrate, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Zymed, San Francisco, CA, USA) was used according to the manufacturer's instructions, the reaction stopped using 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the optical density measured at 450 nm using a microtiter plate reader (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA). Uncoated wells served as background controls. Casein-coated wells served as a control for non-specific adhesion of *S. suis* to protein-coated wells.

#### *2.6 S. suis adhesion to porcine tracheal epithelial cells*

The newborn porcine tracheal epithelial cell line (NPTr) was used and cultured until confluent as previously described [25]. Cells were infected with *S. suis* (10<sup>6</sup> CFU/well; multiplicity of infection [MOI]=10) by removing the cell culture medium, adding 1 mL of bacteria in cell culture medium without antibiotics, and incubating for 2 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> as previously described [15]. Following incubation, cells were washed five times with PBS to remove non-adherent bacteria and lysed using 1 mL of sterile water. The lysates were appropriately diluted and plated on THB agar to quantify adhered bacteria. Alongside, the last wash was plated to confirm absence of non-adhered bacteria. The percentage of adhered bacteria was calculated according to the following: CFU recovered 2 h post-incubation / inoculum x 100% [11, 13].

#### *2.7 S. suis biofilm formation capacity*

The biofilm formation capacity of the different wild-type and mutant strains was determined as previously described [26]. Moreover, the protocol used was identical to that described by Ju et al., including the use of 2 mg/mL of porcine fibrinogen (Sigma-Aldrich),

incubation for 24 h at 37°C, subsequent staining with crystal violet, and measurement of the optical density at 575 nm [13].

### *2.8 S. suis in vivo virulence mouse infections*

A well-standardized C57BL/6 mouse model of infection was used [3, 4, 17]. These studies were carried out in strict accordance with the recommendations of and approved by the University of Montreal Animal Welfare Committee guidelines and policies, including euthanasia to minimize animal suffering through the use of humane endpoints, applied throughout this study when animals were seriously affected since mortality was not an endpoint measurement. No additional considerations or housing conditions were required. All staff members received the required animal handling training as administered by the University of Montreal Animal Welfare Committee. A total of 140 six-week-old male and female C57BL/6 mice (Jackson Research Laboratories, Bar Harbour, MA, USA) were used (10 to 15 mice/group) in this study. Mice were inoculated with  $5 \times 10^7$  CFU via the intraperitoneal route and health and behavior monitored at least thrice daily until 72 h post-infection (p.i.) and twice thereafter until the end of the experiment (14 days p.i.) for the development of clinical signs of sepsis, such as depression, swollen eyes, rough hair coat, and lethargy. Mice were also monitored for the development of clinical signs of meningitis. Clinical scores were determined according to the grid approved by the University of Montreal Animal Welfare Committee (S1 Appendix) and required actions undertaken. Mice were immediately euthanized upon reaching endpoint criteria using CO<sub>2</sub> followed by cervical dislocation. No mice died before meeting endpoint criteria and all surviving mice were euthanized as described above at the end of the experiment (14 days p.i.). Blood samples were collected from the caudal vein of surviving mice 24 h p.i. and plated as previously described [4].

### *2.9 Statistical analyses*

Significant differences were determined using the t-test, Mann-Whitney Rank sum test, one way ANOVA, and ANOVA on ranks, where appropriate. For in vivo virulence experiments, survival was analyzed using the LogRank test. A  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### *3.1 The S. suis serotype 2 dipeptidyl peptidase IV and autolysin are not major fibronectin-binding adhesins, regardless of the sequence type of the strain used*

Adhesion to host extracellular matrix (ECM) components is an important and often crucial initial step of the bacterial pathogenesis [8]. Amongst the different components of the ECM is plasma fibronectin, to which both the DPPIV of a ST7 strain and the autolysin of a ST378 strain were previously reported to bind [11, 13]. Results showed similar levels of adhesion to fibronectin between the wild-type ST1, ST7, and ST25 strains, as measured by ELISA (Fig 1). The role of the DPPIV and autolysin in binding human fibronectin was then evaluated using their respective isogenic mutants. In the presence of 10 µg/mL of fibronectin (concentration shown to be optimal for *S. suis*; data not shown), no significant differences were observed between the adhesion of the  $\Delta$ dppIV or  $\Delta$ alt mutants and their respective wild-type strains, regardless of the ST of the strain used (Fig 1). Similar results were obtained using lower concentrations of fibronectin (data not shown). These results suggest that the DPPIV and autolysin are not major human fibronectin-binding adhesins for *S. suis* serotype 2.

### *3.2 The S. suis serotype 2 dipeptidyl peptidase IV, unlike the autolysin, does not play a major role in adhesion to porcine tracheal epithelial cells*

Adhesion to host cells is a requirement for subsequent interactions, including cell activation and establishment of the disease [8]. Indeed, it was previously suggested that both the DPPIV [11] and autolysin [13] are implicated in adhesion of *S. suis* serotype 2 to the human laryngeal epithelial cell line HEp-2. Herein, adhesion of the different wild-type strains and the role of the DPPIV and autolysin in adhesion to the porcine tracheal epithelial cell line NPTr was determined after 2 h of incubation with a MOI=10 and results expressed as percentage of adhered inoculum. Adhesion of the wild-type ST1 strain was greatest, with that of the ST7 strain being intermediate, while the ST25 strain adhered the least, adhesion of which was significantly lower than that of the wild-type ST1 strain only ( $p < 0.01$ ) (Fig 2). Moreover, results showed that the autolysin, but not the DPPIV, plays an important role in the adhesion to NPTr for the three wild-type strains ( $p < 0.001$ ) (Fig 2). In fact, adhesion of the

autolysin-deficient mutants was only 0.6%, 0.6%, and 0.4% of the inoculum for the ST1, ST7, and ST25 strains, respectively, in comparison to 2.3%, 1.9%, and 1.4% for their respective wild-type strains. As such, adherence of the three mutant strains was reduced by more than 70%. The DPPIV mutants, however, showed no differences compared to their respective wild-type strains regarding adhesion to porcine epithelial cells.

### *3.3 The dipeptidyl peptidase IV is not involved in S. suis serotype 2 biofilm formation, while the implication of the autolysin is strain-dependent*

Alongside adhesion to host ECM and cells, the capacity to form biofilm has been described as important for the *S. suis* pathogenesis, being involved in survival and propagation [8]. In order to enhance the biofilm formation capacity of the wild-type and mutant strains, culture medium was supplemented with porcine fibrinogen as previously described [26]. Results demonstrated that the wild-type ST1 strain produced significantly more biofilm than both the wild-type ST7 ( $p < 0.05$ ) and ST25 strains ( $p < 0.01$ ), though the ST7 strain produced more than the ST25 strain ( $p < 0.01$ ) (Fig 3). While no data were available regarding a role of the DPPIV in biofilm formation by *S. suis*, the autolysin was previously reported to be implicated using a *S. suis* serotype 2 ST378 strain [13]. Using the same experimental design as previously used for the autolysin, the involvement of these two putative virulence factors in the capacity of the three wild-type *S. suis* strains to form biofilm was evaluated. While the DPPIV was not involved in biofilm formation, regardless of the sequence type of the strain used, the autolysin of the ST7 and ST25 strains participated in biofilm formation ( $p < 0.001$ ), but not that of the ST1 strain (Fig 3).

### *3.4 The S. suis serotype 2 dipeptidyl peptidase IV and autolysin do not behave as critical virulence factors in an experimental model of S. suis serotype 2 infection*

In order to evaluate the role of the DPPIV and autolysin in virulence, a well-characterized C57BL/6 mouse model of infection was used [4, 17]. In this model, mice succumb to septic shock during the systemic infection, after which surviving mice are susceptible of developing meningitis. While no differences in survival were observed between mice infected with the wild-type ST1 (Fig 4A) and ST7 (Fig 4B) strains, results showed that the ST7 strain induced host death more rapidly than the ST1 strain. Moreover, the wild-type



ST1 and ST7 strains caused significantly more mortality than the wild-type ST25 strain (Fig 4C) ( $p < 0.05$ ): mortality caused by the ST25 strain was delayed and, unlike with the two other wild-type strains, partially due to the development of meningitis. For the virulent European ST1 strain (Fig 4A) and the highly virulent Chinese ST7 strain (Fig 4B), no significant role of the DPPIV and autolysin as critical virulence factors was observed. Moreover, this was also the case for the DPPIV of the intermediate virulent North American ST25 strain (Fig 4C). Meanwhile, and surprisingly, the ST25 autolysin-deficient mutant caused significantly higher mortality ( $p < 0.05$ ) than its wild-type strain (Fig 4C). These results were confirmed in a subsequent infection (data not shown). Given these results, the *S. suis* serotype 2 DPPIV and autolysin are not significantly involved in virulence using a C57BL/6 mouse model of infection.

### *3.5 The S. suis serotype 2 ST25 autolysin hinders bacterial survival in blood*

Given the higher virulence of the autolysin-deficient ST25 strain, blood bacterial burden, which when uncontrolled may be responsible for *S. suis*-induced host death [4, 17], was evaluated 24 h p.i. for the wild-type ST25 strain and its two isogenic mutants. Indeed, blood bacterial burden was significantly higher ( $p < 0.01$ ) in mice infected with the ST25 autolysin-deficient mutant than in those infected with either the wild-type strain or the DPPIV-deficient mutant, between which burdens were similar (Fig 5). This suggests that the autolysin might somewhat hinder survival of the ST25 strain in blood.

## DISCUSSION

Though a multitude of virulence factors have been described for *S. suis* serotype 2, a clear definition of what constitutes a critical virulence factor is still lacking for this pathogen. This confusion has led to inconsistencies throughout the literature, resulting in a controversy that has only just been highlighted [9]. Consequently, the involvement of two *S. suis* serotype 2 factors, the DPPIV and autolysin, described as critical for virulence, was evaluated with regards to previously ascribed bacterial functions implicated in the *S. suis* pathogenesis using strains belonging to three important STs.

It is important to mention that the study by Ge et al. regarding the *S. suis* serotype 2 DPPIV was conducted using a ST7 strain (05ZYH33) isolated from the 2005 Chinese human outbreak [11]. Similarly, the ST7 strain used in the present study (SC84) was also isolated from a human case of streptococcal toxic shock-like syndrome during the same outbreak [19]. Since different isolates recovered from this outbreak have been reported to be highly similar [5], the influence of the background should be minimal between these two strains. Meanwhile, the strain originally used to study the *S. suis* serotype 2 autolysin by Ju et al. is a ST378 (HA9801) according to the *S. suis* Multilocus Sequence Typing Website (<http://ssuis.mlst.net>) [13]. This ST was never reported beforehand and has not been reported since. To facilitate comparison of the methodologies used between the previous [11, 13] and present studies, the main experimental designs of the different assays are listed in Table 3. Since mRNA expression of *dppIV* and *atl* is similar between the three wild-type strains under the growth conditions used in this study, the differences observed herein are probably due to other variations between the strains, such as the presence/absence of putative virulence factors and/or differential expression of these factors.

In order to evaluate the reproducibility of previously published results with strains from different backgrounds, the role of the *S. suis* serotype 2 DPPIV [11] and autolysin [13] in binding human plasma fibronectin was evaluated using a virulent European ST1 strain, the highly virulent clonal ST7 strain, and an intermediate virulent North American ST25 strain.

The similar capacity of the three wild-type strains to bind human plasma fibronectin suggests this characteristic might be common to *S. suis* serotype 2, indicating a possibly universal role in the pathogenesis of this bacterium. Moreover, no significant implication of the *S. suis* serotype 2 DPPIV or autolysin in binding human fibronectin was observed when using isogenic mutants, regardless of the ST and fibronectin concentration. While these results cannot exclude those previously obtained using the recombinant DPPIV and autolysin as evaluated by ELISA and Western blot, respectively, they suggest that while the recombinant proteins themselves might bind human fibronectin, their absence is not sufficient to affect binding to this ECM component by *S. suis*. This lack of role when using isogenic mutants could be the result of compensation by one or more of the 18 factors currently known to bind fibronectin other than the DPPIV and autolysin: the fibronectin/fibrinogen-binding protein [27], enolase [28], Ssa (fibronectin-binding protein) [29], MRP [30], sortase A-anchored protein [31], catabolite control protein A [32], type II histidine triad protein [33], fructose-bisphosphate aldolase, lactate dehydrogenase, oligopeptide-binding protein OppA precursor, elongation factor Tu [34], sbp2 (putative pilin subunit) [35], translation elongation factor G, phosphoglycerate mutase, phosphoglycerate kinase, pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit, and chaperonin GroEL [36]. Indeed, 29 different *S. suis* serotype 2 virulence factors have been described so far as binding ECM components [8, 9], which supports bacterial redundancy [37]. This redundancy was recently demonstrated for another putative virulence factor of *S. suis* serotype 2: the deletion of a single factor H-binding protein, of which ten have been described and another six have been proposed, is not sufficient to inhibit bacterial binding to factor H [38-41]. In fact, the simultaneous deletion of two of these genes, alongside a triple knockout for the capsular polysaccharide (also reported to bind factor H), remained insufficient to abolish binding to factor H, suggesting compensation by at least another bacterial factor, most probably one or more of these described proteins [38]. Consequently, a descriptive role for a bacterial protein alone is probably not sufficient to claim an important role in the pathogenesis of the infection, especially when other factors with redundant functions have already been described.

Adhesion to ECM components may subsequently led to interactions with host cells, which is an important step of bacterial pathogenesis [8]. It was previously demonstrated that

the DPPIV of the ST7 strain and the autolysin of a ST378 strain are both implicated in adhesion to the human laryngeal epithelial cell line HEp-2 [11, 13]. Interestingly, the percentage of adhesion to epithelial cells obtained herein varied between STs, indicating a role of strain background. In fact, the ST1 and ST7 strains, which are virulent and highly virulent, respectively, adhered more than the intermediate virulent ST25 strain. Since adhesion to host cells may lead to cell invasion, differences in adhesion might influence host dissemination and virulence [6, 8]. Results obtained herein demonstrate that the DPPIV was not involved in adhesion to epithelial cells, regardless of the methodology used being similar (MOI and incubation time) and the ST being the same to that previously described [11]. However, certain differences in methodology still exist, such as the number of washes prior to cell lysis, the volume of water used to lyse the cells and, most notably, the origin of the cells used: human laryngeal epithelial cells versus porcine tracheal epithelial cells [11]. Though these two cell lines are both epithelial cells derived from the respiratory epithelium, it is impossible to ascertain that no other differences exist, such as histological differences between the trachea and larynx and the method used to immortalize the cells. Although it has been reported that adhesion to porcine and human epithelial cells by *S. suis* serotype 2 may be similar [15], the HEp-2 cells may not be an appropriate model for evaluating the role of all putative *S. suis* virulence factors since the respiratory route of infection has not been demonstrated for humans [9]. Consequently, these problems suggest that the experimental design used should be justified and the methodology standardized to ease comparison between studies and laboratories.

Meanwhile, a role of the autolysin in adhesion to host cells was confirmed when using porcine epithelial cells, and this for all three ST tested. Interestingly, it was previously reported that absence of the autolysin resulted in adhesion of only 50% of the inoculum by the mutant strain, while 100% of the wild-type strain inoculum adhered after 3 h of incubation [13]. These results greatly differ from those obtained in this study, in which approximately only 2% of the different wild-type strain inoculums and 0.5% of the autolysin-deficient mutant inoculums adhered to the epithelial cells. In fact, the high *S. suis* adhesion levels to epithelial cells reported by Ju et al. have never been observed by other researchers [13]. An hypothesis explaining the results of Ju et al. is that the elevated initial MOI (MOI=100) and longer

incubation time (3 h) may have led to bacterial replication within the wells [13]. Interestingly, despite differences in methodology and the origin of the cells, results obtained in this study arrived to the same conclusions for all three STs tested, suggesting that the role of this putative virulence factor in adhesion to epithelial cells might be universal for *S. suis* serotype 2.

Alongside adhesion to host ECM and cells, the capacity to form biofilm is an essential step of the bacterial pathogenesis involved in survival and propagation of the pathogen [8]. Interestingly, the three wild-type strains produced varying levels of biofilm, indicating a role of strain background concerning this capacity. These differences imply that choice of strain can have an important effect on the results obtained when evaluating certain characteristics or functions of *S. suis*. Moreover, the DPPIV was determined not to be involved in biofilm formation, regardless of the ST of the strain used. Though no role in biofilm formation had been attributed to this *S. suis* protein in the past, the lack of evaluation could have suggested otherwise, as exemplified by *Porphyromonas gingivalis*, for which the DPPIV is clearly involved in biofilm formation [42]. On the other hand, the autolysin was implicated in biofilm formation for the ST7 and ST25 strains, but not the ST1 strain. While the autolysin was previously reported to be implicated in biofilm formation by an ST378 strain, its absence resulted in a 25% decrease of production for the latter [13], while a decrease corresponding to nearly 70% of the biofilm formed by the wild-type ST7 and ST25 strains was observed herein. These results indicate a strain-dependent role of the *S. suis* serotype 2 autolysin with regards to this bacterial function. Consequently, these results demonstrate the impact of strain background and the bias introduced by this choice when evaluating virulence factors. This is important given that most studies regarding the evaluation of *S. suis* serotype 2 virulence factors have used ST1 or ST7 strains only.

When evaluating the implication of bacterial virulence factors, the ultimate demonstration remains the use of *in vivo* infection models. However, there exists a vast variety of *S. suis* serotype 2 animal infection models, which has complicated comparison of results. Of these the mouse is one of the most popular, with the inbred C57BL/6 breed being commonly used [3, 4, 17, 43]. Firstly, results obtained herein confirm previous studies in which the ST1 and ST7 strains were reported to both be virulent, with the ST7 strain inducing

mortality more rapidly than the ST1 strain [3, 4]. Moreover, the wild-type ST25 strain caused less mortality and in a delayed time due to an important number of cases of meningitis, as previously reported [3, 4]. Unlike previously reported for a ST7 strain, results obtained herein demonstrate that the DPPIV is not implicated in virulence and host death, regardless of the ST of the strain used [11]. It is worth mentioning that unlike the C57BL/6 mice used in this study, Ge et al. only specify using specific pathogen free-mice [11]. It must be presumed that these mice are BALB/c since this is the breed used for the immunization experiments conducted within the same publication [11]. C57BL/6 mice, which were used in the present study, are reliable for *S. suis* studies as they exhibit a prototypical Th1 immune response and a strong pro-inflammatory response [17, 44, 45]. On the other hand, BALB/c mice are the prototypical Th2 mouse breed [44]. As such, the innate immune response differs between these two breeds: C57BL/6 mice produce higher levels of the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF) and the Th1 cytokine interleukin (IL)-12p70, in comparison to BALB/c mice [44, 46]. Moreover, macrophages isolated from C57BL/6 mice produce effector molecules required for bacterial killing, including nitric oxide, whereas those from BALB/c do not, resulting in impaired bactericidal activity of the latter [44].

In addition, the route of infection may also differentially affect the conclusions. Herein, bacteria were inoculated via the intraperitoneal route (IP), while the route of inoculation used by Ge et al. although not clearly stated, was probably intravenous (IV) [11]. Though bacteria will reach the bloodstream following IP inoculation via lymphatic drainage, the initial cell types activated will differ: IP inoculation results in activation of peritoneal macrophages while IV injection leads to immediate stimulation of blood leukocytes [47]. Indeed, it was previously reported that the route of infection had an effect on disease development following Group B *Streptococcus* infection [48, 49]. To our knowledge, the IV route of inoculation for *S. suis* in mice has been used in only a limited number of studies [50-52], while most mouse studies have used the IP route of infection for *S. suis*, as reviewed by Segura et al. [9].

Meanwhile, the role of the autolysin of a ST378 strain in virulence was previously evaluated using the zebrafish model of infection [13], in which the autolysin-deficient mutant presented attenuated virulence. However, using the C57BL/6 mouse model of infection,

results from the present study indicate that the autolysin does not critically contribute to virulence and does not participate in host death, independently of the ST of the strain tested. An important difference between these studies, alongside the ST of the strains used, is the experimental design and the use of animal model. Though zebrafish possess innate and adaptive immune responses [53], the genetic differences with pigs and humans are greater than those between mice and pigs or humans [54]. Although ethical regulations facilitate the use of zebrafish over mice, the former are cold-blooded, are a model in which it is more difficult to conduct central nervous system studies (meningitis being the most important pathology caused by *S. suis* serotype 2), and are limited to lethal dose 50 studies [9]. Consequently, results obtained with zebrafish are difficult to extrapolate, which may limit their use in determining *S. suis* virulence factors.

Surprisingly, autolysin-deficiency resulted in increased virulence of the ST25 strain. This was unexpected since autolysin-deficient mutants of other pathogenic Gram-positive bacteria, including for LytA of *Streptococcus pneumoniae* [55] and AtlE of *Staphylococcus epidermidis* [56], were less virulent than their respective wild-type strains. Indeed, the *S. pneumoniae* autolysin, involved in cell wall remodeling, is responsible for the release of the pneumolysin, an important virulence factor of this pathogen [57]. Consequently, in the absence of the autolysin, it is possible that cell wall remodeling and protein secretion could be altered or halted, resulting in alteration of the ST25 bacterial strain surface architecture. It is well known that certain surface proteins of *S. suis* are important activators of the host cells [6, 8], and these may, by remaining attached to the bacteria or by being differentially expressed, contribute to inflammation and host death. Moreover, absence of the autolysin resulted in increased survival of the ST25 strain in blood, suggesting that this protein could play additional functions alongside those previously described for *S. suis* [13] as well as for other pathogenic streptococci [57]. Indeed, the *Staphylococcus saprophyticus* autolysin, Aas, was shown to bind sheep erythrocytes [58], although this function has not been described for *S. suis* so far. Further investigations will be required in order to better understand these differences in virulence and the possibly unique roles of this protein in ST25 strains.

## **CONCLUSIONS**

This study reiterates the urgent need in arriving to a consensus regarding the definition of *S. suis* serotype 2 virulence factors. Inconsistencies abound in the literature due to differences obtained between laboratories, and these have created a controversy that has only just been highlighted. The main source of these differences are variations and discrepancies in experimental design, including in vitro assays, cell lines, and animal models, which greatly affect the results, as demonstrated in this study for both the DPPIV and autolysin. Moreover, the use herein of different strain backgrounds has demonstrated that differences in bacterial characteristics and functions, alongside the role attributed to a virulence factor, may vary according to the *S. suis* serotype 2 strain. Consequently, it will be important to establish standard experimental designs, including methodology and appropriate cell lines and animal models, according to the experiment and purpose in order to facilitate comparison between laboratories. Alongside, studies should include strains of diverse origins in order to prevent erroneous and biased conclusions that could affect future studies. Finally, the use of alternative animal models cannot definitively exclude the role of a given *S. suis* virulence factor that may significantly contribute to disease during a natural infection in pigs. For example, the DPPIV has been reported to contribute to tissue degradation and perturbation of the host defense system [59], roles that although not critical in themselves, could significantly contribute to the final outcome of the natural infection by *S. suis*.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank Sonia Lacouture (University of Montreal) for invaluable technical assistance. This publication made use of the *Streptococcus suis* Multilocus Sequence Typing Website (<http://www.mlst.net>) at Imperial College London developed by David Aanensen.



## TABLES

**Table 1. Strains and plasmids used in this study.**

Strains/plasmids	General characteristics	Reference
<i>Streptococcus suis</i>		
P1/7	Wild-type, virulent European ST1 strain isolated from a case of pig meningitis in the United Kingdom	[18]
P1/7 $\Delta$ dppIV	Isogenic mutant derived from P1/7; in frame deletion of the dppIV gene	This study
P1/7 $\Delta$ atl	Isogenic mutant derived from P1/7; in frame deletion of the atl gene	This study
SC84	Wild-type, highly virulent ST7 strain isolated from a case of human streptococcal toxic shock-like syndrome during the 2005 outbreak in China	[19]
SC84 $\Delta$ dppIV	Isogenic mutant derived from SC84; in frame deletion of the dppIV gene	This study
SC84 $\Delta$ atl	Isogenic mutant derived from SC84; in frame deletion of the atl gene	This study
89-1591	Wild-type, intermediate virulent North American ST25 strain isolated from a case of pig sepsis in Canada	[20]
89-1591 $\Delta$ dppIV	Isogenic mutant derived from 89-1591; in frame deletion of the dppIV gene	This study
89-1591 $\Delta$ atl	Isogenic mutant derived from 89-1591; in frame deletion of the atl gene	This study
<i>Escherichia coli</i>		
TOP 10	F- mrcA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 araD139 $\Delta$ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen
Plasmids		
pCR2.1	Apr, Kmr, oriR(f1) MCS oriR (ColE1)	Invitrogen
pSET-4s	Thermosensitive vector for allelic replacement in <i>S. suis</i> . Replication functions of pG + host3, MCS oriR pUC19 lacZ SpR	[21]
p4 $\Delta$ dppIV	pSET-4s carrying the construct for dppIV allelic replacement	This work
p4 $\Delta$ atl	pSET-4s carrying the construct for atl allelic replacement	This work

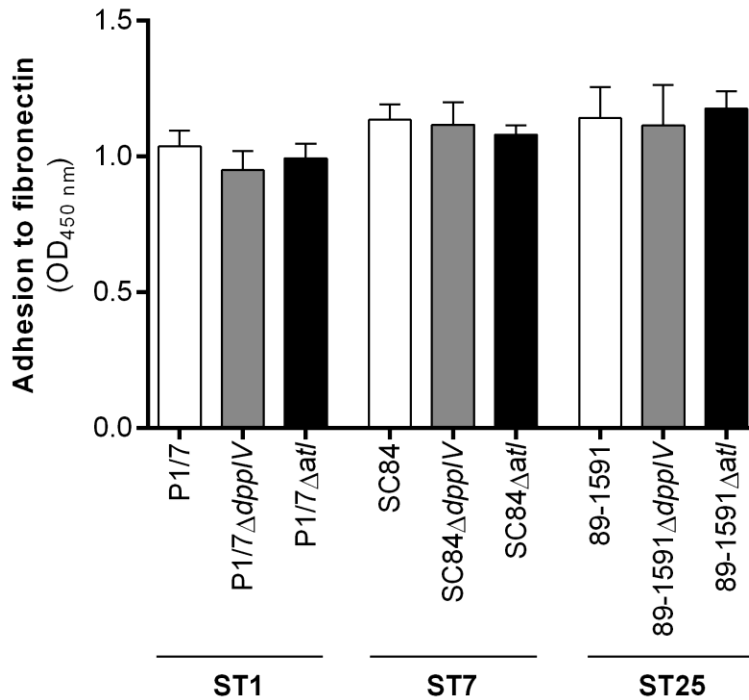
**Table 2.** Oligonucleotide primers used for the construction of the *S. suis* dipeptidyl peptidase IV (dppIV) and autolysin (atl) mutants used in this study.

<b>Name</b>	<b>Primer Sequence (5' – 3')</b>
ST1 & ST7ΔdppIV_1	GATCCAGCTCCAACCTCCAATTC
ST1 & ST7ΔdppIV_2	TTGGGATCATGCACCACACC
ST1 & ST7ΔdppIV_3	CCCCCGGGGAAGTTCCGGCACCAATTCCAG
ST1 & ST7ΔdppIV_4	TCCGTCTACTTGCAAATTTCTCAATGGCAAATCCAC CTTG
ST1 & ST7ΔdppIV_5	TTGCCATTGAGAATTTTGCAAGTAGACGGAGGTC
ST1 & ST7ΔdppIV_6	CGGGATCCGTTTCGGAACATACCAAAGGG
ST25ΔdppIV_1	CAATAAGAAGCCCAGCAAGAG
ST25ΔdppIV_2	GTTGCAAGTACCCTCATTTC
ST25ΔdppIV_3	TCGCTTCCTTAAGCTGGTC
ST25ΔdppIV_4	TCCGTCTACTTGCAAATTTCTCAATGGCAAATC CACCTTG
ST25ΔdppIV_5	TTGCCATTGAGAATTTTGCAAGTAGACGGAGGTC
ST25ΔdppIV_6	GCCACTTGGTCAGACAAAG
ST1 & ST7Δatl_1	CCAGTTGTAGCAGCAGAG
ST1 & ST7Δatl_2	ACCAGCATGAAAAGAACAGATG
ST1 & ST7Δatl_3	CATTAACTGATGATGAAAAAG
ST1 & ST7Δatl_4	ATACCAATTCATTACACCTTGCTCCTTTATGTATTTACATGTAA
ST1 & ST7Δatl_5	TTACATGTGAAATACATAAAGGAGCAAGGTGTAATGAATTGGTAT
ST1 & ST7Δatl_6	GTACTIONTACAAAGAGCCAACAG
ST25Δatl_1	GGAAGTGCTACACTACCGTC
ST25Δatl_2	GACCAGCATGAAAAGAAC
ST25Δatl_3	CGGAGCTGTTCCAGTT
ST25Δatl_4	CAAGGCGAGTGTGGTACTCCTTTATGTATTTACATGTAA
ST25Δatl_5	TTACATGTGAAATACATAAAGGAGTACCACACTCGCCTTG
ST25Δatl_6	GCAGATTTAATTACTTTCTTTAGC

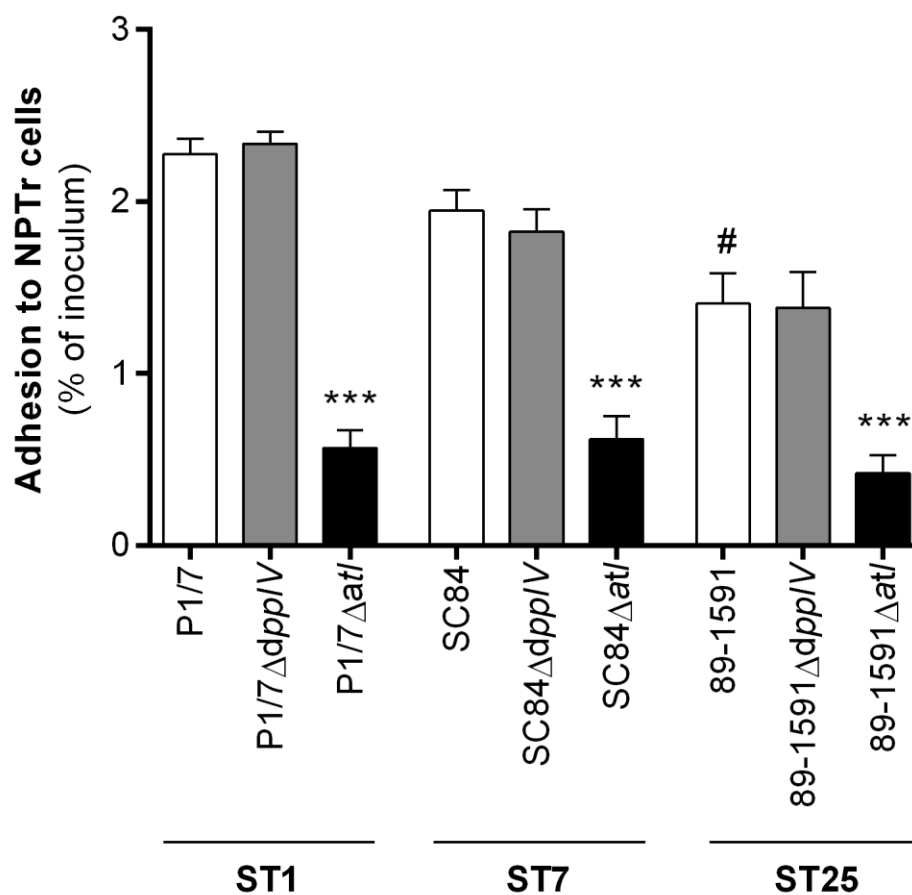
**Table 3.** Comparison of the experimental design used in the previous and present studies to evaluate the role of the dipeptidyl peptidase IV and autolysin as virulence factors for *S. suis* serotype 2

Experimental design	Previous study – Dipeptidyl peptidase IV [11]	Previous study – Autolysin [13]	This study
Sequence type (strain)	ST7 (05ZYH33)	ST378 (HA9801)	ST1 (P1/7) ST7 (SC84) ST25 (89-1591)
Adhesion to human fibronectin	Recombinant protein	Recombinant protein	Whole bacteria
	ELISA assay	Western blot	ELISA assay
Adhesion to epithelial cells	HEp-2 (Human laryngeal cells)	HEp-2 (Human laryngeal cells)	NPTr (Porcine tracheal cells)
	MOI=10	MOI=100	MOI=10
	1 h or 2 h of incubation?	3 h of incubation	2 h of incubation
	% adhered inoculum	% adhered inoculum? Adhesion of wild-type strain=100%?	% adhered inoculum
Biofilm formation	Not evaluated	Microtiter plate assay after 24 h of incubation	Microtiter plate assay after 24 h of incubation
Virulence	Mouse Unknown (SPF), possibly BALB/c?	Zebrafish	Mouse C57BL/6
	Subcutaneous or intravenous? 1x10 <sup>8</sup> CFU/mouse?	Intraperitoneal 2x10 <sup>3</sup> to 2x10 <sup>7</sup> CFU/fish	Intraperitoneal 5x10 <sup>7</sup> CFU/mouse

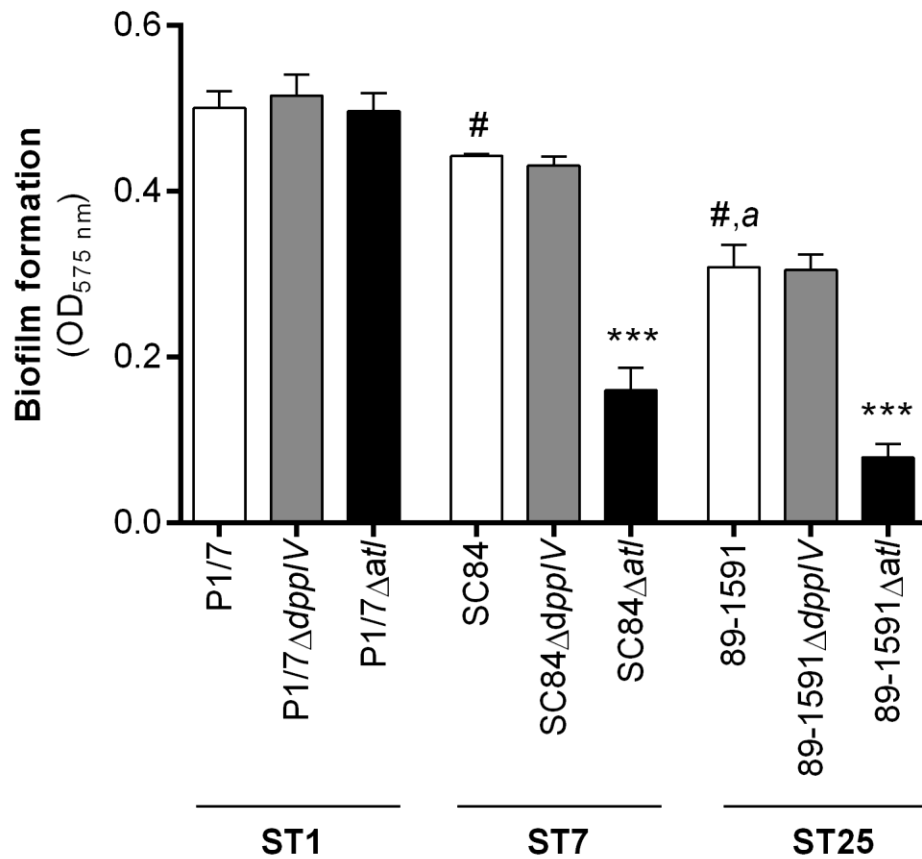
## FIGURES



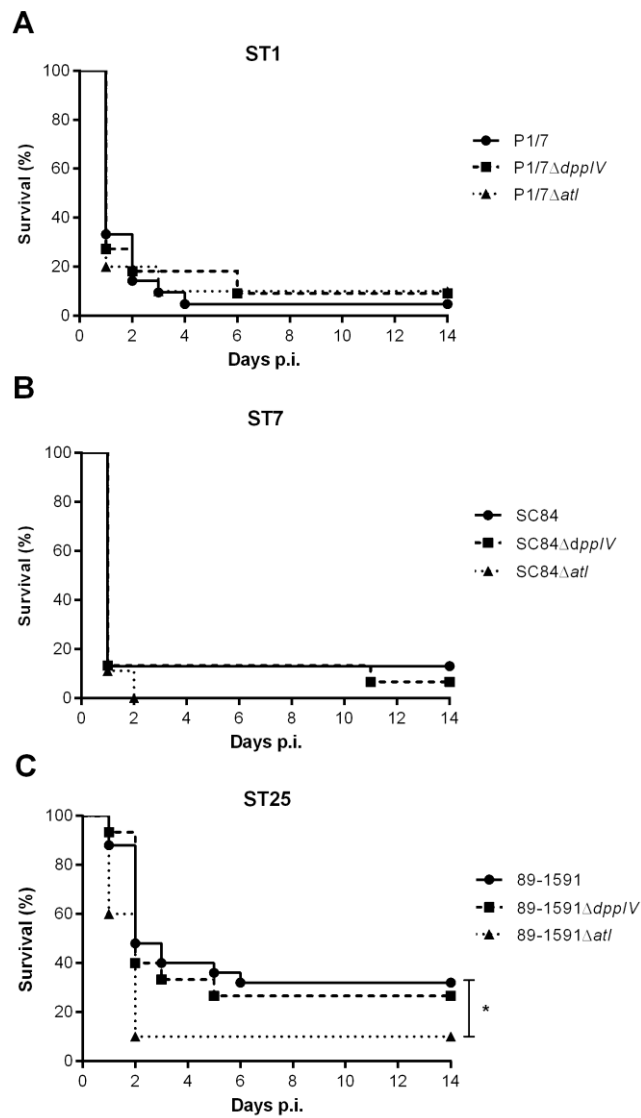
**Figure 1.** The *S. suis* serotype 2 dipeptidyl peptidase IV and autolysin are not involved in adhesion to fibronectin, regardless of the sequence type (ST) of the strain used. Adhesion of different wild-type strains and dipeptidyl peptidase IV (DPPiV)- or autolysin (Atl)-deficient mutants to human plasma fibronectin (10  $\mu$ g/mL), as determined by ELISA after 2 h of incubation. The optical density (OD) was measured at 450 nm and values corrected using the appropriate controls. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM obtained from three independent experiments.



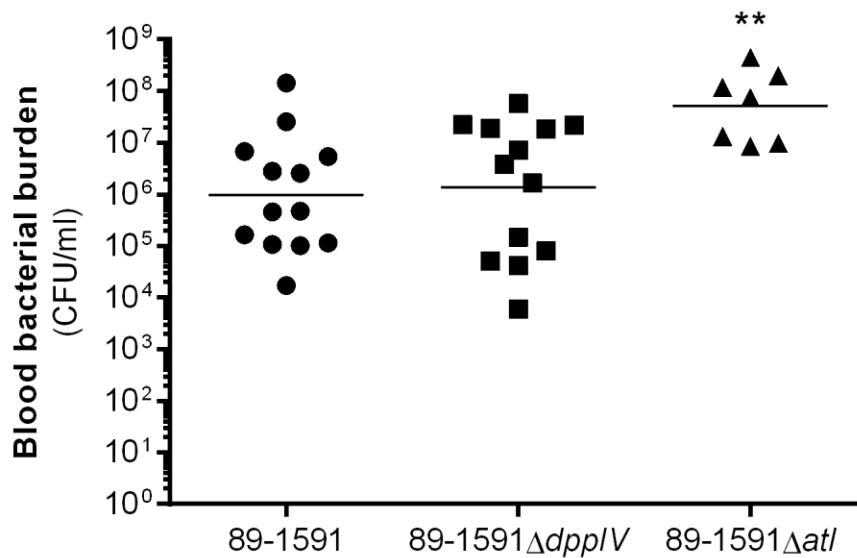
**Figure 2.** The *S. suis* serotype 2 dipeptidyl peptidase IV is not involved in adhesion to porcine tracheal epithelial cells, regardless of the sequence type (ST) of the strain used, unlike the autolysin. Adhesion of different wild-type strains and dipeptidyl peptidase IV (DPPIV)- or autolysin (Atl)-deficient mutants to porcine epithelial cells was evaluated after 2 h of incubation with bacteria (MOI=10). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM obtained from three independent experiments and represent the percentage of adhered inoculum. # indicates a significant difference ( $p < 0.01$ ) between the wild-type ST1 strain P1/7 and ST25 strain 89-1591; \*\*\* ( $p < 0.001$ ) between the wild-type strain and its Atl-deficient mutant.



**Figure 3.** The dipeptidyl peptidase IV is not involved in *S. suis* serotype 2 biofilm formation, while implication of the autolysin is dependent on the sequence type (ST) of the strain used. Biofilm formation of different wild-type strains and dipeptidyl peptidase IV (DPPIV)- or autolysin (Atl)-deficient mutants in the presence of 2 mg/mL of porcine fibrinogen was evaluated after 24 h of incubation. The optical density (OD) was measured at 575 nm and values corrected using the appropriate controls. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM obtained from three independent experiments. # indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the wild-type ST1 strain P1/7 and ST7 strain SC84 or ST25 strain 89-1591; a ( $p < 0.01$ ) between the wild-type ST7 strain SC84 and ST25 strain 89-1591; \*\*\* ( $p < 0.001$ ) between the wild-type strain and its Atl-deficient mutant.



**Figure 4.** The *S. suis* serotype 2 dipeptidyl peptidase IV and autolysin are not implicated in host virulence in a C57BL/6 mouse model of infection, regardless of the sequence type (ST) of the strain, with the exception of a minor role for the autolysin of the ST25 strain. Survival of C57BL/6 mice infected with  $5 \times 10^7$  CFU of different wild-type and dipeptidyl peptidase IV (DPPIV)- or autolysin (Atl)-deficient mutants by intraperitoneal inoculation. (A) P1/7 (ST1) and its mutants, (B) SC84 (ST7) and its mutants, and (C) 89-1591 (ST25) and its mutants. \* indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the wild-type ST25 strain 89-1591 and its Atl-deficient mutant.



**Figure 5.** The autolysin of the ST25 strain, but not the dipeptidyl peptidase IV, hinders bacterial survival in the blood. Blood bacterial burden of surviving C57BL/6 mice 24 h following intraperitoneal inoculation of  $5 \times 10^7$  CFU of the ST25 strain 89-1591 and its dipeptidyl peptidase IV (DPPIV)- or autolysin (Atl)-deficient mutants. Results are expressed as geometric mean. \*\* indicates a significant difference ( $p < 0.01$ ) between the wild-type ST25 strain 89-1591 and its Atl-deficient mutant.



## REFERENCES

1. Gottschalk M. Streptococcosis. In: Zimmerman JJ, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. Diseases of swine. 10th ed. Ames, USA: Wiley-Blackwell Publishing; 2012. p. 841-855.
2. Goyette-Desjardins G, Auger JP, 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(6): e45.
3. Lachance C, Gottschalk M, Gerber PP, Lemire P, Xu J, Segura M. Exacerbated type II interferon response drives hypervirulence and toxic shock by an emergent epidemic strain of *Streptococcus suis*. *Infect Immun.* 2013;81(6): 1928-1939.
4. Auger JP, Fittipaldi N, Benoit-Biancamano MO, 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(3): 48.
5. Ye C, Bai X, Zhang J, Jing H, Zheng H, Du H, et al. Spread of *Streptococcus suis* sequence type 7, China. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(5): 787-791.
6. Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol.* 2012;7(2): 259-279.
7. Baums CG, Valentin-Weigand P. Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Anim Health Res Rev.* 2009;10(1): 65-83.
8. Segura M, Calzas C, Grenier D, Gottschalk M. Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: fighting against nonspecific defenses. *FEBS Lett.* 2016;590(21): 3772-3799.

9. Segura M, Fittipaldi N, Calzas C, Gottschalk M. Critical *Streptococcus suis* virulence factors: are they all really critical? Trends Microbiol. 2017: in press.
10. Fittipaldi N, Xu J, Lacouture S, Tharavichitkul P, Osaki M, Sekizaki T, et al. Lineage and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from North America. Emerg Infect Dis. 2011;17(12): 2239-2244.
11. Ge J, Feng Y, Ji H, Zhang H, Zheng F, Wang C, et al. Inactivation of dipeptidyl peptidase IV attenuates the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 that causes streptococcal toxic shock syndrome. Curr Microbiol. 2009;59(3): 248-255.
12. Kumagai Y, Konishi K, Gomi T, Yagishita H, Yajima A, Yoshikawa M. Enzymatic properties of dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* and its participation in virulence. Infect Immun. 2000;68(2): 716-724.
13. Ju CX, Gu HW, Lu CP. Characterization and functional analysis of atl, a novel gene encoding autolysin in *Streptococcus suis*. J Bacteriol. 2012;194(6): 1464-1473.
14. Wang K, Lu C. Adhesion activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a Chinese *Streptococcus suis* type 2 strain. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2007;120(5-6): 207-209.
15. Lalonde M, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. Microbiology. 2000;146(8): 1913-1921.
16. Dominguez-Punaro MC, Segura M, Plante MM, Lacouture S, Rivest S, Gottschalk M. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. J Immunol. 2007;179(3): 1842-1854.

17. Dominguez-Punaro Mde L, Segura M, Radzioch D, Rivest S, Gottschalk M. Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection. *Infect Immun*. 2008;76(9): 3901-3910.
18. 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(3): 197-206.
19. Ye C, Zhu X, Jing H, Du H, Segura M, Zheng H, et al. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(8): 1203-1208.
20. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Dubreuil D. Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. *Vet Microbiol*. 1992;30(1): 59-71.
21. Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Construction and characterization of *Streptococcus suis*-*Escherichia coli* shuttle cloning vectors. *Plasmid*. 2001;45(2): 101-113.
22. Warrens AN, Jones MD, Lechler RI. Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene*. 1997;186(1): 29-35.
23. Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid*. 2001;46(2): 140-148.
24. Esgleas M, Lacouture S, Gottschalk M. *Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;244(1): 33-40.
25. Wang Y, Gagnon CA, Savard C, Music N, Srednik M, Segura M, et al. 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*. 2013;81(12): 4498-4508.

26. 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.
27. de Greeff A, Buys H, Verhaar R, Dijkstra J, van Alphen L, Smith HE. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun.* 2002;70(3): 1319-1325.
28. Esgleas M, Li Y, Hancock MA, Harel J, Dubreuil JD, Gottschalk M. Isolation and characterization of alpha-enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. *Microbiology.* 2008;154(Pt 9): 2668-2679.
29. Li W, Wan Y, Tao Z, Chen H, Zhou R. A novel fibronectin-binding protein of *Streptococcus suis* serotype 2 contributes to epithelial cell invasion and in vivo dissemination. *Vet Microbiol.* 2013;162(1): 186-194.
30. Pian Y, Wang P, Liu P, Zheng Y, Zhu L, Wang H, et al. Proteomics identification of novel fibrinogen-binding proteins of *Streptococcus suis* contributing to antiphagocytosis. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2015;5: 19.
31. Vanier G, Sekizaki T, Dominguez-Punaro MC, Esgleas M, Osaki M, Takamatsu D, et al. Disruption of *srtA* gene in *Streptococcus suis* results in decreased interactions with endothelial cells and extracellular matrix proteins. *Vet Microbiol.* 2008;127(3-4): 417-424.
32. Willenborg J, Fulde M, de Greeff A, Rohde M, Smith HE, Valentin-Weigand P, et al. Role of glucose and CcpA in capsule expression and virulence of *Streptococcus suis*. *Microbiology.* 2011;157(Pt 6): 1823-1833.
33. Li M, Shao ZQ, Guo Y, Wang L, Hou T, Hu D, et al. The type II histidine triad protein HtpsC is a novel adhesion with the involvement of *Streptococcus suis* virulence. *Virulence.* 2015;6(6): 631-641.

34. Li Q, Liu H, Du D, Yu Y, Ma C, Jiao F, et al. Identification of novel laminin- and fibronectin-binding proteins by far-Western blot: capturing the adhesins of *Streptococcus suis* type 2. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2015;5: 82.
35. Yu Y, Qian Y, Du D, Xu C, Dai C, Li Q, et al. SBP2 plays an important role in the virulence changes of different artificial mutants of *Streptococcus suis*. *Molecular bioSystems*. 2016;12(6): 1948-1962.
36. Zhang H, Zheng J, Yi L, Li Y, Ma Z, Fan H, et al. The identification of six novel proteins with fibronectin or collagen type I binding activity from *Streptococcus suis* serotype 2. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*. 2014;52(11): 963-969.
37. O'Connor TJ, Boyd D, Dorer MS, Isberg RR. Aggravating genetic interactions allow a solution to redundancy in a bacterial pathogen. *Science*. 2012;338(6113): 1440-1444.
38. Roy D, Grenier D, Segura M, Mathieu-Denoncourt A, Gottschalk M. Recruitment of factor H to the *Streptococcus suis* cell surface is multifactorial. *Pathogens*. 2016;5(3): E47.
39. Li Q, Ma C, Fu Y, He Y, Yu Y, Du D, et al. Factor H specifically capture novel factor H-binding proteins of *Streptococcus suis* and contribute to the virulence of the bacteria. *Microbiol Res*. 2017;196: 17-25.
40. Vaillancourt K, Bonifait L, Grignon L, Frenette M, Gottschalk M, Grenier D. Identification and characterization of a new cell surface protein possessing factor H-binding activity in the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 7): 1073-1080.
41. Pian Y, Gan S, Wang S, Guo J, Wang P, Zheng Y, et al. Fhb, a novel factor H-binding surface protein, contributes to the antiphagocytic ability and virulence of *Streptococcus suis*. *Infect Immun*. 2012;80(7): 2402-2413.

42. Clais S, Boulet G, Kerstens M, Horemans T, Teughels W, Quirynen M, et al. Importance of biofilm formation and dipeptidyl peptidase IV for the pathogenicity of clinical *Porphyromonas gingivalis* isolates. *Pathogens and disease*. 2014;70(3): 408-413.
43. Zheng H, Lan R, Zheng X, Cui Z, Liu Z, Bai X, et al. Comparative genomic hybridization identifies virulence differences in *Streptococcus suis*. *PLoS One*. 2014;9(2): e87866.
44. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*. 2004;22(5): 460-466.
45. Goyette-Desjardins G, Calzas C, Shiao TC, Neubauer A, Kempker J, Roy R, et al. Protection against *Streptococcus suis* serotype 2 infection using a capsular polysaccharide glycoconjugate vaccine. *Infect Immun*. 2016;84(7): 2059-2075.
46. Sellers RS, Clifford CB, Treuting PM, Brayton C. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *Vet Pathol*. 2012;49(1): 32-43.
47. Marco AJ, Domingo M, Ruberte J, Carretero A, Briones V, Dominguez L. Lymphatic drainage of *Listeria monocytogenes* and Indian ink inoculated in the peritoneal cavity of the mouse. *Lab Anim*. 1992;26(3): 200-205.
48. Biondo C, Mancuso G, Midiri A, Signorino G, Domina M, Lanza Cariccio V, et al. Essential role of interleukin-1 signaling in host defenses against group B *Streptococcus*. *mBio*. 2014;5(5): e01428-01414.
49. Biondo C, Mancuso G, Midiri A, Signorino G, Domina M, Lanza Cariccio V, et al. The interleukin-1beta/CXCL1/2/neutrophil axis mediates host protection against group B streptococcal infection. *Infect Immun*. 2014;82(11): 4508-4517.
50. Zhang Y, Ding D, Liu M, Yang X, Zong B, Wang X, et al. Effect of the glycosyltransferases on the capsular polysaccharide synthesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbiol Res*. 2016;185: 45-54.

51. Wang J, Kong D, Zhang S, Jiang H, Zheng Y, Zang Y, et al. Interaction of fibrinogen and muramidase-released protein promotes the development of *Streptococcus suis* meningitis. *Frontiers in microbiology*. 2015;6: 1001.
52. Willenborg J, Koczula A, Fulde M, de Greeff A, Beineke A, Eisenreich W, et al. FlpS, the FNR-like protein of *Streptococcus suis* is an essential, oxygen-sensing activator of the arginine deiminase system. *Pathogens*. 2016;5(3).
53. Trede NS, Zapata A, Zon LI. Fishing for lymphoid genes. *Trends Immunol*. 2001;22(6): 302-307.
54. Goldsmith JR, Jobin C. Think small: zebrafish as a model system of human pathology. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012;2012: 817341.
55. Berry AM, Paton JC. Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun*. 2000;68(1): 133-140.
56. Rupp ME, Fey PD. In vivo models to evaluate adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Methods Enzymol*. 2001;336: 206-215.
57. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature reviews Microbiology*. 2008;6(4): 288-301.
58. Hovelius B, Mardh PA. Haemagglutination by *Staphylococcus saprophyticus* and other staphylococcal species. *Acta Pathol Microbiol Scand B*. 1979;87B(1): 45-50.
59. Maeda H. Role of microbial proteases in pathogenesis. *Microbiol Immunol*. 1996;40(10): 685-699.

## SUPPORTING INFORMATION

### S1 Evaluation of clinical signs and scoring following intraperitoneal injection of *Streptococcus suis* serotype 2 in mice

- 1) Without opening the cage, evaluate the behavior of each mouse.
- 2) Open the cage and examine the behavior of each mouse in more detail without manipulating.
- 3) Evaluate the clinical sign(s) of each mouse according to the table below and inscribe the clinical score associated with each clinical sign.

#### Clinical signs in mice following intraperitoneal injection of *S. suis* serotype 2

Code	Clinical Sign	Score
A	Normal behavior	0
B	Rough hair coat	1
C	Swollen/closed eye(s)	1
D	Ocular edema	1
E	Prostration	1
F	Depression	1
G	Transitory difficulty breathing	1
H	Lethargy	7
I	Meningitis	7
J	Frenetic jumping	7
K	Pedaling	7
L	Sudden excitement followed by death	7
M	Weight loss greater than 20% of the initial weight	5
N	Death	10

#### Clinical signs associated with meningitis

i	Spatial disorientation
ii	Hyperexcitation/opisthotonos
iii	Circular walking with head tilt
iv	Sudden excitement followed by recumbency
v	Clonic movement

- 4) Weigh each mouse daily.

Score	Health Status	Action Required
0	Clinically normal	None
1-3	Post-infection reaction (transitory)	None
4-5	Moderately sick	Re-evaluate every 4 h
6	Visibly sick	Re-evaluate every 3 h; if no improvement after 24 h, euthanasia is required
7 or more	Extremely sick	Immediate euthanasia required

- 5) Tabulate the clinical score associated with each mouse and determine the action required according to the following table:
- 6) Euthanasia is carried out using CO<sub>2</sub> followed by cervical dislocation.