

Université de Montréal

**Caractérisation de la zinc métalloprotéase de  
*Streptococcus suis* sérotype 2**

par Audrey Dumesnil

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

Décembre 2017

© Audrey Dumesnil, 2017

## Résumé

*S. suis* est un important pathogène du porc et un agent zoonotique causant méningites, morts soudaines et chocs septiques. Bien que plusieurs facteurs ont été décrits comme étant impliqués dans la virulence de *S. suis*, les premières étapes de sa pathogénèse restent peu connues. Parmi ces facteurs, il y a la zinc métalloprotéase de *S. suis* sérotype 2, qui a été décrite comme une IgA<sub>1</sub> protéase ayant un rôle critique dans la virulence de *S. suis* sérotype 2. De plus, cette protéine a été démontrée comme étant un antigène protecteur dans un modèle murin. Cependant des résultats contradictoires ont été obtenus et l'activité IgA protéase de *S. suis* sérotype 2 est remise en question. De plus, des études phylogénétiques ont permis de démontrer que la zinc métalloprotéase de *S. suis* est plutôt homologue à la protéine ZmpC de *S. pneumoniae*, protéine n'ayant pas d'activité IgA protéase. L'objectif général de ce projet a donc été de caractériser la zinc métalloprotéase de *S. suis* sérotype 2, afin de déterminer son rôle dans la pathogénèse.

Pour ce faire, différentes expériences de clivage et d'activation ont été réalisées avec les cibles de l'IgA protéase et de la protéine ZmpC de *S. pneumoniae*, soit les IgA<sub>1</sub> humaines, la matrice métalloprotéase-9 (MMP-9), la glycoprotéine de liaison à la P-sélectine (PSGL-1) et la mucine 16 (MUC16). Les résultats ont démontré que *S. suis* sérotype 2 n'a pas la capacité de cliver les IgA<sub>1</sub> humaines, confirmant l'absence d'activité IgA protéase de ce pathogène. De plus, *S. suis* n'est pas capable d'activer MMP-9 et de cliver les ectodomaines de PSGL-1. Cependant, la protéine Zmp de *S. suis* clive partiellement les ectodomaines de MUC16. Malgré cette fonction, Zmp n'est pas un facteur critique pour la colonisation des voies respiratoires ou pour la virulence de *S. suis* sérotype 2 dans des modèles murins et porcins d'infection. Comme il a été décrit auparavant, la protéine Zmp est un antigène protecteur et la protection obtenue est fortement influencée par l'adjuvant utilisé.

En somme, cette étude a permis de démontrer que *S. suis* sérotype 2 ne possède pas d'activité IgA protéase et que sa zinc métalloprotéase n'est pas un facteur de virulence critique. Ceci permet donc à nouveau de souligner l'importance de confirmer les rôles associés à des facteurs de virulence critique de *S. suis* par différentes équipes de recherche mondialement.

**Mots-clés** : *Streptococcus suis*, zinc métalloprotéase, IgA protéase, controverse, mucine 16, antigène protecteur

## Abstract

*Streptococcus suis* is an important swine pathogen and zoonotic agent responsible for sudden death, septic shock, and meningitis. Although several putative factors have been described to be involved in the *S. suis* virulence, the first steps of the *S. suis* pathogenesis remain misunderstood. Among these factors is the *S. suis* serotype 2 zinc metalloprotease, which has been described as an IgA<sub>1</sub> protease and it was demonstrated to be a critical virulence factor for *S. suis* serotype 2. Moreover, this protein was a protective antigen in a mouse model of infection. However, contradictory results have been obtained regarding the role of the *S. suis* serotype 2 zinc metalloprotease and its IgA protease function has been questioned. More recently, phylogenetic analyses suggested that this protein would be homologous to the ZmpC of *Streptococcus pneumoniae*, which does not possess an IgA protease activity. Consequently, the main objective of this project was to characterize the *S. suis* serotype 2 zinc metalloprotease and to determine its role in the pathogenesis.

To do this effect, different cleavage and activation experiments have been carried out with the different targets of the IgA protease and the ZmpC protein of *S. pneumoniae*, whether the human IgA<sub>1</sub>, matrix metalloprotease-9 (MMP-9), P-selectin glycoprotein ligand (PSGL-1), and mucin 16 (MUC16). Results showed that *S. suis* was unable to cleave human IgA<sub>1</sub>, thus confirming the lack of IgA protease activity by this pathogen. In addition, *S. suis* was unable to activate MMP-9 and to cleave PSGL-1 ectodomains. By contrast, Zmp partially cleaves MUC16 ectodomains. However, Zmp was not a required for colonization of the respiratory tract by *S. suis* nor for its virulence in both pig and mouse models of infection. Yet, and as previously described, the Zmp protein is a protective antigen with protection strongly influenced by the adjuvant used.

Overall, this study showed that *S. suis* serotype 2 does not possess an IgA protease activity and that its zinc metalloprotease is not a critical virulence factor. Taken together, these results emphasize, once again, the importance of confirming the functions associated with critical *S. suis* virulence factors by different research teams worldwide.

**Keywords :** *Streptococcus suis*, zinc metalloprotease, IgA protease, controversy, mucin 16, protective antigen

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xiv
I- Introduction.....	1
II- Revue de la littérature.....	5
1 Streptococcus suis : pathogène important chez le porc et l’Homme.....	6
1.1 Caractéristiques de S. suis.....	6
1.2 S. suis est un pathogène important chez le porc.....	6
1.2.1 Transmission de S. suis et les facteurs de risques favorisant l’éclosion de la maladie.....	6
1.2.2 Signes cliniques et pathologies associées aux infections à S. suis chez le porc.....	7
1.2.3 Traitements et prévention des infections à S. suis chez le porc.....	8
1.2.4 S. suis est également un agent zoonotique important.....	9
1.3 Parmi les 35 sérotypes chez S. suis, le sérotype 2 est le plus couramment isolé et est le plus virulent.....	10
1.4 Classification selon le type allélique : les défis derrière la caractérisation de S. suis.....	10
2 Facteurs de virulence.....	13
2.1 Pathogenèse de S. suis.....	13
2.1.1 Colonisation et invasion des cellules épithéliales.....	13
2.1.2 Persistance.....	14
2.1.3 Invasion du SNC.....	15
2.2 Facteurs de virulence : sujet de controverse?.....	16
3 Les zincs métalloprotéases et les Streptocoques.....	21
3.1 Les 4 zincs métalloprotéases de Streptococcus pneumoniae.....	21

3.1.1	Structure générale des zincs métalloprotéases et leur patron de virulence .....	21
3.1.2	IgA <sub>1</sub> protéase.....	22
3.1.2.1	Rôle des IgA chez l'hôte.....	22
3.1.2.2	Activité de l'IgA <sub>1</sub> protéase de <i>S. pneumoniae</i> .....	24
3.1.3	ZmpB .....	25
3.1.3.1	Action de ZmpB de <i>S. pneumoniae</i> .....	25
3.1.4	ZmpC .....	25
3.1.4.1	ZmpC active MMP-9.....	25
3.1.4.2	ZmpC clive les ectodomains de PSGL-1 .....	28
3.1.4.3	ZmpC clive les ectodomains de MUC16 .....	29
3.1.5	Impact dans la virulence des Zmp de <i>S. pneumoniae</i> .....	30
3.2	Les zincs métalloprotéases et <i>Streptococcus suis</i> .....	30
3.2.1	L'IgA protéase de <i>S. suis</i> .....	30
3.2.1.1	Structure générale de l'IgA protéase de <i>S. suis</i> .....	31
3.2.1.2	Rôle de l'IgA protéase de <i>S. suis</i> .....	31
3.2.2	Analyse comparative des zincs métalloprotéases de différentes espèces de streptocoques, incluant celle de <i>S. suis</i> .....	32
4	Réponse immunitaire optimale recherchée dans le développement d'un vaccin contre <i>S. suis</i> .....	34
4.1	Réponse humorale de type 1 et de type 2 .....	34
4.2	Le choix d'un bon adjuvant est crucial.....	35
4.2.1	Adjuvants de type huileux .....	36
4.2.3	Adjuvant de type copolymère .....	36
4.2.3	Adjuvant de type saponine.....	37
III-	Matériel, Méthodes et Résultats.....	38
	Characterization of the zinc metalloprotease of <i>Streptococcus suis</i> serotype 2 .....	39
IV-	Discussion .....	76
1.	Caractérisation de la zinc métalloprotéase de <i>S. suis</i> sérotype 2.....	77
1.1	La protéine <i>S. suis</i> n'a pas la capacité de cliver les IgA <sub>1</sub> humains .....	77
1.2	La protéine Zmp de <i>S. suis</i> sérotype 2 a un rôle partiel dans le clivage de la mucine .....	79

1.3 La protéine Zmp de <i>S. suis</i> sérotype 2 n'est pas un facteur de virulence critique.....	81
1.3.1 Chez le porc .....	81
1.3.2 Chez la souris.....	83
1.4 La protéine Zmp de <i>S. suis</i> est un antigène protecteur .....	84
V- Conclusions et perspectives .....	87
Conclusions générales.....	88
Perspectives.....	89
Bibliographie.....	90
Annexe I:.....	xvi
Complex Population Structure and Virulence Differences among Serotype 2 <i>Streptococcus suis</i> Strains Belonging to Sequence Type 28 .....	xvi
Annexe II : .....	xlvi
Serotype-specific role of antigen I/II in the initial steps of the pathogenesis of the infection caused by <i>Streptococcus suis</i> .....	xlvi
Annexe III: Zmp is not a critical virulence factor as evaluated by a mouse model of intranasal infection .....	lxxxvi
Annexe IV: Zmp is not a critical virulence factor as evaluated by a mouse model of systemic infection .....	lxxxvii
Annexe V: Protection study using purified Zmp in a mouse model of infection .....	lxxxviii

## Liste des tableaux

### II-Revue de la littérature

Tableau I.	Synthèse des essais de virulence des différents facteurs impliqués dans la colonisation et l'invasion des cellules épithéliales de l'hôte par <i>S. suis</i> .....	14
Tableau II	Synthèse des essais de virulence des différents facteurs impliqués dans la survie de <i>S. suis</i> .....	15
Tableau III	Facteurs de controverse – exemples de modèles expérimentaux .....	17

### III-Matériel, Méthodes et Résultats

Tableau I.	Bacterial strains and plasmids used in this study .....	66
Tableau II	Oligonucleotide primers used in this study .....	67
Tableau III	Clinical signs observed in both wild-type- and $\Delta zmp$ -infected pigs .....	68

### IV-Discussion

Tableau I.	Comparaison des méthodes expérimentales employées pour réaliser le clivage des IgA <sub>1</sub> humaines .....	78
Tableau II	Nature des adjuvants utilisés pour les études d'immunisation et résultats de protection .....	85

### Annexe I

Tableau I.	Presence of two component or standalone global regulators in the different ST28 and ST1 strains .....	xxxvi
------------	---	-------

### Annexe 2

Tableau I.	Strains and plasmids used in the study .....	lxxvii
------------	--	--------



# Liste des figures

## II-Revue de la littérature

Figure 1.	Distribution mondiale des ST de <i>S. suis</i> sérotype 2 les plus souvent répertoriées, tirée de (2) .....	11
Figure 2	Sommaire des avantages, désavantages et caractéristiques clés des modèles animaux décrits. Tirée de (6) .....	18
Figure 3	Clivage des IgA <sub>1</sub> humaines par l'IgA protéase recombinante de <i>S. suis</i> sérotype 2 ST7. Image tirée de (9) .....	31
Figure 4	Arbre phylogénétique basé sur les séquences des 4 zincs métalloprotéases de <i>S. pneumoniae</i> . Figure tirée de (13) .....	33

## III-Matériel, Méthodes et Résultats

Figure 1.	Expression of the <i>S. suis</i> Zmp protein is abrogated in the <i>zmp</i> -deficient mutant..	59
Figure 2	<i>S. suis</i> is unable to cleave human IgA <sub>1</sub> .....	60
Figure 3	<i>S. suis</i> does not activate the matrix metalloprotease-9 (MMP-9) .....	61
Figure 4	<i>S. suis</i> is unable to cleave P-Selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) ectodomains .....	62
Figure 5	Zmp is implicated in mucin16 (MUC16) ectodomain cleavage.....	63
Figure 6	Zmp does not impact the colonization potential of <i>S. suis</i> serotype 2 in a pig model of infection .....	64
Figure 7	Zmp does not play a role in the virulence of <i>S. suis</i> serotype 2 in an intranasal pig model of infection .....	65
Figure S1	mRNA expression of upstream ( <i>gnat</i> ) and downstream ( <i>uvrB</i> ) genes flanking the <i>zmp</i> gene were not affected by the in-frame deletion in the mutant strain .....	69

## Annexe 1

Figure 1	A) Genome atlas of Canadian <i>S. suis</i> ST28 strain NSUI002. B) Venn diagram depicting unique and shared CDSs in each of the <i>S. suis</i> strains as identified by ortholog analysis. C) Collinearity of the genomes of <i>S. suis</i> ST28 strains NSUI002 and 05HAS68 .....	xxxix
Figure 2	A) Results of Bayesian analysis of recombination for the 51 ST28 <i>S. suis</i> strains. B) Neighbor-joining phylogenetic tree depicting the relationships between the 51 ST28 <i>S. suis</i> strains .....	xxxix
Figure 3	Venn diagram depicting unique and shared ortholog gene clusters in each of the five clades defined among the <i>S. suis</i> strains .....	xxxix
Figure 4	Results of animal experimental infections .....	xxxix
Figure 5	Genetic organization and predicted open reading frames of NSUI002 (clade I) and NSUI036 (clade V) regions containing a fucose utilization operon and <i>zmpC</i> genes ...	xxxix

## Annexe 2

Figure 1.	Characteristics of AgI/II proteins present in different streptococci .....	lxxviii
Figure 2	The AgI/II protein is expressed in the <i>S. suis</i> serotype 2 and 9 wild-type strains but is absent in S2 $\Delta$ agl/II and S9 $\Delta$ agl/II mutant strains .....	lxxix
Figure 3	The <i>S. suis</i> serotype 9 (S9) AgI/II, but not that of the serotype 2 (S2), is implicated in bacterial self-aggregation and biofilm formation. ....	lxxx
Figure 4	Porcine salivary agglutinins (pSAGs) aggregate <i>S. suis</i> serotype 2 (S2) and serotype 9 (S9) .....	lxxxi
Figure 5	The <i>S. suis</i> serotype 2 (S2) and serotype 9 (S9) AgI/II are involved in adhesion to fluid phase porcine salivary agglutinins (pSAGs), but only for S9 with surface-immobilized pSAGs .....	lxxxii
Figure 6	The <i>S. suis</i> serotype 9 (S9) AgI/II, but not that of serotype 2 (S2), is involved in protection against acid stress .....	lxxxiii
Figure 7	The <i>S. suis</i> serotype 9 (S9) AgI/II and, to a lesser extent, that of serotype 2 (S2), are bacterial adhesins for extracellular matrix proteins .....	lxxxiv
Figure 8	The <i>S. suis</i> serotype 9 (S9) AgI/II, but not that of the serotype 2 (S2), is involved in adhesion to porcine tracheal epithelial cells .....	lxxxv

Figure 9 The *S. suis* serotype 9 (S9) AgI/II is implicated in colonization of the porcine respiratory tract .....lxxvi

### **Annexe 3**

Figure 1. Zmp is not critically implicated in the virulence of *S. suis* serotype 2 in a murine intranasal model of infection .....lxxxvi

### **Annexe 4**

Figure 1. Zmp is not critically implicated in the systemic virulence of *S. suis* serotype 2 in a murine intraperitoneal model of infection .....lxxxvii

### **Annexe 5**

Figure 1. Combination of the recombinant Zmp protein with either adjuvant A or B is protective in CD1-mice against *S. suis* serotype 2 infection .....lxxxviii

## Liste des abréviations

AgI/II : Antigène I/II

Atl : Autolysine

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

BMEC : Cellules endothéliales microvasculaires du cerveau

CSF : Liquide céphalorachidien ou « cerebrospinal fluid »

CPS : capsule polysaccharidique

DppIV : « Dipeptidyl peptidase IV »

Fhb et Fhbp : Protéines de liaison au facteur H

ICE : élément intégratif et conjugatif

IgA : Immunoglobuline A

IgG : Immunoglobuline G

IL-8 : interleukine-8

,MAMs : Mucines associées aux membranes

MEC : matrice extracellulaire

MLST : typage de séquences multilocus

MMP : matrice métalloprotéase

MMP-9 : matrice métalloprotéase 9

MOI : « multiplicity of infection »

MUC16 : mucine 16

NGAL : « neutrophiles gelatinase B associated lipocalin »

PCPEC : cellules épithéliales porcines du plexus choroïdien

PCR : réactions de polymérisation en chaînes

PSGL-1 : Glycoprotéine de liaison à la P-sélectine

SDC-1 : syndecan-1

SNC : système nerveux central

SRRP : syndrome reproducteur et respiratoire porcin

ST : Type allélique ou « sequence type »

TNF- $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale  $\alpha$

Zmp : Zinc métalloprotéase

*À mon grand-père*

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord dire un énorme Merci à mon directeur de recherche, le Dr Marcelo Gottschalk. Merci pour la chance que vous m'avez tout d'abord donnée en me prenant en stage chez vous il y a de cela déjà 5 ans et en acceptant de me superviser à la maîtrise. Merci pour votre encadrement tout au long de ce projet, mais surtout merci pour la confiance dont vous avez fait preuve. Confiance que vous m'accordez toujours aujourd'hui.

J'aimerais aussi remercier ma codirectrice, Dre Josée Harel. Merci pour toutes les discussions que nous avons eues qui ont apporté des points positifs à ce projet et qui m'ont fait me questionner à plusieurs reprises.

Merci également à mon codirecteur, le Dr Nahuel Fittipaldi pour m'avoir accueillie en début de maîtrise au sein de son laboratoire et d'avoir participé à mon apprentissage de certaines notions de bio-informatique.

Un merci tout spécial à Sonia Lacouture, assistante de recherche dans notre laboratoire. Merci pour tous tes conseils qui au combien de fois, se sont avérés justes. Merci également pour tous les fous rires et les anecdotes qui resteront gravées dans ma mémoire pour longtemps.

Merci à Prevtec Microbia Inc pour votre étroite collaboration et de votre accord de présenter les résultats de protection chez la souris.

Merci aux Drs Marie Archambault et Simon Dufour d'avoir tous 2 accepté de faire partie de mon comité-conseil. Merci également aux Drs Mariela Segura et Christopher Fernandez Prada d'avoir accepté d'être sur le comité d'évaluation de ce mémoire.

Merci aux organismes subventionnaires qui ont permis la réalisation de ce projet : CRIPA, GREMIP, CRSNG

Merci au personnel administratif du GREMIP. Un merci tout spécial à Hélène, Nancy, Isabelle et Cécile.

Merci à mes 2 superviseurs de stage David (2 fois plutôt qu'une) et Sarah, qui ont eu la patience de me transmettre leur savoir. Sans vous 2, sans vos précieux conseils et la confiance que vous m'avez octroyée durant mes 3 stages, je n'aurais pas pu acquérir l'autonomie

nécessaire pour réaliser ce projet de recherche. Merci également à tous les membres des laboratoires Gottschalk et Segura que j'ai eu l'occasion de côtoyer durant mes stages et ma maîtrise au laboratoire. Merci à Léa, Jean-Philippe, Annabelle, Agustina 1 (Agus), Agustina 2 (Tina), Guillaume, Cynthia, Paul, Corinne, Claudia, Lyne et Katerine. Vous avez mis des rires et de la bonne humeur dans mes journées au laboratoire.

Merci à des amies exceptionnelles, Alexandra et Émilie, pour toutes les soirées qui m'ont changé les idées et qui m'ont redonné un regain d'énergie toutes les fois. Un grand merci également à Carole, amie depuis plus de 15 ans, pour tous les petits moments avec tes 2 petits anges.

Finalement, j'aimerais remercier mes parents, mon copain et toute ma famille pour m'avoir épaulée et avoir cru en moi durant cette grande aventure qu'a été ma maîtrise. Plusieurs personnes m'ont demandé durant ma maîtrise « Mais pourquoi as-tu choisi de travailler avec le porc? », et j'ai toujours répondu en riant « Parce que c'est une histoire de famille! »

## **I- Introduction**



*Streptococcus suis* est un pathogène du porc responsable de méningites, d'endocardites et d'arthrites causant des pertes économiques à l'industrie porcine (1). De plus, *S. suis* est un agent zoonotique responsable de chocs septiques et de méningites chez l'homme. Bien qu'elle soit considérée comme une maladie à caractère professionnel en Occident, *S. suis*, l'une des zoonoses la plus répandue en Asie (Vietnam et Thaïlande) a été responsable de 2 éclosions mortelles en Chine (1, 2). *S. suis* a été divisé en 35 différents sérotypes, parmi lesquels le sérotype 2 est le plus souvent isolé de cas cliniques et est donc considéré comme étant un des sérotypes les plus virulents (2). Les souches appartenant à ce sérotype sont également divisées en type allélique ou « sequence type » (ST) grâce au typage de séquence multilocus. En effet, la souche clonale ST7 a été responsable des éclosions mortelles en Chine. Pour leur part, la grande majorité des souches virulentes de sérotype 2 appartiennent au ST1 et sont principalement isolées en Eurasie (2). Finalement, les souches ST25 et ST28, considérées comme moins virulentes, sont principalement retrouvées en Amérique du Nord (2, 3).

La majorité des études réalisées afin de comprendre les différents mécanismes utilisés par *S. suis* pour causer la maladie ont principalement été réalisées avec des souches de ST1 et ST7. Cependant, bien que le nombre d'études soit en expansion, plusieurs étapes de la pathogenèse de *S. suis* demeurent encore à ce jour peu connues. Il est reconnu que *S. suis* doit tout d'abord coloniser et envahir les surfaces épithéliales de l'hôte après avoir contourné les barrières du système immunitaire (4). Ce faisant, la bactérie pourra se rendre en circulation sanguine où il aura la capacité de résister à la phagocytose et au « killing ». *S. suis* pourra alors induire une forte production de médiateurs pro-inflammatoires par les cellules de son hôte, menant au développement d'un choc septique. Si l'hôte survie, la bactérie aura la capacité de se diriger vers d'autres organes et plus particulièrement vers le système nerveux central où elle sera responsable du développement de la méningite, suite à une forte réponse inflammatoire de l'hôte (5).

Plusieurs facteurs ont été suggérés comme étant des facteurs impliqués dans la pathogenèse de *S. suis*, tels que la capsule polysaccharidique, la suilysine et l'autolysine (5). Cependant, la notion de facteur de virulence critique est de plus en plus sujette à controverse. En effet, les méthodes expérimentales utilisées entre laboratoires diffèrent, rendant difficile de

comparer les résultats obtenus pour un même facteur (6). Ceci a entre autres été démontré pour l'autolysine et la protéine de liaison au facteur H (7, 8).

Un autre des facteurs de virulence controversés décrit pour *S. suis* est l'IgA protéase. Les immunoglobulines A de type 1 (IgA<sub>1</sub>) font partie de la première ligne de défense rencontrée par un pathogène respiratoire, puisqu'elles se retrouvent au niveau des muqueuses. Ces IgA vont pouvoir prévenir l'adhésion et l'invasion des microorganismes à l'épithélium sous-jacents, facilitant ainsi leur élimination (4). Cependant, plusieurs agents bactériens possèdent une IgA protéase capable de cliver ces immunoglobulines, les rendant inactives (4). Ceci a aussi été décrit pour *S. suis* (9). En effet, la zinc métalloprotéase de *S. suis* a été originalement caractérisée comme ayant la capacité de cliver les IgA<sub>1</sub> humaines (9). De plus, des études de virulence avec un mutant  $\Delta$ *iga* ont permis de démontrer que l'IgA protéase de *S. suis* serait un facteur de virulence critique (10). Ceci suggère donc que *S. suis*, grâce à son activité IgA protéase, pourrait coloniser plus facilement les tissus sous-jacents (9-11). D'autre part, l'IgA protéase de *S. suis* a également été décrite comme un antigène protecteur dans une étude d'immunisation réalisée chez la souris (12). Malgré un rôle qui serait très important dans la pathogénie de l'infection, la production d'une IgA protéase par *S. suis*, n'a pas pu être confirmée par une autre étude plus récente (13). En effet, cette dernière étude indiquait que *S. suis* produit une zinc métalloprotéase, mais celle-ci n'aurait pas une fonction IgA protéase (13).

Les zincs métalloprotéases ont été décrites chez *Streptococcus pneumoniae* comme étant divisés en 4 grandes catégories, soit ZmpA (IgA protéase), ZmpB, ZmpC et ZmpD (13). La structure de la protéine Zmp de *S. suis* est très similaires à celles des zincs métalloprotéases de *S. pneumoniae*, avec un motif HEMVH dans son site actif, motif caractéristique à la protéine ZmpC (9, 13). En effet, une étude phylogénétique réalisée avec les zincs métalloprotéases de plusieurs espèces de streptocoques a permis de classer la protéine Zmp de *S. suis* comme étant un homologue de la protéine ZmpC de *S. pneumoniae* (13). En outre, le gène codant pour la zinc métalloprotéase de *S. suis* peut être retrouvé dans des souches virulentes de *S. suis* sérotype 2 ST28 (14). Ce gène a également été trouvé dans plusieurs des 300 souches de *S. suis* qui ont été séquencées récemment (15).

Pour sa part, la protéine ZmpC de *S. pneumoniae* a pu être associée à 3 fonctions distinctes, soit à l'activation de la matrice métalloprotéase-9 et à la libération des ectodomains

de la mucine 16 et de la glycoprotéine de liaison à la P-sélectine (13). Ces fonctions pourraient jouer des rôles importants dans les étapes de la pathogenèse de *S. suis*, que ce soit dans la colonisation des surfaces épithéliales ou dans l'invasion du système nerveux central. Ainsi, bien qu'un rôle en tant qu'IgA protéase ait été associé avec la protéine Zmp de *S. suis*, il n'est pas impossible que la protéine possède également des fonctions similaires à la protéine ZmpC de *S. pneumoniae*. À ce jour, aucune étude n'a évalué ces fonctions chez *S. suis*.

Ceci nous a donc permis d'émettre les **hypothèses** suivantes :

- La zinc métalloprotéase de *S. suis* sérotype 2 ne possède pas d'activité IgA protéase, mais possède plutôt des fonctions semblables à la protéine ZmpC de *S. pneumoniae*.
- Ce faisant, la protéine Zmp de *S. suis* sérotype 2 a un rôle important à jouer dans sa pathogenèse et dans sa virulence.
- La protéine Zmp de *S. suis* est un antigène protecteur

L'**objectif général** du projet est donc d'étudier la protéine Zmp de *S. suis* sérotype 2, afin d'évaluer son rôle dans la pathogenèse, ainsi que son potentiel en tant que candidat vaccinal. Pour ce faire, cette maîtrise a été divisée en 4 **objectifs spécifiques** :

- Étudier *in vitro* la capacité de *S. suis* sérotype 2 à cliver les IgA<sub>1</sub> humains, les ectodomains de la mucine 16 et de PSGL-1, ainsi qu'à activer la MMP-9.
- Étudier le rôle de la protéine Zmp de *S. suis* dans les fonctions, le cas échéant, énumérées ci-haut.
- Déterminer le rôle de la protéine Zmp dans la pathogenèse de *S. suis* sérotype 2 (colonisation et virulence) avec des infections expérimentales.
- Déterminer le potentiel protecteur de la protéine Zmp.

## **II- Revue de la littérature**

# **1 *Streptococcus suis* : pathogène important chez le porc et l'Homme**

## **1.1 Caractéristiques de *S. suis***

*S. suis* est une bactérie en forme de coque encapsulée à coloration Gram positive présentant un arrangement simple, fréquemment en diplocoques et occasionnellement en courtes chaînettes. Bien que *S. suis* ait la capacité de croître en présence d'oxygène, elle est considérée comme étant anaérobie facultative. De plus, *S. suis* a une activité  $\alpha$ -hémolytique lorsqu'elle est inoculée dans des milieux sélectifs, tels que des géloses additionnées de sang de mouton ou de bœuf (2, 16).

## **1.2 *S. suis* est un pathogène important chez le porc**

*S. suis* est une bactérie qui est retrouvée de manière commensale dans les voies respiratoires supérieures des porcs, ainsi que dans leur tractus reproducteur et digestif. En effet, *S. suis* est fréquemment isolé dans les amygdales et les cavités nasales du porc (17, 18). De plus, la majorité des porteurs sains de *S. suis* peuvent transporter des souches appartenant à plus d'un sérotype (19). Bien que le porc soit un porteur asymptomatique, *S. suis* est également responsables d'infections graves chez cet animal, causant des pertes économiques importantes à l'industrie porcine.

### **1.2.1 Transmission de *S. suis* et les facteurs de risques favorisant l'écllosion de la maladie**

*S. suis* peut se transmettre verticalement et horizontalement. En effet, lors de la mise bas, *S. suis*, présent au niveau du tractus génital de la truie, se transmet de manière verticale directement au porcelet par contact direct avec les sécrétions vaginales de la mère (1, 20). De plus, la bactérie est capable de se transmettre de manière horizontale par des contacts entre différents porcelets, qu'ils soient de la même portée, de portées différentes, d'âge différent ou encore par des porcs provenant de fermes différentes (1). Le développement de signes cliniques d'une infection à *S. suis* ce fait habituellement entre 5 à 10 semaines, âge auquel le statut

immunitaire du porcelet change, le rendant plus vulnérable à une infection (déclin de l'immunité maternelle) (1).

De plus, différents facteurs de risque ont été démontrés au cours des années comme jouant un rôle dans le développement d'une infection à la ferme. En effet, le statut immunitaire du troupeau (immunité maternelle passive) et la présence d'autres infections, tel que le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) peuvent faciliter une infection à *S. suis* dans cette même ferme (1, 21, 22). De plus, l'environnement dans lequel les porcelets se retrouvent va également comporter des risques importants pour le développement de la maladie. En effet, le nombre d'animaux (surpopulation, entassement), d'importantes fluctuations dans la température ou encore une ventilation inadéquate sont tous des exemples de variations retrouvées dans les pratiques d'élevage qui peuvent apporter un stress supplémentaire aux animaux (1).

### **1.2.2 Signes cliniques et pathologies associées aux infections à *S. suis* chez le porc**

*S. suis* peut causer un grand nombre d'infections chez le porc, tel que des arthrites, des méningites, des pneumonies, des endocardites, des avortements et dans certains cas provoquer la mort subite de l'animal (23, 24). Un des premiers signes observés chez les animaux malades est une hyperthermie qui sera dans la plupart des cas accompagnée d'une importante perte de poids et de signes de dépression (1). *S. suis* peut également être retrouvé dans la circulation sanguine où il pourra causer une importante septicémie, pouvant perturber quelques semaines si les animaux infectés ne sont pas traités (1). Différents signes cliniques neurologiques peuvent être observés chez les animaux atteints de méningites, parmi lesquels il est possible de retrouver de l'ataxie, de l'opisthotonos, des convulsions et du nystagmus. Pour leur part, les animaux atteints d'autres affections, tels que des endocardites ou des pneumonies, présenteront plutôt des signes de dyspnée respiratoire, de cyanose et de dépression (1). Les lésions observées dans des animaux atteints d'une infection par *S. suis* se caractérisent majoritairement par des infiltrations neutrophiliques qui peuvent être accompagnées ou non de dépôts de fibrines, d'œdème et de congestion (1).

### 1.2.3 Traitements et prévention des infections à *S. suis* chez le porc

Les antibiotiques seront utilisés pour traiter des infections à *S. suis*. Néanmoins, le choix de l'antibiotique à administrer doit se faire selon les résultats d'une culture et d'un test de sensibilité bactérienne (1, 25). En effet, étant donné l'importante utilisation d'antibiotiques dans la filière porcine, des profils de résistances aux antibiotiques ont pu être observés pour *S. suis* et cela pour la grande majorité des souches testées (25, 26). Néanmoins, l'utilisation d'antibiotiques, tels que l'ampicilline, le ceftiofur, la tiamuline, le triméthoprime et les sulfonamides ont démontré de bons résultats dans le traitement de la maladie (1). Il est par contre important de garder en tête que *S. suis* ne sera pas nécessairement totalement éliminé de l'animal (le statut de porteur peut demeurer) (25). D'autres parts, lorsque les animaux présentent des signes de méningites, l'administration d'un anti-inflammatoire en combinaison avec l'antibiotique choisi pourrait améliorer la réponse de l'animal à son traitement (1). D'autre part, certaines fermes vont également traiter tous les animaux d'un enclos via l'addition d'antibiotiques directement dans la nourriture ou l'eau de boisson consommées par ces mêmes animaux (1).

Afin de prévenir le développement de maladies causées par *S. suis*, la vaccination devrait être la mesure la plus recommandée sur le terrain. Par contre, son efficacité est loin d'être confirmée et peu de fermes au Canada utilisent un vaccin. Différents types de vaccins expérimentaux ont été testés dans les dernières années et chacun d'entre eux comporte leurs avantages et leurs inconvénients (27). Tout d'abord, les premiers candidats vaccinaux envisagés ont été les bactérines commerciales ou autogènes. Ces bactérines sont constituées de la bactérie entière qui a été inactivée que ce soit par des traitements à la chaleur ou encore au formol. Ces bactérines (seuls vaccins utilisés dans le terrain) sont administrées aux truies et/ou aux porcelets, afin de protéger ces derniers contre une infection à *S. suis* (27). Néanmoins, l'efficacité de ces bactérines est toujours controversée dans la littérature (1, 27). De plus, les bactérines autogènes sont habituellement conçues directement à partir d'une souche de *S. suis* causant la maladie dans l'élevage, limitant ainsi la possibilité de les utiliser dans d'autres fermes. Si plusieurs souches (par exemple, différents sérotypes) sont présentes dans la ferme, elles doivent être incorporées dans le vaccin, car la protection est homologue de souche/sérotipe (27). Ensuite, la deuxième avenue de vaccination étudiée est l'utilisation de composantes de la bactérie que ce soit la

capsule polysaccharidique (CPS) ou encore des protéines (protéines de surface, toxines). Des résultats récents ont permis de démontrer que la CPS de *S. suis* sérotype 2 pourraient être un excellent candidat afin de prévenir les infections à *S. suis* (28, 29). En effet, une étude a plus récemment démontré que l'utilisation d'un vaccin glycoconjugué CPS-toxine tétanique permet de protéger des porcs contre *S. suis* lors d'une infection expérimentale (29). Un avantage majeur de l'obtention d'un vaccin ciblant la CPS de *S. suis* sérotype 2 est que les animaux pourront être protégés contre toutes les souches faisant partie de ce sérotype (27, 29). Par contre, comme la CPS est faiblement immunogénique, la conjugaison avec des protéines porteuses est nécessaire, ce qui rend ce type de vaccin trop cher pour une utilisation sur le terrain. Aussi, la protection est toujours spécifique de sérotype et il faudrait combiner la CPS purifiée de plusieurs sérotypes dans un même vaccin. D'autre part, tout comme pour le vaccin à base de CPS, les vaccins sous-unitaires à base de protéines sont toujours au stade expérimental. Dans ce type de vaccins, il est primordial que l'antigène choisi soit présent chez plusieurs souches et sérotypes de *S. suis*, afin de conférer une protection universelle contre le pathogène. Dans les dernières années, un grand nombre de protéines ont été étudiées, afin d'évaluer leur pouvoir protecteur (27). Néanmoins, le design expérimental utilisé pour démontrer une protection varie grandement entre les différentes équipes de recherche, rendant difficile de tirer des conclusions claires sur le pouvoir protecteur des antigènes protéiques – voir section 2.2 (6, 27).

#### **1.2.4 *S. suis* est également un agent zoonotique important**

Étant donné l'importance de *S. suis* en tant qu'agent zoonotique, des méningites et des chocs septiques sont également retrouvés chez l'Homme. Dans les dernières années, deux éclosions mortelles ont eu lieu en Chine (1998 et 2005). En Amérique du Nord et en Europe, *S. suis* cause essentiellement des maladies professionnelles. En effet, ce sont les travailleurs de l'industrie porcine qui ont été en contact direct avec un porc ou une carcasse infectés qui présentent les risques les plus élevés de développer la maladie. Cependant, en Asie, et plus particulièrement au Vietnam et en Thaïlande, la consommation d'aliments dérivés du porc, ayant une charge bactérienne importante, qui sont peu cuits est une cause importante de la propagation de *S. suis*. (2)



### **1.3 Parmi les 35 sérotypes chez *S. suis*, le sérotype 2 est le plus couramment isolé et est le plus virulent**

Différentes techniques ont été développées et peuvent être employées afin de classifier *S. suis* en sérotypes. En effet, *S. suis* a été divisé en 35 sérotypes différents (1 à 34 et 1/2), sur la base des caractéristiques antigéniques de sa CPS (30). Cependant, 6 sérotypes parmi ceux-ci ont été plus récemment proposés comme faisant partie d'une autre espèce bactérienne (31).

Afin de définir un sérotype, il est possible d'utiliser des méthodes sérologiques, telles que des tests de coagglutination, de précipitation ou par la réaction de Neufeld's (32). La biologie moléculaire peut également être utilisée afin de déterminer les différents sérotypes. En effet, la technique de réactions de polymérisation en chaînes (PCR) multiplex, ciblant directement certains gènes spécifiques de la capsule, peut être employée (33). Néanmoins, certaines souches demeurent non typables peu importe la méthode employée (34). Les locus capsulaires de ces souches ont plus récemment été étudiés, afin de permettre de définir une nouvelle catégorisation pour ces souches non typables (34, 35).

Parmi ces 35 sérotypes, le sérotype 2 est parmi ceux qui sont les plus retrouvés mondialement dans les cas d'infection à *S. suis*, aussi bien chez le porc que chez l'Homme. Ce sérotype est, par le fait même, considéré comme étant un des plus virulents. En effet, le sérotype 2 est le plus souvent isolé des cas d'infections chez le porc, au niveau mondial. Néanmoins, le sérotype 9 est un sérotype prédominant en Europe. Pour ce qui est des cas liés à *S. suis* chez l'Homme, le sérotype 2 est le plus isolé, avec une prévalence de 74,7 % (2).

### **1.4 Classification selon le type allélique : les défis derrière la caractérisation de *S. suis***

En plus d'être classifié en sérotypes, un type allélique (« sequence type » ou ST) peut être attribué à *S. suis* par la technique du typage de séquences multilocus (MLST). La MLST est une technique qui consiste à amplifier par PCR et à séquencer 7 gènes de ménage très conservés dans les génomes de toutes les souches de *S. suis*. Ces gènes sont *cpn60* (gène codant une chaperonne de 60 kDa), *dpr* (gène codant une protéine de résistance au peroxyde putative),

*recA* (gène codant un facteur de recombinaison homologue), *aroA* (gène codant la 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase), *thrA* (gène codant une aspartokinase / homosérine déshydrogénase), *gki* (gène codant une glucose kinase) et *mutS* (gène codant une enzyme de réparation des erreurs dans l'ADN). Une fois la séquence nucléotidique de ces 7 gènes de ménage connue, il y a attribution d'un numéro pour chacun des différents allèles retrouvés entre les souches à l'aide d'une base de données internationale (ssuis.mlst.net). Ainsi, un patron allélique peut être construit menant à la détermination du ST de chacune des différentes souches analysées (36).

Néanmoins, bien que la MLST soit une bonne méthode pour réaliser des études phylogénétiques chez *S. suis*, elle comporte certains points faibles. En effet, l'utilisation de gènes de ménage, aux séquences hautement conservées, peut masquer des différences génotypiques, et par conséquent phénotypiques, importantes entre les différentes souches. L'acquisition récente d'ADN exogène de phages, d'îlots génomiques, d'éléments intégratifs et conjugatifs (ICE) et des phénomènes de recombinaison homologue pourraient ainsi passer inaperçus. Il pourrait donc exister une plus grande variabilité génétique entre les souches d'un même ST que ce que la méthode pourrait laisser présager (37). Les limitations de cette technique ont entre autres pu être démontrées par l'étude des souches de sérotype 2 de ST25 et ST28. Ces deux études ont permis de montrer qu'il existe des différences majeures entre des souches, qui devraient être génétiquement très rapprochées (14, 38).

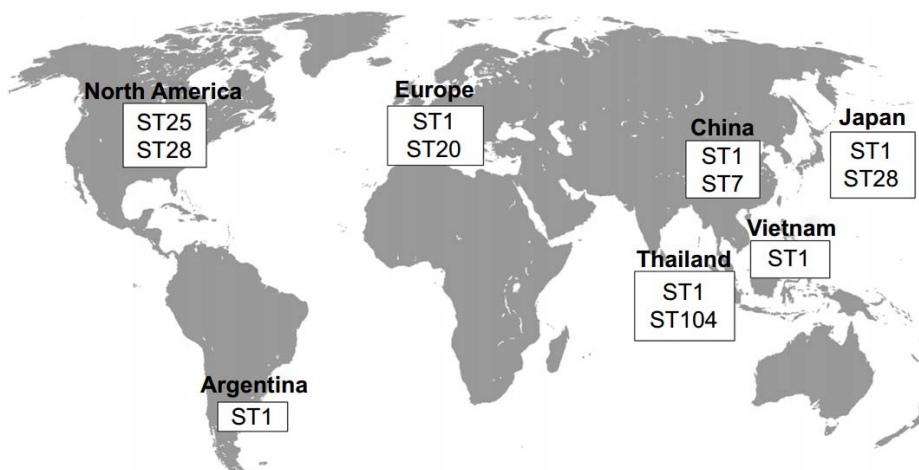


Figure 1. Distribution mondiale des ST de *S. suis* sérotype 2 les plus souvent répertoriées, tirée de (2).

Chez *S. suis* sérotype 2, 111 différents STs ont été décrits en date du 10 décembre 2017. Par contre, malgré ce nombre important de STs, il est possible d'observer un regroupement géographique de certains d'entre eux, en ce qui concerne *S. suis* sérotype 2. En effet, les ST1 sont les souches qui sont les plus prévalentes en Europe, en Asie et en Amérique du Sud. Ces souches, retrouvées également un peu partout dans le monde, sont associées au développement de maladies autant chez le porc que chez l'Homme. Les souches appartenant au ST7 sont retrouvées exclusivement en Chine et elles ont été responsables d'éclosions mortelles chez l'Homme. Pour leur part, les souches appartenant au ST20 sont retrouvées en Europe et plus particulièrement aux Pays-Bas, où elles sont la cause principale de maladies chez le porc et l'Homme. Pour ce qui est de l'Amérique du Nord, ce sont principalement des souches appartenant aux ST25 (également retrouvées en Thaïlande) et aux ST28 (également retrouvées au Japon) qui sont les plus souvent isolées (39). Ces deux ST sont moins virulents que le ST1. En effet, une étude a permis de déterminer que les souches appartenant au ST25 ont une virulence intermédiaire, tandis qu'une souche ST28 isolée d'Amérique du Nord n'est pas virulente dans un modèle d'infection expérimental (3). De plus, les souches appartenant aux ST101 et 104 sont endémiques en Thaïlande et ces dernières semblent être de plus en plus reliées à des cas de maladies chez l'Homme (39).

## 2 Facteurs de virulence

### 2.1 Pathogénèse de *S. suis*

*S. suis* est une bactérie pathogène du porc causant principalement des septicémies et des méningites à son hôte (2). Pour ce faire, la bactérie doit traverser différentes barrières du système immunitaire inné. En effet, la bactérie doit être capable de coloniser et d'envahir les cellules épithéliales de l'hôte, afin de se rendre dans le sang. Une fois en circulation sanguine, la bactérie doit être capable de résister aux différentes attaques du système immunitaire dans cet environnement, lui permettant de causer septicémie et choc septique suite à l'induction de la production d'une grande quantité de médiateurs pro-inflammatoires. Si l'hôte survie, la dernière grande barrière à franchir pour *S. suis* est la barrière hématoencéphalique ou la barrière hémato-liquide céphalorachidien (BBB; « *blood-brain barrier* » ou blood-CSF; « *blood-cerebrospinal fluid* ») où la bactérie pourra, tout comme dans la circulation sanguine, induire une forte réponse inflammatoire au sein du système nerveux central (SNC), menant au développement de la méningite (5).

#### 2.1.2 Colonisation et invasion des cellules épithéliales

Tout d'abord, *S. suis* possède plusieurs facteurs impliqués dans la colonisation et l'invasion de cellules épithéliales de son hôte, et ce au niveau des voies respiratoires et plus particulièrement des amygdales (5). Tout d'abord, il a été suggéré que *S. suis* produit une IgA protéase capable de cliver les IgA<sub>1</sub> humains, première barrière de défense des muqueuses respiratoires. Ceci permettra à *S. suis* de persister au niveau des muqueuses et donc d'adhérer aux cellules épithéliales sous-jacentes. Bien que les niveaux d'adhésion aux et d'invasion des cellules épithéliales sont très faibles, différentes lignées cellulaires épithéliales (NPTr, Hep-2 et HeLa) ont été utilisées pour évaluer la fonction de plusieurs facteurs. Au total, il est possible de dénombrer plus de 20 facteurs participant à l'adhésion aux et à l'invasion des cellules épithéliales (5, 40-55). D'autres parts, plus d'une quarantaine de protéines ont un rôle démontré dans la liaison aux composantes de la matrice extracellulaire (MEC), que ce soit la fibronectine, le fibrinogène, la laminine ou encore le collagène (5, 40, 45, 46, 49, 51, 56, 57). L'hémolysine de *S. suis* (suilysine), de par son activité cytotoxique, participe également à l'invasion des

surfaces épithéliales par *S. suis* (5). Il est également important de noter que plusieurs facteurs ont également été décrits comme étant impliqués indirectement dans la colonisation de *S. suis* de par leur capacité à réguler l'expression de ces adhésines (5).

Bien que plusieurs facteurs aient été décrits, lors de manipulation *in vitro*, comme étant impliqués dans la pathogenèse de *S. suis*, leur rôle dans la virulence n'a pas été évalué de la même manière. En effet, différents modèles d'infection *in vivo* et voies d'inoculations ont été employés pour évaluer la virulence des différents mutants (Tableau I).

Tableau I. Synthèse des essais de virulence des différents facteurs impliqués dans la colonisation et l'invasion des cellules épithéliales de l'hôte par *S. suis*

# mutants	Modèle	Voie d'inoculation	Virulence	Références
5	Poisson-zèbre	Intrapéritonéale	Atténuée	(51), (46, 49), (58), (5)
10	Murin	Intrapéritonéale	Atténuée (9/10 mutants)	(5, 41-44, 48, 50, 54, 55)
1		Intraveineuse	Atténuée	(5)
1		Intranasale	Atténuée	(56)
1		Intracisternale	Atténuée	(47)
2		Inconnue	Atténuée (1/2 mutants)	(5, 52)
4	Porcin	Intranasale	Atténuée (2/4 mutants)	(5, 40)
3		Intrapéritonéale	Atténuée (1/3 mutants)	(5, 50, 54)
5		Intraveineuse	Atténuée (4/5 mutants)	(5)
1		Inconnue	Atténuée	(52)

### 2.1.2 Persistance

Une fois les surfaces épithéliales franchies, *S. suis* pourra se rendre dans la circulation sanguine par des mécanismes encore peu connus. Certaines études ont permis d'émettre l'hypothèse du cheval de Troie modifié (« modified Trojan horse »), c'est-à-dire que *S. suis* pourrait se lier aux monocytes par l'intermédiaire de facteurs impliqués dans sa virulence (5, 20, 59). Cependant, plusieurs autres travaux ont plutôt permis de démontrer que *S. suis* circule librement dans le sang, où il pourra, grâce à divers facteurs, résister à la phagocytose et au « killing » par les neutrophiles et macrophages qu'il rencontrera (5). En effet, bien que la CPS semble être un facteur déterminant pour la persistance de *S. suis* dans le sang, des facteurs impliqués dans la tolérance au stress oxydant sont impliqués dans cette étape cruciale pour la survie de la bactérie (5, 8, 35, 54, 60-69). Plusieurs autres facteurs sont également impliqués

dans la régulation de l'expression de la CPS ou encore de l'expression des protéines de tolérance aux stress. Ces autres facteurs semblent encore une fois essentiels à la survie de la bactérie (5).

Tout comme pour les facteurs impliqués dans la colonisation et l'invasion des surfaces épithéliales de l'hôte, la méthodologie employée pour déterminer l'impact des facteurs impliqués dans la survie en circulation de la bactérie est différente (Tableau II).

Tableau II. Synthèse des essais de virulence des différents facteurs impliqués dans la survie de *S. suis*

# mutants	Modèle	Voie d'inoculation	Virulence	Références
2	Poisson-zèbre	Intrapéritonéale	Atténuée	(58, 63)
18	Murin	Intrapéritonéale	Atténuée (17/18 mutants)	(5, 42, 44, 48, 50, 54, 55, 67)
2		Inconnue	Atténuée	(52, 68)
5	Porcin	Intranasale	Atténuée (3/5 mutants)	(5, 65, 66)
5		Intrapéritonéale	Atténuée (4/5 mutants)	(5, 50, 54)
5		Intraveineuse	Atténuée	(5, 64, 70)
3		Inconnue	Atténuée	(5, 52, 68)

En plus de persister dans le sang, *S. suis* a également la capacité d'induire la production de médiateurs pro-inflammatoires, menant directement au développement du choc septique dans l'organisme infecté (5). En effet, différentes études ont été menées et ont permis de déterminer que *S. suis* induit la libération de médiateurs pro-inflammatoires en interagissant avec les cellules de l'hôte (71-74). De plus, des expériences *in vivo* dans un modèle murin d'infection ont permis de démontrer qu'en 24 h, *S. suis* induit la production de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires, ce qui pourrait donner une explication à la mort soudaine des animaux infectés (5).

### 2.1.3 Invasion du SNC

Enfin, la bactérie peut atteindre le SNC de son hôte, si celui-ci n'a pas déjà succombé à un choc septique. Pour ce faire, la bactérie doit traverser la BBB ou encore la barrière sang-CSF. Bien que les mécanismes par lesquels *S. suis* arrivent à envahir le SNC restent nébuleux, différentes études ont été réalisées pour tenter de les élucider (5). Ainsi, différents facteurs impliqués dans la virulence de *S. suis* ont pu être caractérisés et étudiés pour leur capacité à participer à l'invasion du SNC dans des modèles d'adhésion aux et d'invasion des cellules

endothéliales microvasculaires du cerveau (BMECs) porcines (5). Une fois de plus, l'hémolysine de *S. suis* (suilysine), de par son activité cytotoxique, pourrait participer à l'invasion des surfaces endothéliales par *S. suis* (5). Plus récemment, une étude a permis de démontrer que l'énolase de *S. suis* possède la capacité d'augmenter la perméabilité de la BBB. Ceci pourrait s'expliquer par un relâchement important d'IL-8 par les cellules de la BMECs et par les astrocytes en culture (57).

D'autres études se sont plutôt intéressées à la barrière sang-CSF et ont utilisé des cellules épithéliales porcines du plexus choroïdien (PCPEC) (59, 75-79). Ces études ont permis de démontrer que *S. suis* a la capacité de diminuer la résistance transépithéliale de ces cellules. En effet, il est possible d'observer un important réarrangement du cytosquelette d'actine et des protéines impliquées dans la formation des jonctions serrées (59, 77). Ceci pourrait permettre le déplacement des bactéries et des cellules du système immunitaire, jusque dans le CSF (59). De plus, différentes études ont permis de démontrer que *S. suis* a la capacité d'adhérer à ces cellules (75) et qu'il a également la capacité de traverser la couche de cellules épithéliales, de leur face basolatérale (sang) à leur face apicale (liquide céphalorachidien) (78). *S. suis* induit également la mort cellulaire dans ce modèle, et cela est en partie due à la présence de la suilysine (59, 76). D'autre part, l'étude du transcriptome de cellules infectées par *S. suis* a permis de démontrer que les gènes régulés sont principalement impliqués dans la réponse inflammatoire et dans la production de médiateurs inflammatoires (75, 77). Ceci pourrait, entre autres, participer à la migration de cellules du système immunitaire dans le CSF, ce qui est le cas pour les neutrophiles (79).

## **2.2 Facteurs de virulence : sujet de controverse?**

Dans les dernières années, un nombre croissant de publications sur *S. suis* s'est intéressé à l'étude des facteurs de virulence, qui s'avèrent être, pour plusieurs, des facteurs critiques pour la virulence de la bactérie. Comme il est possible de le noter dans les Tableaux I et II, la méthode expérimentale employée pour l'étude des différents facteurs de virulence varie énormément entre les différentes équipes de recherche sur *S. suis*, autant pour les études *in vitro*, que pour les études *in vivo*. La méthode expérimentale utilisée pour l'étude des facteurs de virulence peut varier énormément, menant à un manque de reproductibilité entre différentes équipes de

recherche. Le choix des modèles *in vitro* et *in vivo* employés pourrait en être la cause (6). En effet, certaines études présentent des résultats contradictoires entre elles, mettant en évidence que l'utilisation de méthodes expérimentales différentes ou encore l'utilisation de souches avec un patron génétique différent mènent à des conclusions différentes (6). À titre d'exemple, une comparaison a été réalisée entre des études portant sur 3 différents facteurs de virulence, soit la dipeptidyl peptidase 4 (DppIV), l'autolysine (Atl) et une protéine de liaison au facteur H (Fhb) (Tableau III).

Tableau III. Facteurs de controverse – exemples de modèles expérimentaux

<b>Adhésion aux cellules épithéliales</b>			
Facteurs	DppIV (80)	DppIV et Atl (7)	Atl (81)
Modèle (origine)	Hep-2 (humaine)	NPTTr (porcine)	Hep-2 (humaine)
Conditions	MOI 10; 1-2 h incubation	MOI 10; 2 h incubation	MOI 100; 3 h incubation
Résultats	Adhésion ++	Adhésion +/-	Adhésion +++
Conclusions	Résultats différents dus au modèle et/ou conditions (MOI, temps d'incubation)?		
<b>Essai de virulence</b>			
Facteurs	DppIV (80)	DppIV et Atl (7)	Atl (81)
Modèle (lignée)	Murin (lignée?)	Murin (lignée C57BL/6)	Poisson-zèbre
Dose	1x10 <sup>8</sup> CFU	5x10 <sup>7</sup> CFU	2x10 <sup>3</sup> à 2x10 <sup>7</sup> CFU
Résultats	Virulence atténuée	Virulence non affectée	Virulence atténuée
Conclusions	Résultats différents dus au modèle et/ou dose?		
<b>Résistance à la phagocytose</b>			
Facteurs	Fhb (82)		Fhb (8)
Modèles	Neutrophiles (PMN humains)		Macrophages (THP-1 humains)
Conditions	MOI 10; 60-120 min incubation		MOI 10; 90 min incubation
Résultats	Phagocytose du mutant augmentée		Phagocytose non affectée
Conclusions	Résultats différents dus au modèle et/ou conditions (temps d'incubation)?		

Comme il est possible de le voir dans le Tableau III, et ce pour différentes expériences, les méthodes utilisées diffèrent. Tout d'abord, dans les études *in vitro*, des lignées cellulaires murines, humaines et porcines ont été utilisées, afin d'identifier le rôle potentiel d'une protéine spécifique. En effet, l'utilisation des cellules Hep-2 est fréquente dans les études d'adhésion aux et d'invasion des cellules épithéliales et ce malgré qu'aucune évidence n'a démontré que l'Homme peut également être infecté via les voies respiratoires (6). De plus, dans les études *in vitro*, différents MOI (« multiplicity of infection ») et temps d'incubation vont être employés, ajoutant encore une fois de la variabilité dans les résultats obtenus.





En plus de l'origine du modèle employé, la voie d'inoculation employée varie également entre les études. En effet, des modèles d'infection intranasale, intraveineuse et intrapéritonéale sont également fréquemment utilisés chez le porc et la souris (6). Cependant, selon la route d'inoculation choisie, différentes cellules du système immunitaire seront activées, ce qui mènera à une réponse différente de l'organisme infecté (85). Les options sont donc multiples lorsque vient le temps de concevoir la méthode expérimentale pour un projet, d'où l'importance de prendre en compte le rôle et la cible du facteur à l'étude pour bien choisir le modèle à employer.

*S. suis* possède également plusieurs facteurs impliqués dans sa virulence ayant des rôles et des cibles très similaires. En effet, la présence d'autant de facteurs, aux fonctions similaires, pourraient masquer l'impact de la délétion d'une seule de ces protéines sur la pathogenèse de *S. suis* (86). Il est possible de prendre pour exemple les protéines de liaisons au facteur H. Il a été récemment démontré que la déposition du facteur H à la surface de *S. suis* ne dépendait pas d'une seule protéine. En effet, les protéines Fhbp et Fhb (« factor H binding proteins ») et la capsule ont tous un rôle à jouer. De plus, le facteur H est toujours capable de se déposer à la surface de la bactérie dans un triple mutant, ce qui laisse présager que d'autres protéines pourraient avoir la capacité de lier le facteur H (8, 87).

D'autre part, il existe une grande variabilité entre les souches de *S. suis*, que ce soit entre les sérotypes ou encore au sein d'un même sérotype (6). Dans le Tableau 2, bien que la méthode ait été différente pour réaliser toutes les expériences, le profil génétique des souches l'était également. Auger *et al.* 2017 ont effectué toutes les expériences pour DppIV et Atl en utilisant 3 souches de *S. suis* sérotype 2 appartenant à différents STs, soit une souche ST1 (forte virulence), ST7 (très forte virulence) et ST25 (virulence intermédiaire) (7). Dans le cas de DppIV, Ge *et al.* (80) avaient également utilisé une souche ST7, toutes les deux isolées de cas cliniques chez l'homme lors de l'écllosion mortelle en 2005 (80, 88). Cependant, dans le cas de Atl, Ju *et al.* (81) ont utilisé une souche de *S. suis* ST378, ST très peu utilisée dans les études de virulence. Ainsi, il est possible que la différence génétique entre les souches de ces études permette d'expliquer, en partie, les résultats différents obtenus de part et d'autre. De plus, la protéine Atl de *S. suis* a été démontrée comme ayant un impact dans la formation de biofilm chez *S. suis* sérotype 2 ST7 et ST25, mais pas chez une souche ST1 (7). Ceci laisse donc, une

fois de plus, présager que la variabilité génétique des souches affecte également les résultats obtenus.

Un autre exemple de facteurs de virulence ayant un impact selon le sérotype de *S. suis* utilisée est l'antigène I/II (AgI/II). Bien que présents dans différents sérotypes, l'AgI/II ne présente pas la même implication dans la virulence de *S. suis*. Alors qu'il joue un rôle modeste dans la virulence de *S. suis* sérotype 2, son implication dans la pathogenèse de *S. suis* sérotype 9 semble très importante, que ce soit au niveau de l'adhésion aux et l'invasion de cellules épithéliales, de la formation de biofilm ou encore de la survie à pH acide (40). Il est également important de mentionner que très peu d'études se sont attardées aux facteurs de virulence du sérotype 9, alors que plusieurs facteurs ont été démontrés comme étant d'importantes adhésines pour *S. suis* sérotype 2 (5). Ces adhésines, comme pour le facteur H, pourraient jouer un effet compensatoire masquant, par le fait même, un rôle de l'AgI/II dans l'adhésion aux cellules épithéliales par exemple (86).

En 2012, la fonction d'un autre facteur de virulence de *S. suis* sérotype 2, soit l'IgA protéase, a été questionné et une nouvelle controverse est apparue (9, 13). Cette controverse sera discutée plus en détail dans la section 3 de ce mémoire.

## **3 Les zincs métalloprotéases et les Streptocoques**

### **3.1 Les 4 zincs métalloprotéases de *Streptococcus pneumoniae***

*S. pneumoniae* est une bactérie pathogène impliquée dans le développement de maladies invasives et d'infections au niveau du tractus respiratoire, faisant d'elle un des microorganismes les plus mortels au niveau mondial. À la surface de *S. pneumoniae*, il est possible de retrouver jusqu'à 4 zincs métalloprotéases, soient ZmpA (ou IgA protéase), ZmpB, ZmpC et ZmpD (13).

#### **3.1.1 Structure générale des zincs métalloprotéases et leur patron de virulence**

Les 4 zincs métalloprotéases de *S. pneumoniae* possèdent tous les mêmes domaines fonctionnels, c'est-à-dire un peptide signal (S1), un motif LPNTG peu commun en N-terminal, un site de clivage putatif (S2), des répétitions en tandem du domaine G5 et la peptidase M26. Chacune de ces métalloprotéases a un site actif bien défini (13, 89).

Les différents domaines de ces 4 métalloprotéases jouent des rôles divers, afin d'assurer la bonne localisation et le bon fonctionnement de ces protéines. Parmi ces domaines, le peptide signal et le motif LPXTG sont tous deux responsables de la localisation de la protéine à la surface de la bactérie (13, 90). En effet, le peptide signal (S1) est reconnu par une protéine du système de sécrétion de type II, ce qui permet l'exportation de la métalloprotéase à la surface de la bactérie (13). Pour sa part, le motif LPXTG est un domaine d'ancrage protéique à la paroi cellulaire des bactéries à coloration Gram positive, telles que les staphylocoques et les streptocoques. Ainsi, les protéines de surface peuvent être ancrées à la membrane de manière covalente par l'action d'une sortase spécifique (SrtA) venant cliver le motif LPXTG entre la thréonine (T) et la glycine (G) (90, 91). De plus, étant donné la présence d'un site de clivage putatif (S2), ces protéines pourraient également être libérées dans l'environnement de la bactérie (13, 89). Le domaine G5, quant à lui, pourrait se lier au N-acétylglucosamine, composante du peptidoglycane, mais sa fonction exacte n'a pas encore été définie à ce jour (13). Enfin, la peptidase M26 est le domaine fonctionnel de la protéine assurant le clivage des différents substrats. En effet, il est possible de retrouver le site actif de la protéine dans cette

région. Il est important de mentionner que la présence du zinc est essentielle à l'activité de ces 4 métalloprotéases (92).

### **3.1.2 IgA<sub>1</sub> protéase**

#### **3.1.2.1 Rôle des IgA chez l'hôte**

Les IgA sont les anticorps les plus abondants dans les sécrétions et dans les muqueuses (93, 94). Elles sont abondamment retrouvées au niveau du tractus respiratoire et du tractus gastro-intestinal (95), mais aussi en plus faible quantité au niveau du tractus génital et des glandes exocrines (11). En effet, environ 5 à 15 g d'IgA sont produits par jour chez l'adulte (95). De plus, deux différents isoformes d'IgA sont retrouvés chez l'Homme, soit les IgA<sub>1</sub> et les IgA<sub>2</sub> (95-98). Ces dernières seraient plus résistantes aux enzymes bactériennes protéolytiques, telles que l'IgA protéase. Ceci pourrait être dû au fait que leur région charnière est plus courte, de 13 acides aminés, que celle des IgA<sub>1</sub> (93, 95). La production de ces deux isoformes varie selon les muqueuses observées. En effet, les IgA<sub>1</sub> sont plutôt retrouvées au niveau du tractus respiratoire, tandis que les IgA<sub>2</sub> sont pour leur part plus abondants au niveau du tractus gastro-intestinal (96, 98).

Les IgA sont produites par les cellules B. Ces cellules peuvent produire des IgA spécifiques dans les centres folliculaires et dans les centres germinatifs, et ce de manière dépendante ou indépendante des cellules T (11, 96-99). Au niveau de l'intestin, celles-ci sont principalement produites dans les plaques de Peyer (97). De plus, les IgA sécrétoires sont produites par les cellules B suite à l'hypermutation somatique (HMS) et par la commutation isotypique (94, 97). En circulation, les IgAs sont principalement retrouvées sous forme de monomères (95). Par contre, au niveau du tractus gastro-intestinal, les IgA monomériques interagissent avec un petit polypeptide dérivé des cellules plasmatiques nommé chaîne J (« joining chain ») qui permet la formation de dimères d'IgA (11, 94, 97). Ces dimères peuvent alors reconnaître le récepteur d'immunoglobuline polymérique (pIgR) à la surface de la muqueuse des cellules intestinales et s'y lier (94). Ceci permet le transport des IgA à l'intérieur de vésicules vers la lumière intestinale (93, 97). Une fois traversée la couche de cellules épithéliales, le complexe IgA-pIgR subira un clivage protéolytique permettant la libération des

IgA. Ces IgA seront appelés IgA sécrétoires puisqu'un petit fragment du transporteur restera lié à sa surface (« secretory component ») (11, 97).

Comme mentionné un peu plus haut, les IgA peuvent être produites de manière dépendante ou indépendante des cellules T et seront considérées comme des IgA de haute affinité et de faible affinité, respectivement (11, 99). Des rôles différents sont associés à ces immunoglobulines selon la voie de production empruntée (93). En effet, les IgA de haute affinité sont impliquées dans la protection (93, 96, 100). Quant à elles, les IgA de faible affinité sont plutôt impliquées dans le confinement des bactéries commensales (93, 96).

Les IgA sécrétoires ont effectivement plusieurs rôles protecteurs à jouer. En effet, les IgA ont la capacité de prévenir l'adhésion des microorganismes, de leurs toxines, ou de macromolécules pro-inflammatoires qu'ils produisent, aux cellules épithéliales (11, 101). Ceci est possible étant donné la capacité des IgA à induire l'agglutination bactérienne (100, 101), à masquer les épitopes d'adhésion à des récepteurs cellulaires spécifiques (94, 100) et à permettre la prise au piège des microorganismes et de leurs toxines dans le mucus (98, 100). Tous ces processus sont communément appelés l'exclusion immunitaire (98, 99). Les IgA sécrétoires peuvent également intercepter des microbes et des toxines à l'intérieur des cellules épithéliales. En effet, les IgA ont été démontrées comme étant efficaces afin de neutraliser les virus et les produits microbiens pro-inflammatoires à l'intérieur des cellules épithéliales infectées (96, 99). De plus, les IgA ont la capacité de lier le récepteur d'IgA Fc $\alpha$ RI, qui est exprimé à la surface de plusieurs types de cellules immunitaires, dont les granulocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes (96). Ceci permet l'élimination de bactéries pathogènes par phagocytose (11). En plus de tous ces moyens de défense, les IgA peuvent réduire la virulence de certaines bactéries. En effet, les IgA sécrétoires peuvent réduire la mobilité de *Salmonella spp.* et limiter le potentiel invasif de *Shigella flexneri* (98).

Pour ce qui est des IgA de faible affinité, des études ont permis de démontrer que celles-ci sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie au niveau de l'intestin. En effet, les IgAs sécrétoires participent à la diminution de l'inflammation dans l'intestin et favorisent les communautés bactériennes appropriées dans la flore commensale (100). Pour ce faire, les IgA ont la capacité de moduler le profil d'expression des gènes des bactéries commensales,

permettant la sélection des espèces avec une activité inflammatoire moindre sur les tissus de la muqueuse intestinale (96).

Contrairement aux IgG, toutes les fonctions des IgA qui ont été mentionnées n'impliquent pas le complément (94, 99). En effet, les IgA sécrétoires ont la capacité de se lier aux bactéries sans activer la cascade du complément et sans stimuler la libération de médiateurs inflammatoires par les cellules immunitaires (100).

Finalement, les IgA sont impliquées dans plusieurs maladies inflammatoires. Les deux causes principales du développement de maladies inflammatoires sont 1 : l'augmentation de la quantité de cette immunoglobuline dans le sérum et 2 : l'augmentation de la formation de complexes immunitaires d'IgA (93). Parmi ces maladies figure la maladie de Berger (« IgA nephropathy »; IgAN), la cirrhose du foie, la maladie inflammatoire chronique de l'intestin et le SIDA (93).

### **3.1.2.2 Activité de l'IgA<sub>1</sub> protéase de *S. pneumoniae***

La capacité de cliver les IgA est une caractéristique commune aux principaux agents responsables de la méningite bactérienne, soit *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* et *S. pneumoniae* (13, 102). Chez *S. pneumoniae*, cette activité protéolytique est assurée par la zinc métalloprotéase A ou IgA protéase, protéine présente chez toutes les souches de cette espèce bactérienne (103). Celle-ci a en effet la capacité de cliver spécifiquement les immunoglobulines A1 (IgA1) humaines (13). Ce clivage permet de dissocier la fonction effectrice du fragment Fc du fragment Fab lié à l'antigène (102). Ceci a été démontré comme permettant l'adhésion de *S. pneumoniae* à des cellules épithéliales respiratoires *in vitro* (13, 102), ce qui est également le cas pour l'IgA protéase de *H. influenzae* (104). De plus, une étude a permis de démontrer que l'IgA protéase de *S. pneumoniae* peut être inhibée par les IgG du sérum. En effet, l'hôte a la capacité de générer une réponse spécifique, suite à une infection par *S. pneumoniae*, en produisant des anticorps, qui viennent neutraliser l'activité protéolytique de l'IgA protéase (102). Néanmoins, l'IgA protéase de *S. pneumoniae* ne semble pas avoir d'autres activités de clivage, contrairement aux sérines IgA protéases de *N. meningitidis* et *H. influenzae* (13).

### 3.1.3 ZmpB

#### 3.1.3.1 Action de ZmpB de *S. pneumoniae*

Contrairement à l'IgA protéase, la protéine ZmpB n'a pas la capacité de cliver les IgA1 humaines (105). Jusqu'à présent, il y a peu de connaissances sur le rôle joué par cette protéine. Néanmoins, une étude dans un modèle intranasal murin a permis de déterminer les niveaux de différents médiateurs pro-inflammatoires, tels que le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Les résultats obtenus, par comparaison de la souche mère avec son mutant  $\Delta zmpB$ , ont permis de dire que ZmpB chez *S. pneumoniae* est impliquée dans la réponse inflammatoire et ce en induisant l'augmentation de la quantité de TNF- $\alpha$  au niveau des poumons des animaux infectés (106).

### 3.1.4 ZmpC

Tout comme pour ZmpB, la protéine ZmpC de *S. pneumoniae* n'a pas la capacité de cliver les IgA1 humains. Ainsi, plusieurs études ont été réalisées avec la protéine ZmpC de *S. pneumoniae* afin d'en définir la fonction. Ces études ont permis de déterminer qu'il y a 3 rôles principaux associés à cette métalloprotéase, soit l'activation de la matrice métalloprotéase-9 (MMP-9) et le clivage des ectodomains de la glycoprotéine de liaison à la P-sélectine (PSGL-1) et de la mucine 16 (MUC16) (105, 107-109). Cela permet donc de croire que les zincs métalloprotéases de *S. pneumoniae* sont très spécifiques à un substrat précis (105).

Une étude sur différents volontaires sains a permis de déterminer que tous les volontaires sains ont des anticorps anti-ZmpC en circulation sanguine. Ceci laisse donc présager que les souches possédant ZmpC peuvent être transmises à l'hôte et que cette protéine est reconnue par celui-ci (109).

#### 3.1.4.1 ZmpC active MMP-9

Tout d'abord, lorsque la proenzyme de la MMP-9 est incubée en présence de ZmpC (surnageant bactérien (105) et protéine purifiée (13)), une activation de la pro MMP-9 a été observée par zymographie. Ceci permet donc de dire que la pro MMP-9 subit un clivage spécifique par la protéine ZmpC de *S. pneumoniae*. De plus, il est intéressant de noter que



l'activation de la pro MMP-9 par clivage se produit de manière semblable à MMP-3, l'activateur bien connu de la MMP-9 (105).

Les matrices métalloprotéases (MMPs) sont des enzymes impliquées dans la réorganisation de la MEC (110). Ces MMPs sont classées selon leurs fonctions et plus précisément selon leurs substrats. Les différents groupes rencontrés sont les collagénases (MMP-1; 8; 13 et 18), les gélatinases (MMP-2 et 9), les stromelysines (MMP-3; 10 et 11), les matrylisines (MMP-7 et 26) et les MMPs de type membranaire (MMP-14; 15; 16; 17; 24 et 25) (111). En effet, MMP-9 est une des 2 MMPs considérées comme étant une gélatinase, et plus précisément la gélatinase B (112). Cette capacité à cliver la gélatine est due à la présence de 3 domaines fibrinogènes répétés au sein de la structure protéique de MMP-9. Ces 3 domaines facilitent l'adhésion de cette MMP à de gros substrats, en facilitant, par le fait même, leur dégradation (113). En plus de sa capacité à cliver la gélatine, MMP-9 a la capacité de cliver le collagène de type IV, constituant important de la membrane basale (112). Ce faisant, MMP-9 permet la libération de macromolécules enchâssées dans la MEC, telles que des facteurs de croissance.

Un autre domaine important de cette protéine est le propeptide. En effet, MMP-9 est retrouvée dans un état latent dans l'organisme jusqu'au clivage bien spécifique de ce domaine, ce qui vient activer la protéine. Cette activation peut être effectuée par plusieurs protéines différentes. Parmi celles-ci, il est possible de retrouver la collagénase MMP-3, la plasmine et l'élastase des neutrophiles (113).

En plus de posséder une élastase capable d'activer MMP-9, les neutrophiles ont aussi la capacité de stocker la pro MMP-9 dans des vésicules sécrétoires. Ainsi, MMP-9 sous sa forme active peut être sécrétée rapidement (en minutes) par les neutrophiles, lorsque ceux-ci subissent un stimulus externe (113). De plus, ces cellules produisent eux-mêmes MMP-9 en association avec le NGAL (« neutrophiles gelatinase B associated lipocalin ») (113). Plusieurs autres types cellulaires, tels que les macrophages, les fibroblastes, les neurones et les astrocytes, ont également la capacité de produire et de sécréter cette MMP (113-115). Pour ce qui est des macrophages, la sécrétion de MMP-9 se produit quelques heures après le stimulus. En effet, contrairement aux neutrophiles, les macrophages vont compter sur la synthèse *de novo* avant de sécréter cette métalloprotéase en circulation (113). Une fois sécrétée dans l'espace

extracellulaire, MMP-9 peut diffuser dans les tissus ou se lier à des récepteurs à la surface de plusieurs types cellulaires différents (113, 114, 116). MMP-9 peut effectivement reconnaître et se lier à des intégrines, CD44 et Ku à la surface de leucocytes, de cellules épithéliales et endothéliales et de neurones entre autres (114-116).

Comme mentionné plus haut, MMP-9 est sécrétée par différents types cellulaires en réponse à des stimuli externes (113). Ainsi, plusieurs équipes se sont intéressées aux rôles potentiels joués par MMP-9 dans l'organisme. Ces études ont permis de statuer que MMP-9 assure des fonctions importantes, que ce soit dans des processus physiologiques ou dans certaines pathologies (113, 114). En effet, cette métalloprotéase est impliquée dans le remodelage tissulaire, la différenciation cellulaire et dans l'angiogenèse (113, 114). Tous ces processus physiologiques sont régulés par MMP-9 via la capacité de cette dernière à réorganiser la MEC (110) et à réguler l'activité de différents facteurs de croissance (114). De plus, MMP-9 a un rôle important à jouer dans l'inflammation et la guérison des tissus lésés (113, 115). À cette étape, MMP-9, sécrété par les leucocytes (neutrophiles ou macrophages) joue un rôle important dans la régénération de l'épithélium et plus précisément dans la synthèse de la MEC (113, 115). En effet, MMP-9 permet le recrutement à la fois des cellules immunitaires et des fibroblastes. Par différentes voies de signalisation MMP-9 induira la différenciation de ces cellules afin de synthétiser et de réparer la MEC endommagée (115).

Différentes études ont permis de démontrer que MMP-9, lorsque retrouvée en grande quantité dans le CSF, est associée avec des dommages au cerveau, au développement de méningites et à la perturbation de la BBB (117-119). En effet, il a été démontré que MMP-9, par sa capacité d'augmenter la perméabilité de la BBB, est impliquée dans l'entrée au cerveau du virus causant la fièvre du Nil occidental. En effet, l'expression de MMP-9 dans le cerveau des souris infectées par le virus débute très rapidement après l'infection et les niveaux de MMP-9 détectés demeurent importants, et ce même lorsque la virémie diminue (120). De plus, des études d'infection *in vivo* chez la souris ont permis de démontrer que la quantité de MMP-9 augmente drastiquement dans le CSF des animaux ayant été infectés avec *S. pneumoniae* (121, 122). Il est également important de noter qu'il est habituellement très difficile de détecter MMP-9 dans le CSF (120, 121). Cette importante augmentation pourrait s'expliquer par la présence de leucocytes exprimant de hauts niveaux de MMP-9 dans le CSF (121). Des observations

semblables ont pu être effectuées chez de jeunes enfants atteints de méningites bactériennes. En effet, MMP-9 a pu être détecté dans le CSF de 97 % des patients, contrairement à 0 % chez des patients sains (123). Ils ont également émis l'hypothèse que la présence de MMP-9 pourrait être responsable d'importantes séquelles suite à la maladie (123).

#### **3.1.4.2 ZmpC clive les ectodomains de PSGL-1**

Plus récemment, des expériences ont été réalisées dans des modèles cellulaires *in vitro* et murins *in vivo* afin d'évaluer l'interaction de ZmpC avec PSGL-1. Cette étude a permis de mettre en lumière la capacité de ZmpC (contenue dans le surnageant bactérien et purifiée) à cliver le domaine de PSGL-1 qui interagit directement avec la P-sélectine. Cette équipe a également démontré, dans un modèle d'infection intranasale chez la souris, qu'il y avait moins de neutrophiles au niveau des poumons de souris infectées avec la souche mère (intranasal), qu'avec la souche mutante  $\Delta zmpC$ . Ceci pourrait être une conséquence importante du clivage de PSGL-1 (109).

PSGL-1 est une protéine transmembranaire de type 1. Cette protéine est exprimée sous forme d'homodimères à la surface des cellules myéloïdes, telles que les macrophages, les granulocytes et les cellules dendritiques. Elle est également exprimée chez les lymphocytes, bien qu'elle y soit sous-exprimée lorsqu'ils entrent dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate) (124). PSGL-1 joue un rôle dans les interactions entre les cellules myéloïdes et les cellules endothéliales, ainsi qu'entre les cellules myéloïdes et les plaquettes (125). En effet, cette protéine a la capacité de lier les 3 différentes formes de sélectines retrouvées dans l'organisme, soit la L-sélectine (associée aux leucocytes), la P-sélectine (associée aux cellules endothéliales et aux plaquettes) et l'E-sélectine (associée aux cellules endothéliales) (126). Plusieurs glycosyltransférases sont impliquées dans la régulation de ces interactions, puisque PSGL-1 doit subir des modifications post-transcriptionnelles, afin de lier les différentes sélectines. De plus, le clivage de la portion N-terminale par différentes métalloprotéases a permis de dire que cette partie de la protéine est essentielle à la liaison de PSGL-1 à la P-sélectine (124).

Le rôle principal associé à PSGL-1 concerne le roulement des neutrophiles. En effet, PSGL-1 est essentiel à la migration normale des neutrophiles, macrophages et cellules

dendritiques sur les veinules postcapillaires. De plus, PSGL-1 est nécessaire au recrutement des lymphocytes T et des cellules myéloïdes jusqu'au site d'infection (124, 125). Une étude avec un mutant de délétion  $\Delta psgl-1$  a démontré qu'en absence de PSGL-1, il y a diminution du nombre de leucocytes interagissant avec l'endothélium et diminution du nombre de neutrophiles au site d'infection (126). Ainsi, PSGL-1 joue un rôle important dans l'activation des neutrophiles, dans la migration de ceux-ci par la couche de cellules endothéliales, dans la chimiotaxie jusqu'au site d'infection et finalement dans l'élimination des pathogènes (127).

En plus de participer au roulement des neutrophiles, PSGL-1 a un rôle à jouer dans la signalisation cellulaire. En effet, PSGL-1 vient réguler différentes voies de signalisation, dont le réarrangement du cytosquelette et la sécrétion de cytokines (IL-8 par exemple) (124, 126). PSGL-1 est également ancrée au cytosquelette. Cet ancrage est essentiel au roulement des neutrophiles permettant, par le fait même, d'en stabiliser le mécanisme (126).

### **3.1.4.3 ZmpC clive les ectodomains de MUC16**

Une étude a ensuite été réalisée avec la ZmpC de *S. pneumoniae* qui a mis en lumière une interaction entre ZmpC et MUC16. En effet, cette équipe a pu démontrer que ZmpC cible et induit le clivage des ectodomains de MUC16, et ce par comparaison de l'action d'une souche mère avec celle d'un mutant isogénique  $\Delta zmpC$  (107).

Les mucines sont des glycoprotéines synthétisées par les cellules épithéliales, afin de former une barrière protectrice de mucus à leur surface, leur permettant de résister à des attaques par des agents pathogènes et à des stress divers. Les mucines peuvent être classées en deux grandes catégories, soient les mucines sécrétées et les mucines associées aux membranes (MAM) (128). En effet, les MAMs sont attachées au côté apical des cellules épithéliales (129) et forment un glycolalyx-O-glycosylé qui sert de barrière et prévient l'adhésion de microorganismes commensaux à l'épithélium (130). MUC16 est une des mucines essentielles du glycolalyx composant la barrière épithéliale MAM (131). En effet, des études ont permis de démontrer que MUC16 est essentiel au niveau des surfaces oculaires, afin de prévenir l'adhésion de *S. aureus* dans un modèle *in vitro* (132, 133). Cette glycoprotéine est principalement exprimée à la surface oculaire, dans le tractus respiratoire et dans le tractus reproducteur féminin (131). MUC16 est également retrouvée dans plusieurs autres tissus, tels que la cavité

abdominale, le péricarde et le péritoine. De plus, une altération de MUC16 semble liée au développement de plusieurs cancers. C'est le cas du cancer des ovaires, dans lequel un épitope de MUC16, l'antigène cancéreux 125, est utilisé comme marqueur pour le diagnostic de ce cancer (128).

### **3.1.5 Impact dans la virulence des Zmp de *S. pneumoniae***

Des études de virulence ont été effectuées afin de déterminer le rôle de l'IgA protéase, de ZmpB et de ZmpC dans la virulence de *S. pneumoniae*. Pour ce faire, un modèle d'infection intranasale chez la souris a été employé et des mutants de délétion ont été réalisés pour chacune des protéines à l'étude. Ainsi, une diminution de la virulence de 36 fois a pu être observée dans les mutants  $\Delta$ *iga* et  $\Delta$ *zmpB* comparativement à 4,7 fois chez un mutant  $\Delta$ *zmpC*. Ces études ont donc permis de démontrer que l'IgA protéase et ZmpB participent plus fortement à la virulence de cette bactérie en comparaison avec ZmpC (134).

Plus récemment, une étude de virulence dans un modèle d'infection intraveineux chez la souris a permis de montrer que ZmpC aurait plutôt un rôle contraire à celui originalement proposé, c'est-à-dire que cette protéine aiderait à contrôler l'infection. En effet, les souris infectées par le mutant  $\Delta$ *zmpC* succombent plus rapidement à l'infection que la souche mère. Ils ont également démontré que le mutant se retrouve en plus grande quantité dans les tissus des souris infectées (135).

## **3.2 Les zincs métalloprotéases et *Streptococcus suis***

### **3.2.1 L'IgA protéase de *S. suis***

Tel que mentionné plus haut, dans les dernières années, un nouveau facteur impliqué dans la virulence de *S. suis* sérotype 2 ST7 (souche 05ZYS) a été identifié. Ce facteur a été décrit comme étant une IgA<sub>1</sub> protéase. Ainsi, des études ont été réalisées afin d'évaluer la structure de cet IgA protéase et sa capacité à cliver les IgA<sub>1</sub> humaines (9, 10).

### 3.2.1.1 Structure générale de l'IgA protéase de *S. suis*

Tout comme pour les zincs métalloprotéases de *S. pneumoniae*, l'IgA<sub>1</sub> protéase de *S. suis* 05ZYS possède un peptide signal de type sec (43 premiers acides aminés), un motif LPNTG en N-terminal, des séquences répétées en tandem (domaines G5) et la peptidase M26 (Figure 6). De plus, le site actif de la protéine se retrouve dans la portion C-terminale de la peptidase M26. Ce site actif est constitué de la séquence de liaison au zinc HEMVH et d'un acide glutamique 20 acides aminés en aval de cette séquence (9).

### 3.2.1.2 Rôle de l'IgA protéase de *S. suis*

En 2010, l'IgA<sub>1</sub> protéase de *S. suis* sérotype 2 05ZYS a été clonée et purifiée, afin de déterminer son rôle à jouer dans la pathogénèse de cette bactérie. Ainsi, la protéine recombinante a été incubée en présence d'IgA<sub>1</sub> humaines. Un gel de polyacrylamide a permis de révéler la présence d'une bande à 35 kDa, bande correspondant au fragment Fc des IgA<sub>1</sub> humaines (Figure 3). Ceci leur a permis de déterminer que l'IgA<sub>1</sub> protéase de *S. suis* a la capacité de cliver les IgA<sub>1</sub> humaines tout comme l'IgA protéase de *S. pneumoniae* (9).

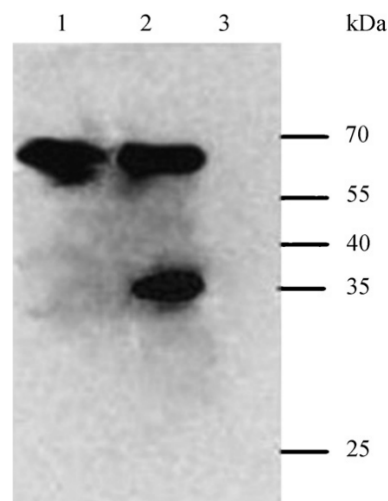


Figure 3. Clivage des IgA<sub>1</sub> humaines par l'IgA protéase recombinante de *S. suis* sérotype 2 ST7. Image tirée de (9).

La même équipe a ensuite travaillé à l'obtention d'un mutant de délétion  $\Delta$ *iga*. Avec ce mutant, une analyse de virulence dans un modèle intranasal chez le porc a été effectuée. En effet, tous les porcs infectés (8) avec la souche mère sont morts après 3 jours et ont montré des

signes cliniques sévères (méningites, des lésions aux poumons, déposition de fibrines). Chez *Δiga*, moins de signes cliniques ont pu être observés et 2 des 8 porcs infectés ont été euthanasiés pour des raisons éthiques après 3 jours. Ceci a permis de conclure que l'IgA<sub>1</sub> protéase, en plus de cliver les IgA<sub>1</sub> humaines, est impliquée dans la virulence de *S. suis* sérotype 2 (10). Malheureusement, le manque d'activité IgA protéase chez le mutant en comparaison avec la souche parentale n'a pas été évalué.

Ils ont également été en mesure de démontrer qu'en plus d'être un facteur de virulence important pour *S. suis*, la protéine est également un antigène protecteur. En effet, des souris immunisées avec l'IgA protéase recombinante purifiée sont protégées contre une infection avec une dose létale de *S. suis* sérotype 2. L'administration de l'IgA protéase recombinante aux souris a induit une forte production d'IgG spécifique à l'antigène. Parmi ces IgG, il est possible de voir de hauts niveaux d'IgG1 et d'IgG2a, caractérisant une réponse de type 2 et de type 1 respectivement (voir section 4) (12).

### **3.2.2 Analyse comparative des zincs métalloprotéases de différentes espèces de streptocoques, incluant celle de *S. suis***

En 2012, une équipe a effectué une comparaison entre toutes les zincs métalloprotéases que possèdent différentes espèces de streptocoques et les 4 métalloprotéases bien connues de *S. pneumoniae* (13). Pour ce faire, cette équipe a réalisé une analyse phylogénétique de la région où il est possible de retrouver la peptidase M26 (Figure 4). Cette étude a été effectuée avec 148 souches différentes, dont 7 souches de *S. suis*. Les résultats obtenus ont permis de classer les différentes métalloprotéases des streptocoques dans 4 groupes phylogénétiques différents (13). Pour ce qui est de *S. suis*, cette équipe a été en mesure de classer les différentes souches analysées dans le groupe appartenant à ZmpC de par l'homologie de leurs séquences. De plus, il est intéressant de noter que le site actif de la métalloprotéase de *S. suis*, qui a déjà été décrite comme étant une IgA protéase (9, 10), est un des sites spécifiques à ZmpC (HEMVH) (13).

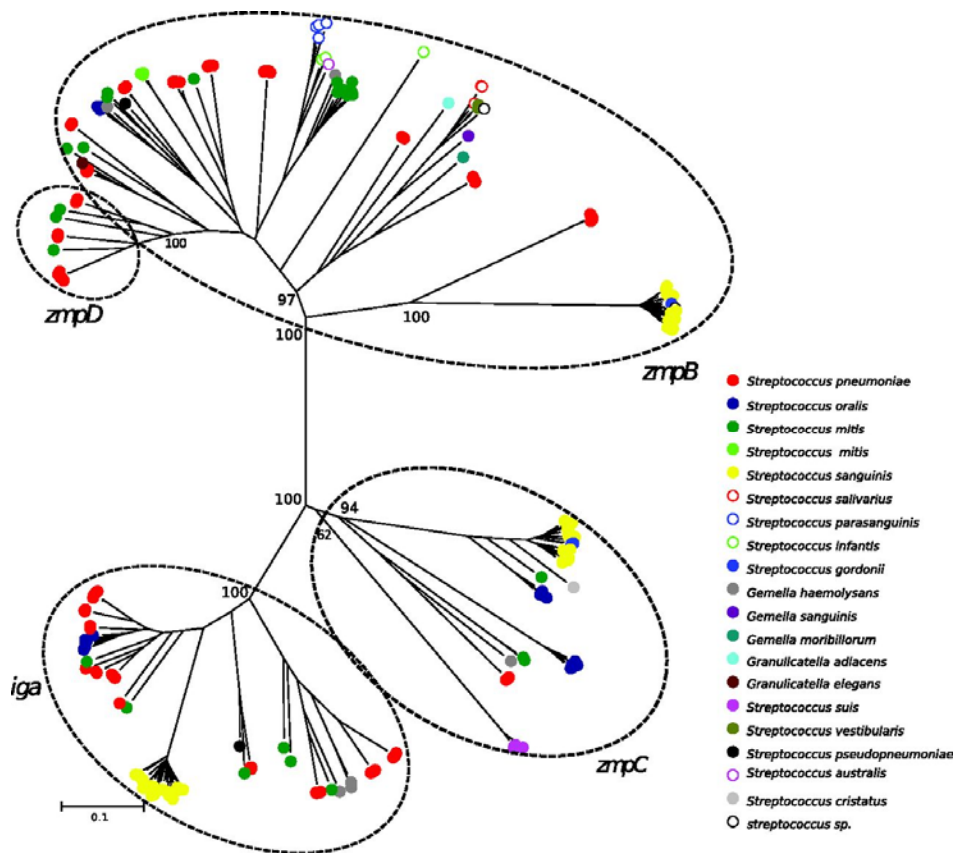


Figure 4. Arbre phylogénétique basé sur les séquences des 4 zinc métallopoteases de *S. pneumoniae*. Figure tirée de (13).

Cette équipe s'est ensuite questionnée sur la capacité de *S. suis* à cliver les IgA<sub>1</sub> humaines. Pour ce faire, ils ont sélectionné 3 souches possédant un gène codant pour une IgA<sub>1</sub> protéase et les ont soumis à un test de clivage des IgA<sub>1</sub> humaines. Par cette expérience, ils n'ont pas été en mesure de démontrer un clivage des IgA<sub>1</sub> par *S. suis*, et ce même à des ratios enzymes-substrats élevés (13). Ce résultat est contradictoire à l'étude précédente sur l'IgA protéase de *S. suis* (9). De plus ceci mène à se questionner à savoir si cette protéine agit bel et bien comme une IgA protéase chez *S. suis* ou si elle n'agirait pas plutôt de manière semblable à la protéine ZmpC de *S. pneumoniae*.



## 4 Réponse immunitaire optimale recherchée dans le développement d'un vaccin contre *S. suis*

### 4.1 Réponse humorale de type 1 et de type 2

Afin de se protéger contre un pathogène, l'hôte développera une réponse immunitaire adaptative qu'elle soit cellulaire ou humorale. Dans le développement d'un vaccin contre un pathogène extracellulaire, c'est plutôt le développement de la réponse humorale qui est visé, via la production d'anticorps spécifiques à l'antigène administré. Cette réponse peut être divisée en 2 grandes catégories, soit une réponse de type 1 ou une réponse de type 2. En effet, différents types d'Ig seront produits chez la souris selon la spécificité et l'efficacité de l'antigène administré (27, 136).

Pour ce qui est de la réponse anticorps de type 1, il y aura production d'IgG2 et d'IgG3 chez la souris. Ces anticorps ont la capacité d'activer la voie classique du complément et participe à l'élimination du pathogène extracellulaire et/ou encapsulé via l'opsonophagocytose (27). En effet, une cellule bactérienne couverte à la fois par des anticorps opsonisants spécifiques et par des molécules du complément sera reconnue par les cellules phagocytaires via des liaisons au récepteur Fc des anticorps et au récepteur du complément, respectivement. Ce faisant, les bactéries pourront être phagocytées et éliminées par l'hôte (136, 137).

Pour sa part, la réponse anticorps de type 2 se traduit principalement par la production d'IgG1 chez la souris. Ces anticorps, considérés comme étant moins protecteurs que les anticorps produits lors de la réponse anticorps de type 1, sont caractérisés par leur capacité d'effectuer le mécanisme de neutralisation. En effet, ces anticorps ont la capacité de lier le pathogène ou encore leur toxine afin de les empêcher de pénétrer dans les cellules de l'hôte (27, 136).

Les réponses de type 1 et 2 n'ont pas encore été bien décrites chez le porc. Cependant, une étude réalisée par Crawley *et al.* a permis de démontrer que les IgG2 ont une meilleure capacité d'activer le complément et sont par conséquent plus opsonisants que les IgG1 (138).

Étant donné que *S. suis* est un pathogène encapsulé, une réponse de type 1 sera recherchée lors du développement d'un vaccin. En effet, il a été démontré que l'hôte se protège principalement d'une infection à *S. suis* via le processus de l'opsonophagocytose (27). Ainsi, lors de la mise au point d'un vaccin, la production d'anticorps de type IgG2 et IgG3 chez la souris et IgG2 chez le porc sera souhaitée. Pour ce faire, le choix de l'adjuvant pourrait être un point déterminant pour orienter le résultat vers la réponse humorale désirée.

## 4.2 Le choix d'un bon adjuvant est crucial

Afin d'obtenir une bonne réponse humorale lors du développement d'un vaccin, le choix de l'adjuvant est essentiel. Les adjuvants sont composés de différentes substances, tels que des sels minéraux, des copolymères synthétiques ou encore des huiles. Bien que les adjuvants sont habituellement classés selon leur nature, il est possible de distinguer 2 grandes catégories d'adjuvants, c'est-à-dire les immunostimulants ou les « véhicules ». En effet, certains adjuvants ont la capacité de se lier directement à des récepteurs retrouvés à la surface des cellules immunitaires (immunostimulant), tandis que d'autres vont plutôt contenir l'antigène et le présenter aux cellules immunitaires (« véhicules ») (139). Sans ces molécules, la réponse immunitaire suite à la vaccination est très faible, ce qui fait en sorte qu'elles sont essentielles au développement d'un bon vaccin en médecine vétérinaire (27, 139). En effet, les adjuvants, en plus d'orienter la réponse vers le type 1 ou le type 2 vont accentuer celles-ci, c'est-à-dire qu'il y aura une plus forte production d'anticorps spécifiques à l'antigène en présence de ces molécules (27, 139). De plus, l'utilisation d'adjuvant, dans le cas de vaccins sous-unitaires (antigène peu immunogène), permet de réduire la quantité d'antigène utilisé et/ou la fréquence à laquelle le vaccin doit être administré (140). Ceci est à prendre en considération, car le développement de vaccins est très coûteux.

Étant donné le rôle des adjuvants dans l'importance de la réponse anticorps, il est important de les comparer entre eux en combinaison avec un antigène donné. Ceci permettra de développer un vaccin qui sera efficace dans la prévention de la maladie. Différentes études de protection chez le porc se sont attardées à comparer l'efficacité de différents adjuvants dans le cas d'une infection à *S. suis*. En effet, il a été démontré dans deux expériences distinctes, que des adjuvants eau-dans-huile, le Specol et le Montanide ISA 50, sont plus efficaces dans

l'activation du système immunitaire, qu'un gel d'aluminium (Alhydrogel) et qu'un adjuvant huile-dans-eau (Montanide ISA 25), respectivement (141, 142). Néanmoins, chacune de ces classes d'adjuvants possède ces avantages et désavantages.

#### **4.2.1 Adjuvants de type huileux**

Les adjuvants de type huileux regroupent les adjuvants à partir desquels une émulsion pourra être réalisée. En effet, la présence d'un agent tensioactif dans ces adjuvants permet de mélanger 2 phases non miscibles. Les adjuvants huileux peuvent également être subdivisés en 2 grandes catégories, soit les émulsions eau-dans-huile et les émulsions huile-dans-eau (139).

Lors d'une émulsion eau-dans-huile, de très fines gouttelettes de l'antigène hydrophile seront englobées dans une phase lipophile continue (huile). Ce faisant, l'antigène pourra être libéré progressivement, tout en étant protégé de la dégradation au site d'injection. De plus, l'huile contenue dans l'émulsion permet d'attirer les cellules du système immunitaire au site d'injection, participant ainsi à la réponse inflammatoire (139). Néanmoins, des lésions peuvent être observées au site d'injection avec ce type d'adjuvant (27).

Quant à elle, l'émulsion huile-dans-eau est plutôt le résultat d'un alliage entre un copolymère et d'une huile non toxique métabolisable. Contrairement aux émulsions eau-dans-huile, ce deuxième type d'émulsion permet l'incorporation plus délicate de l'antigène, le préservant ainsi d'une dégradation involontaire. De plus, plutôt que de demeurer au site d'injection, ce type d'émulsion permet le transport rapide de l'antigène jusqu'aux ganglions lymphatiques. De plus, ces émulsions ont la caractéristique de recruter les cellules présentatrices d'antigène, permettant ainsi de protéger l'antigène qui se retrouvera à l'intérieur des cellules. Il est également important de noter que la réponse humorale obtenue avec ce type d'émulsion varie selon l'adjuvant utilisé (139).

#### **4.2.3 Adjuvant de type copolymère**

Ces copolymères sont habituellement composés de chaînes hydrophiles de polyoxyéthylène et de chaînes hydrophobes de polyoxypropylène. L'avantage d'utiliser ces copolymères est qu'il y a un très grand nombre d'agencements possible, que ce soit différentes

longueurs de chaînes ou différents nombres de répétitions de ces chaînes. Ces polymères sont majoritairement utilisés dans les émulsions huile-dans-eau de la section précédente (139).

### **4.2.3 Adjuvant de type saponine**

Les saponines sont essentiellement naturelles et sont principalement connues pour des applications industrielles. Cependant, le raffinement des méthodes de production a dû être effectué afin d'obtenir des saponines plus pures pour l'utilisation dans le développement de vaccins. Les saponines ont la caractéristique de pouvoir interagir avec le cholestérol, important constituant des parois cellulaires (139). Ce faisant, il y a formation de pores, ce qui pourrait entre autres expliquer les effets observés au site d'injection (27, 139). Les saponines les plus couramment utilisées dans des vaccins induisent une forte production d'IgG2a, anticorps faisant partie de la réponse immunitaire de type 1 (139). Ces saponines pourraient donc être de bons candidats dans le développement d'un vaccin sous-unitaires contre *S. suis*.

### **III- Matériel, Méthodes et Résultats**

## **Characterization of the zinc metalloprotease of *Streptococcus suis* serotype 2**

Audrey Dumesnil<sup>1,2</sup>, Jean-Philippe Auger<sup>1,2</sup>, Nahuel Fittipaldi<sup>3</sup>; Josée Harel<sup>1,2</sup>, Marcelo Gottschalk<sup>1,2,\*</sup>

### **Affiliations:**

<sup>1</sup> Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA)

<sup>2</sup> Groupe de recherche sur les maladies infectieuses en production animale (GREMIP), Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>3</sup> Public Health Ontario Laboratory Toronto, and Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada.

\* Corresponding author. Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal, 3200 Sicotte St., Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada J2S 2M2.

**Running title:** *S. suis* zinc metalloprotease

Sera envoyé au journal Veterinary Research pour publications

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

Je suis première auteure de cet article. J'ai participé activement à la conception, au design et à la réalisation de toutes les expériences. J'ai analysé les résultats et réalisé toutes les figures. J'ai également contribué de façon importante à la rédaction de ce manuscrit.

## **Abstract**

*Streptococcus suis* is an important swine pathogen and zoonotic agent, responsible for meningitis and septic shock. Although several putative virulence factors have been described, the first steps of *S. suis* pathogenesis remains misunderstood. Recently, controversial results had been reported for a *S. suis* serotype 2 zinc metalloprotease concerning its IgA protease activity. More recently, phylogenetic analyses suggested that this protein would be homologous to the ZmpC of *S. pneumoniae*, which does not have an IgA protease activity. Based on the well known functions *S. pneumoniae* metalloproteases (IgA protease and ZmpC), different experiments were carried out with the virulent *S. suis* serotype 2 P1/7 strain to characterize its potential metalloprotease activity: cleavage of human IgA<sub>1</sub>, activation of the matrix metalloprotease 9 (MMP-9), and cleavage of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) and mucin16 (MUC16) ectodomains. Results showed that *S. suis* was unable to cleave human IgA<sub>1</sub>, confirming the lack of IgA protease activity of this pathogen. In addition, *S. suis* was unable to cleave PSGL-1, and activate MMP-9. In contrast, Zmp partially cleaves MUC16 ectodomains. However, the lack of Zmp protein (as tested using Zmp-deficient mutant) did not affect *S. suis* serotype 2 capacity to colonize the upper respiratory tracts of pigs nor its virulence. This could be due to a compensation effect of others *S. suis* virulence factors. These results showed that *S. suis* serotype 2 Zmp protein is not a critical virulence factor. As recently suggested, this emphasized the importance of the confirmation of critical role in virulence by independent research teams.

**Keywords:** *Streptococcus suis*; zinc metalloprotease; IgA protease; controversy; mucine 16; pig

## Introduction

*Streptococcus suis* is a swine pathogen that mainly affects post-weaned piglets and that causes meningitis, arthritis, endocarditis, and sudden death. It represents an important source of economic losses to the porcine industry (1). It is also an emerging zoonotic agent, causing meningitis and septic shock in people associated with the swine/pork industry (Western countries) or the general population (some Asian countries) (1). A total of 35 capsular-based serotypes have been reported for *S. suis*, with certain of these having recently been described as belonging to other bacterial species (2). Of the different serotypes, serotype 2 is the most frequently isolated from diseased pigs and humans worldwide (1). Serotype 2 strains can be further classified into different sequence types (ST) based on the multilocus sequence typing of housekeeping genes. Indeed, most virulent strains isolated in Eurasia belong to ST1, whereas ST25 and ST28 strains, considered as less virulent, are mainly present in North America (3).

The initial mechanisms used by *S. suis* to colonize the host remain poorly known, with the pathogen being able to survive in the tonsils of swine for long periods of time (4). *S. suis* has been described to colonize and interact with epithelial cells and mucus of the host upper respiratory tract in order to reach the bloodstream, where it resists phagocytosis and killing (4). Replication in blood and systemic dissemination may then allow *S. suis* to invade the central nervous system and cause meningitis (5). Over the years, different bacterial components have been suggested to be involved in the *S. suis* pathogenesis, including the capsular polysaccharide, suilysin, extracellular factor, and muramidase released-protein (6). However, there is still a high level of controversy regarding the role of *S. suis* so-called critical virulence factors (6).

Immunoglobulin As (IgAs) are the predominant immunoglobulin class produced by mucosa-associated lymphoid tissues. They may prevent the adhesion of microorganisms to epithelial cells and facilitate their elimination from the host (4). In the case of *S. suis*, the secretion of an active human IgA<sub>1</sub> protease, encoded by the *iga* gene, has been reported in a serotype 2, ST7 strain (7). The decreased lethality and the absence of blood bacterial loads in pigs following intranasal inoculation of the  $\Delta$ *iga* mutant strain suggested that mucosal IgAs play a crucial role in resistance to *S. suis* invasion and dissemination in the host (7). Consequently, presence of a protein possessing an IgA protease activity could allow *S. suis* to avoid being eliminated by



mucosal antibodies and subsequently colonize and invade host epithelial cells more easily (7, 8). However, in healthy animals, the presence of specific or cross-reactive IgAs against *S. suis*, which might explain the lack of virulence of such a mutant, have not yet been proven (4). In addition, not only do these results remain to be confirmed, but an actual IgA protease activity by *S. suis* is controversial (4). Indeed, in subsequent study, no IgA protease activity could be observed when using different *S. suis* strains (9).

Interestingly, the IgA protease belongs to the zinc metalloprotease family (Zmp) that possess different activities (9). In fact, Zmp have been well described in *Streptococcus pneumoniae* and are classified in four distinct groups: ZmpA (IgA protease), ZmpB, ZmpC, and ZmpD (9). Similarly to the zinc metalloproteases of *S. pneumoniae*, the *S. suis* Zmp is a membrane protein attached by a LPXTG-anchored motif that possesses G5 tandem repeats and a M26 protease active site. This active site is characterized by a HEMVH motif, which is a key characteristic of the *S. pneumoniae* ZmpC protein (7, 9). In accordance, phylogenetic studies have classified the *S. suis* Zmp protein as an homologue of the *S. pneumoniae* ZmpC protein based on genomic sequence similarities (9). Importantly, the gene encoding the Zmp protein was found to be present in many of the 300 *S. suis* genomes analyzed in a recent study (10).

Although an IgA protease activity has been linked to *S. suis* Zmp protein, the latter can also be involved in some other functions, as reported with *S. pneumoniae*. Indeed, *S. pneumoniae* ZmpC protein possess well-described functions, such as activation of the matrix metalloprotease 9 (MMP-9) and cleavage of the P-Selectine glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) and mucine 16 (MUC16) ectodomains (9). Consequently, given the genetic similarities between the *S. suis* Zmp protein and the *S. pneumoniae* ZmpC protein, and the multiple functions possessed by the latter, it is possible that the *S. suis* Zmp could have an important impact on the first steps of *S. suis* pathogenesis. Moreover, some of these functions could also play important roles in invasion of the central nervous system (11). However, the actual role of the *S. suis* Zmp protein in these functions has not yet been evaluated.

In the present study, the function of *S. suis* Zmp protein was characterized and its impact on virulence evaluated. Results showed that neither *S. suis* itself nor its Zmp protein are able to

cleave human IgA<sub>1</sub>, PSGL-1 ectodomains or activate MMP-9. However, Zmp is responsible, at least in part, of the *S. suis* cleavage of MUC16 ectodomains, though this activity does not appear to have a critical impact on *S. suis* serotype 2 colonization of the upper respiratory tract/virulence, as shown by experimental infection of pigs.

## **Materials and methods**

### **Bacterial strains, plasmids, and growth conditions**

The strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. The virulent *S. suis* serotype 2 strain P1/7 was used for the construction of an isogenic *zmp*-deficient mutant. The *S. pneumoniae* strain TIGR4 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) was used as a positive control for activation and cleavage assays. For all experiments, streptococci were grown in Todd-Hewitt broth (THB) or agar (THA) (Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) until exponential growth phase at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. *Escherichia coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth or agar (Becton-Dickinson) at 37 °C. When needed, antibiotics were added to the culture media at the following concentrations: for *S. suis*, spectinomycin (Sp) at 100 µg/mL; for *E. coli*, kanamycin at 25 µg/mL and ampicillin, spectinomycin, and carbenicillin at 50 µg/mL (Sigma, Oakville, ON, Canada).

### **DNA manipulations**

*S. suis* genomic DNA was extracted using InstaGene Matrix solution (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA). Recombinant plasmids were obtained using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen, Valencia, CA, USA). Restriction and DNA-modifying enzymes were purchased from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada) and used according to the manufacturer's recommendations. Oligonucleotide primers (listed in Table 2) were obtained from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). Polymerase chain reactions (PCR) were carried out using the iProof high-fidelity DNA polymerase (BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) or the Taq DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Amplification products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and sequenced with an ABI 310 automated DNA sequencer and the ABI PRISM dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### **Construction of the *S. suis zmp*-deficient ( $\Delta zmp$ ) mutant**

Precise in-frame deletion of the *zmp* gene was achieved using splicing-by-overlap-extension PCR (12). Overlapping PCR-products generated by PCR were cloned into the 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 p $\Delta zmp$  mutation vectors.

Final constructions of pSET4s vector were electroporated into competent *S. suis* cells using 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 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 the 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 gene was confirmed by PCR and sequence analysis. mRNA expression of upstream (*gnt*) and downstream (*uvrB*) genes flanking the *zmp* gene in the mutant strain were evaluated by RT-PCR.

Absence of Zmp expression in the  $\Delta zmp$  mutant was confirmed by immunoblot. Centrifugation of a 10 mL overnight culture was performed and bacterial samples were mixed with denaturing electrophoresis buffer and boiled for 5 minutes. Samples were then separated using 7.5% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Western blotting was carried out as previously described (13), using antisera from rabbits immunized with the recombinant Zmp protein (see below). The expression of a capsular polysaccharide (already described as a major virulence factor (14)) was confirmed the hydrophobicity test and by the coagglutination test using serotype 2 antiserum as previously described (15).

### **Expression and purification of the recombinant Zmp protein**

The region corresponding to the *zmp* gene, excluding the cell wall anchoring LPVTG domain, was amplified by PCR and directly cloned into the pET101 vector (Invitrogen), which possess a C-terminal His-tag, according to the manufacturer's instructions. Protein production was induced in the *E. coli* BL21 (DE3) strain using 0.5 mM IPTG for 4 h after which cells were lysed by sonication. The cell lysates were purified by affinity chromatography using the His-Bind Resin Chromatography Kit (Novagen, Madison, WI, USA) according to manufacturer's instructions and dialysed. Protein purity was confirmed by SDS-PAGE and Western blot using an anti-His-tag antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The purified protein was concentrated using Amicon Ultra-15 (Millipore, Billerica, MA, USA) and protein quantification

was evaluated using the Pierce Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Thermo Scientific). A mono-specific polyclonal hyperimmune serum was then produced in rabbits using the purified Zmp protein as previously described (16).

### **IgA protease cleavage assay**

The IgA protease cleavage assay was performed as previously described with some modifications (9, 17). Briefly, 5 µg human myeloma IgA<sub>1</sub> (Calbiochem/EMD Millipore, San Diego, CA, USA) were incubated with the purified Zmp protein or live washed non-concentrated *S. pneumoniae*, that correspond to 1x10<sup>8</sup> CFU/ml or *S. suis* bacteria or bacterial supernatants, both either non-concentrated (equivalent to 1x10<sup>8</sup> CFU/ml) or concentrated (3x or 10x) for 16 hours at 37 °C. Bacterial supernatants were filtrated and concentrated using the Thermo Savant DNA120 Speedvac (Thermo Fisher). Samples were then separated on 7.5% SDS-PAGE in denaturing conditions and transferred onto nitrocellulose membrane (Bio-Rad). The size of uncleaved and cleaved human IgA<sub>1</sub> was detected using Western blot with mouse monoclonal B3506B4 anti-human IgA<sub>1</sub> Fc horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies diluted 1:500 (Abcam, Cambridge, MA, USA) and detected using HyGLO Chemiluminescent HRP Antibody Detection Reagent (Denville Scientific, Metuchen, NJ, USA).

### **Activation of matrix metalloprotease-9**

MMP-9 activation assay was performed as previously described with some modifications (9, 17). Briefly, 10 ng of recombinant human pro-enzyme MMP-9 (Calbiochem/EMD Millipore) were incubated with the purified Zmp protein or *S. suis* as described above for 1 to 2 hours at 37 °C. *S. pneumoniae* was used as a positive control. Samples were then separated on 10% zymogram gels containing gelatin B (Sigma) in non-denaturing conditions. Results were visualized after Coomassie Blue R250 staining (Bio-Rad).

### **Cleavage of P-selectin glycoprotein ligand-1 ectodomains**

The PSGL-1 cleavage assay was performed as previously described with some modifications (18). Briefly, 10 ng of recombinant human PSGL-1/CD162 Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) were incubated with the purified Zmp protein or *S. suis* as described above for 15 to 60 minutes at 37 °C. *S. pneumoniae* was used as a positive control. Samples were then separated

on 7.5% SDS-PAGE in denaturing conditions and transferred on polyvinyl difluoride (PVDF) membrane (EMD Millipore). The size of cleaved and uncleaved human PSGL-1/Fc was detected using Western blot with mouse monoclonal anti-human CD162 antibodies, clones KPL-1 and PL2, diluted 1:1000 (Becton-Dickinson Biosciences; MBL International Corporation, Woburn, MA, USA) and horseradish peroxidase conjugate (HRP) goat anti-mouse antibodies (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Detection was made using HyGLO Chemiluminescent HRP Antibody Detection Reagent (Denville Scientific).

### **Cleavage of mucin-16 ectodomains**

The MUC16 ectodomain cleavage assay was performed as previously described with some modifications (19, 20). The HeLa (CCL-2) cell line was obtained from the ATCC and incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. Once confluent, cells were trypsinized, transferred to 24-well tissue culture plates (Costar) at a concentration of 7.5x10<sup>4</sup> cells/mL, and further incubated to confluence (2 to 3 days = approximately 10<sup>5</sup> cells/well) (21). Cells were then washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) before being treated with *S. pneumoniae* or *S. suis* strain P1/7 as described above. In a parallel study, *S. suis*  $\Delta zmp$  concentrated supernatants (3x) supplemented or not with 100 µg of purified Zmp protein were also tested. Cells were incubated for 4 h at 37 °C, after which supernatants were recovered and concentrated two-fold using the Thermo Savant DNA120 Speedvac (Thermo Fisher). Cleaved MUC16 ectodomains were determined using DOT-blot on nitrocellulose membrane with 1:100 mouse anti-human CA125 antibody (M11) (Thermo Fisher) and a 1:4000 HRP conjugated goat anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch). Detection was made using the HyGLO Chemiluminescent HRP Antibody Detection Reagent (Denville Scientific) and the signals were analysed using ImageJ.50i software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

### **Evaluation of the colonization capacity and virulence of the *S. suis* $\Delta zmp$ in a porcine model of infection**

All experiments involving animals were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals by the Animal Welfare Committee of the University of Montreal, which approved the protocols and procedures used herein (permit number RECH-

1570). Four-week old piglets from a herd with no recent cases of *S. suis* disease were used. The 12 pigs were randomly separated into two rooms upon arrival (n=6) and the trachea and tonsils were swabbed to confirm absence of serotype 2 European-like strains using a multiplex PCR targeting the *epf* and *cps2j* genes (22). The *epf* gene is normally absent in North American serotype 2 strains (3). The *S. suis* wild-type strain P1/7 and  $\Delta zmp$ -deficient mutant were cultured as previously described (23) to obtain a final concentration of  $2 \times 10^{10}$  CFU/mL. Intranasal infections were carried out as previously described with some modifications (24). Pigs were inoculated with 2 mL of 1 % acetic acid per nostril 2 h prior to infection with 2 mL per nostril of either the wild-type or the  $\Delta zmp$  mutant strain. Trachea and tonsils were swabbed using a catheter (Medline, IL, USA) or a brush (Medical Packaging Corporation, Camarillo, CA, USA), respectively, just before infection and 24 h after infection, and every 2 days thereafter. Samples were placed in sterile tubes containing PBS supplemented with 0.1 % bovine serum albumin and immediately cultured. Serial dilutions ( $10^0$ - $10^{-6}$ ) were plated on Colombia Agar (Oxoid, Hampshire, UK) supplemented with 5 % defibrinated sheep blood (Cedarlane, Burlington, ON, Canada), and *Streptococcus* Selective Reagent SR0126 (Oxoid). After incubation for 18 h at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub>, plates containing 30-300 colonies were selected. Suspected alpha-hemolytic colonies were enumerated and 10 *S. suis*-like colonies/plate were sub-cultured in order to perform the *epf* and *cps2j* multiplex PCR (22).

Clinical signs of the pigs were monitored throughout the experiment. Nine days post-infection, remaining animals were euthanized. Liver, spleen and brain samples were collected upon euthanasia. All samples were evaluated for the carriage of *S. suis* serotype 2 *epf*<sup>+</sup> as described above. *S. suis* serotype 2 strains recovered from euthanized animals infected with the mutant strain were monitored for absence of the *zmp* gene.

### **Statistical analyses**

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Significant differences were determined using the t-test, Mann-Whitney Rank sum test or one way ANOVA, where appropriate. Each test was repeated in at least three independent experiments. A  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### Characterization of the Zmp-deficient *S. suis* mutant

A Western blot using a rabbit anti-Zmp serum confirmed production of the Zmp protein in the *S. suis* wild-type strain P1/7, which was abrogated following in-frame deletion of the *zmp* gene in the mutant strain (Figure 1). Moreover, the gene deletion had no impact on the growth of the mutant in comparison with the wild-type strain (results not shown). mRNA expression of upstream (*gnat*) and downstream (*uvrB*) genes flanking the *zmp* gene were not affected by the in-frame deletion in the mutant strain (supplementary Figure 1). The  $\Delta zmp$  strain was shown to be well-encapsulated by the hydrophobicity test and the clear positive reaction by coagglutination by using serotype 2 anti-serum (results not shown).

### *S. suis* is unable to cleave human IgA<sub>1</sub>

In a previous study, an IgA protease activity was previously suggested for *S. suis*. In order to confirm the capacity of *S. suis* to cleave IgAs, the purified Zmp protein, bacterial strains or bacterial supernatant (either non-concentrated or concentrated 3x or 10x) were incubated with human IgA<sub>1</sub>. For *S. pneumoniae* strain TIGR4, used as a positive control, an IgA protease activity was clearly observed (Figure 2). However, *S. suis* (for both whole live washed bacteria and 10x culture supernatant) was unable to cleave human IgAs. Alongside, different concentrations of the purified Zmp protein (1, 10, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were also unable to cleave human IgAs (Figure 2).

### *S. suis* does not activate MMP-9

To assess the capacity of *S. suis* to activate MMP-9, the enzyme proform was incubated with the purified Zmp protein, bacteria or bacterial supernatant (either non-concentrated or concentrated 3x or 10x). MMP-9 activation was then visualized using gelatin B zymogram, wherein absence of color after Coomassie staining indicates the presence of a gelatinase activity. As observed in Figure 3, *S. pneumoniae* strain TIGR4, used as a positive control, was able to activate MMP-9 since an additional band corresponding to the gelatinolytic activity appeared on the gel. However, no activation of MMP-9 was observed for *S. suis* (with either whole live washed bacteria or 10x bacterial supernatant) or with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of purified Zmp protein (Figure 3).



### ***S. suis* is unable to cleave PSGL-1 ectodomains**

In order to evaluate the capacity of *S. suis* to cleave PSGL-1 ectodomains, the purified Zmp protein, whole bacteria or bacterial non-concentrated and concentrated supernatants were incubated with PSGL-1/fc. To visualize this cleavage, two different antibodies were used, whether KPL-1 and PL-2, which recognize the N-terminal epitope on PSGL-1 and a membrane-proximal epitope, respectively (25). As expected (18), the *S. pneumoniae* strain TIGR4, used as a positive control, was able to cleave PSGL-1 ectodomains. Indeed, the reactivity of KPL-1 antibody with PSGL-1/fc diminished as a result of the N-terminal epitope of PSGL-1/fc being cleaved (Figure 4A). Meanwhile, PL2 still recognized the degradation products of PSGL-1/Fc (Figure 4B). This was expected since the *S. pneumoniae* ZmpC removes the N-terminus of PSGL-1, required for recognition by KPL1 with PSGL-1/Fc since KPL1 recognizes an N-terminal epitope on PSGL-1 (25). On the other hand, PL2 can still recognize multiple degradation products between 150 kDa and 25 kDa since it recognizes a membrane-proximal epitope (25). Different concentrations of bacteria and bacterial supernatants as well as purified Zmp protein were unable to cleave PSGL-1 ectodomains (Figure 4).

### **Zmp is partially implicated in the capacity of *S. suis* to cleave MUC16 ectodomains**

HeLa cell treated with the *S. pneumoniae* non-concentrated supernatant and *S. suis* bacteria or bacterial supernatants (either non-concentrated or 3x or 10x) were used to perform MUC16 ectodomain cleavage assay. All experiments involving bacteria (non-concentrate, 3x, 10x) or bacterial supernatant at 10x were toxic for the cells (data not shown). As shown in Figure 5A, both *S. pneumoniae* non-concentrated supernatant and *S. suis* strain P1/7 supernatant (concentrated 3X) cleaved MUC16 ectodomains. However, Zmp cleavage of MUC16 ectodomains by *S. suis* culture supernatant seems to be less than that of *S. pneumoniae* considering that there is no activity in *S. suis* non-concentrated supernatant (Figure 5B). Furthermore, the deletion of the *zmp* gene significantly decreased the ability of *S. suis* concentrated supernatant to cleave MUC16 ectodomains ( $p < 0.05$ ). However, *S. suis* purified Zmp protein is not able to cleave MUC16 ectodomains when used alone. Meanwhile, complementation of the *S. suis* $\Delta$ *zmp* supernatant by the addition of 100  $\mu$ g of purified Zmp protein restored the wild-type phenotype. Residual MUC16 ectodomain shedding capacity when

using the *S. suis* $\Delta$ *zmp* supernatant suggests that there are other factors potentially responsible for cleavage by *S. suis*.

### **Zmp is not implicated in colonization of the upper respiratory tract of pigs nor in virulence**

Considering the presence of MUC16 in the upper respiratory tract of pigs, the role of Zmp in the pathogenesis of the *S. suis* serotype 2 infection, more particularly in colonization, as well as its role as a virulence factor were evaluated using an intranasal piglet model of *S. suis* infection (24). Animals were divided into two groups and infected with either the wild-type strain P1/7 or its *zmp*-deficient mutant. All animals were negative for European-like *epf* positive *S. suis* serotype 2 strains prior to challenge. After infection, PCR tests showed the presence of *S. suis* serotype 2 ST1 strains in infected animals. Indeed, as illustrated in Figure 6A, tonsil colonization began 24 h post-infection in half of the mutant-infected pigs. Meanwhile, tonsil colonization appears to be delayed in the wild-type-infected group where evidence of *S. suis* serotype 2 ST1 presence was observed as of 3 days post-infection. Animals infected with the wild-type strain seem to clear the pathogen more easily given that only two animals were still positive for *S. suis* serotype 2 ST1 presence at day 7. As demonstrated in Figure 6B, *S. suis* serotype 2 ST1 was present in the trachea of almost all infected animals and remained present until day 9. Only one animal was negative throughout the experiment, with the exception of day 7, in the mutant-infected group. However, no significant differences were observed between the wild-type-infected and mutant-infected piglets in both the tonsils and trachea (Figure 6A et 6B).

In addition, results showed no differences in virulence, since several animals presented severe clinical signs such as arthritis, depression, and meningitis in both groups (Table 3). Indeed, 33% of piglets in both groups succumbed to infection (Figure 7). Presence of the *zmp* gene was evaluated in the organs of euthanized animals in order to confirm that there was no reversion of the mutant to the wild-type genotype *in vivo*. Results showed that the *S. suis* serotype 2 bacteria recovered in the liver, spleen, and brain of animals infected with the mutant strain remained negative for the *zmp* gene (data not shown).

## Discussion

*S. suis* is an important swine pathogen and a zoonotic agent. Over the years, an important number of virulence factors have been described to be involved in the first steps of *S. suis* pathogenesis. Moreover, many of them have been described as “critical” virulence factors through results obtained with isogenic mutants. However, the real meaning of the role of all these “critical” factors is still lacking and led to controversies in literature (6).

Zinc metalloproteases have been well-described in *S. pneumoniae* in the past with regards to both their structure and their functions. Though there are many similarities among them, *S. pneumoniae* zinc metalloproteases have been divided into three distinct genomic clusters: ZmpA (an IgA protease), ZmpB, and ZmpC and ZmpD (9). Secretory IgA play an important role in the immunologic defense of respiratory and other mucosal surfaces in the body (4), with IgA1 representing 90% of the IgA within the human respiratory tract (26). However, cleavage of secretory IgA by bacterial proteases might interfere with such defense. Indeed, IgA1 proteases have been regarded as virulence factors of a variety of pathogens (26-28). An IgA protease, with active cleavage effect on human IgA1, has indeed been previously described as being produced by a virulent strain of *S. suis* (7). In addition, an isogenic mutant lacking the gene previously considered to be responsible for the IgA protease activity was shown to be significantly less virulent than the wild type strain, suggesting a critical role of this protease *in vivo* (29). Unfortunately, in the latter study, the lack of IgA protease activity of the mutant, in comparison with the wild-type strain, was not tested (29). Finally, the IgA protease has also been suggested to be 100% protective in a systemic model of infection in mice (30). However, this protection would not be associated with the protease activity (30). More recently, in a comparative study using different streptococci, Bek-Thomsen *et al.* reported a lack of IgA protease activity of seven strains of *S. suis* included in their study (9). Consequently, given the controversy surrounding the activity of this metalloprotease in *S. suis*, the capacity of *S. suis* serotype 2 strain P1/7 (ST1) to degrade human IgA<sub>1</sub> was evaluated in the present study. Our results confirmed previous results with the same strain (7) showing a total absence of IgA protease activity of both, *S. suis* (non-concentrated or concentrated live washed bacteria/bacterial supernatants) and the cloned and purified protein. In the present study we used the reference strain P1/7 (ST1) and we confirmed negative results reported by Bek-Thomsen *et al.* (9). Interestingly, the original study

where the protease activity was described, Zhang et al. (7) used the highly virulent serotype 2 ST7 clonal strain responsible for the 2005 human outbreak in China (31). Although the latter strain is not representative of typical *S. suis* strains since it possesses a pathogenicity island that confers unique properties (32), we confirmed the absence of human IgA<sub>1</sub> protease activity also with the strain SC84, which is also an ST7 strain isolated in the 2005 clonal outbreak strain (33). Indeed, these results also confirm the larger controversy about *S. suis* critical virulence factors (6, 34).

As mentioned above, and in addition to the zinc metalloprotease with an IgA activity (ZmpA), other proteins with different functions and belonging to this family have been described in *S. pneumoniae* (9). Previous phylogenetic studies suggested that the *S. suis* Zmp homologue belongs to the ZmpC subgroup (9). Comparison of the *S. suis* serotype 2 Zmp protein sequence with those of *S. pneumoniae* ZmpA, ZmpB, and ZmpC showed 32%, 30%, and 42% of homology, respectively (data not shown). Moreover, the *S. suis* Zmp protein was also previously described to possess a HEMVH motif in its active site, which corresponds to that of the ZmpC (7, 9). Regardless of these genetic similarities between the *S. suis* serotype 2 Zmp protein and the *S. pneumoniae* ZmpC protein and that numerous functions have been attributed to the latter, the specific properties and functions of the *S. suis* Zmp protein remained unknown. Indeed, *S. pneumoniae* ZmpC has been shown to activate MMP-9 and to cleave both PSGL-1 and MUC16 ectodomains (17, 18, 20). Consequently, a *S. suis* *zmp*-deficient mutant was herein obtained and the recombinant Zmp protein purified in order to evaluate the functions of this protein in the *S. suis* pathogenesis of the infection.

First, the role of the *S. suis* Zmp the activation of MMP-9 by cleaving the pro-form was evaluated (17). Of the different MMPs described, MMP-9 has been largely associated with the disruption of barriers that separate the central nervous system (CNS) from the systemic compartment, whether the blood-brain barrier and the blood-cerebrospinal fluid barrier (11). Given that one of the most important pathologies caused by *S. suis* in diseased pigs is meningitis, MMP-9 could play an important role in the infection (1). Indeed, previous studies have demonstrated that *S. suis* serotype 2 induces the production of MMP-9 from macrophages, and it was suggested that this production might help the pathogen to invade the CNS (35, 36).

However, the bacterial factors or components responsible for this activation of MMP-9 still remain unknown. Unfortunately, results obtained in this study demonstrate that *S. suis* as well as the purified Zmp protein do not activate the pro-enzyme form of MMP-9, at least in the conditions tested. Given those results, MMP-9 activation described in macrophages could result from an internal control by the host. Indeed, cells can produce MMP-3, plasmin and elastase which would activate MMP-9, which could help the host to clear the infection via the recruitment of more phagocytic cells to the site of infection. These cells will be able to help in extracellular matrix regeneration and epithelium remodeling in an attempt to clear the pathogen from the host (37, 38).

We then decided to look for another described role for the *S. pneumoniae* ZmpC protein, the ability to cleave the PSGL-1 ectodomains (18). PSGL-1 is an important molecule expressed at the surface of certain immune cell types such as macrophages and neutrophils. During stress conditions, PSGL-1 will bind the P-selectin at the surface of endothelial cells, which will subsequently allow the diapedesis of cells from the blood vessels to the infection sites (39). Consequently, PSGL-1 plays an important role in inflammation and clearance of infection. Numerous pathogens have thus developed strategies to outmaneuver the immune system, including cleavage of PSGL-1 (39). Indeed, *S. pneumoniae* ZmpC is a known inhibitor of PSGL-1, preventing the diapedesis of immune cells to the infection sites, helping the pathogen to colonize the host (18). Regardless of this evasion strategy being important for certain pathogens, results obtained in this study showed that *S. suis* serotype 2 is unable to cleave PSGL-1 ectodomains and that unlike the *S. pneumoniae* ZmpC protein, the *S. suis* Zmp protein does not possess PSGL-1 ectodomain cleavage properties.

Given the negative results obtained for *S. suis* and its Zmp protein regarding the two above mentioned functions attributed to ZmpC (MMP-9 activator, and PSGL-1 ectodomain cleavage), the third and last target remaining was evaluated, whether an ability to cleave MUC16 (19, 20). MUC16 is a membrane-associated mucin that is part of the epithelial barrier. This mucin is found, among other mucosal surfaces, at the respiratory tract levels of mammals (40), helping to prevent adhesion to and invasion of underlying host epithelial cells (41). *S. pneumoniae*, via its ZmpC protein, could be able to permeabilize the epithelial barrier by the cleavage of MUC16

ectodomains, allowing the pathogen to colonize more easily epithelial cells of the host (19, 20). In this study, experiments using the epithelial HeLa cells demonstrated that *S. suis* serotype 2 liberates the MUC16 ectodomains and that this function is Zmp-dependant. However, the observed activity seems to be of lower intensity than that of *S. pneumoniae*, since different from the latter, the *S. suis* supernatant induced such an effect only after being concentrated. Moreover, results also showed that the purified *S. suis* Zmp protein requires a co-factor located in the *S. suis* supernatant in order to be active. This co-factor could be a potential ion or protease found in *S. suis* supernatant and further studies will be needed to evaluate these theories. Interestingly, the residual shedding activity observed using the *S. suis*  $\Delta zmp$  strain suggests that other *S. suis* serotype 2 factor(s) could also possess this activity. Indeed, *S. suis* have numerous virulence factors described with redundant functions that could compensate the loss of another factor. For example, 18 different bacterial components have been described in *S. suis* as fibronectin-binding proteins (5). This current study is the first to show a *S. suis* capacity to cleave MUC16 ectodomains. This could play an important role in *S. suis* adhesion to and invasion of epithelial cells, as it was shown for *Staphylococcus aureus* (42).

Taken together, these functionality results demonstrate that unlike with the *S. pneumoniae* ZmpC protein, the *S. suis* serotype 2 Zmp protein does not possess all the same functions. This could be possibly explained by the differences in amino acid sequences between both proteins and/or a lower expression of the protein. However, the lack of certain functions attributed to ZmpC does not necessarily mean that the *S. suis* serotype 2 Zmp protein lack other yet unknown functions. Consequently, further studies will be required in order to evaluate other potential roles and functions of this *S. suis* protein.

Given that *S. suis* cleaved MUC16 ectodomains and the fact that the Zmp protein would play an important role in this function, its role in the colonization of the upper respiratory tract of pigs, an important initial step of *S. suis* pathogenesis, was evaluated. As such, pigs were challenged via the intranasal route with either the wild-type or mutant strain. Regardless of its role in MUC16 ectodomain cleavage *in vitro*, no difference was observed between the wild-type and the *zmp*-deficient mutant strains in the colonization of tonsils and trachea by *S. suis*. This lack of role in colonization might be explained by the concept of bacterial redundancy, which is very

common in *S. suis* (6). Actually, this result is not necessarily surprising given the number of virulence factors expressed by *S. suis* serotype 2 that have been reported to be implicated in colonization of the upper respiratory tracts of pigs, including adhesins and toxins. Indeed, around 40 different factors had been described to be involved in *S. suis* colonization steps (5).

In a previous study, an isogenic mutant derived from *S. suis* serotype 2 ST7 strain was characterized as being an important and a critical virulence factor, using an intranasal model of infection in pigs (29). In the present study, and using an identical isogenic mutant derived from a *S. suis* serotype 2 strain ST1 and a highly similar infection model, we could not reproduce such results. Indeed, virulence of both wild-type and *zmp*-deficient mutant was very similar. In agreement, absence of ZmpC from *S. pneumoniae* was demonstrated not to impact strain virulence in a mouse model of infection using the intranasal route of infection (17, 43). Meanwhile, following a systemic infection, mice infected with the *S. pneumoniae zmp*-deficient mutant succumbed faster to infection than those infected with the wild-type strain, suggesting that ZmpC could play a role in the control of the infection (44). This does not seem to be the case with *S. suis*, since no difference in virulence could be observed after intraperitoneal infection of mice with both, wild-type and *zmp*-deficient mutant strains (results not shown).

As a conclusion, a human IgA<sub>1</sub> protease activity could not be confirmed to be present in *S. suis* serotype 2 strains. Indeed, the *S. suis* metalloprotease hypothetically responsible for such activity would rather belong to the category of ZmpC, as that reported for *S. pneumoniae*. Of the different functions described for such a protein in the latter pathogen, that of *S. suis* would so far be responsible for a partial ability to cleave MUC16. The presence of this protein would, however, not be critical to colonization of the upper respiratory tract. In addition, and in disagreement to what was previously described, this protein would not be a critical virulence factor. These results further emphasize, as recently suggested, the need of confirmation of a critical role in virulence of reported candidates by independent laboratories (6, 34).

**Declaration****Abbreviation**

Zmp: zinc métalloprotease; IgAs : Immunoglobulin As; MMP-9: Matrice métalloprotease 9; PSGL-1: P-Selectine glycoprotein ligand-1; MUC16: mucin 16; BCA: bicinchoninic acid; PBS: phosphate-buffered saline; pi: post-infection; SEM: standard error of the mean; ST: sequence type; THB: Todd Hewitt broth; THA: Todd Hewitt agar; LB: Luria -Bertani, Sp: spectinomycin; IPTG: Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside;

**Ethics approval**

All experiments involving animals were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals by the Animal Welfare Committee of the University of Montreal, which approved the protocols and procedures used herein (permit number RECH-1570). A total of 12 pigs were used in this study.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Availability of data and materials**

The data and materials not presented in this manuscript are available from the corresponding author upon request.

**Competing interests**

No competing interests to declare.

**Funding**

This study was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant #04435) to MG. JPA is the recipient of an Alexander Graham Bell Graduate Scholarship – Doctoral Program from NSERC.

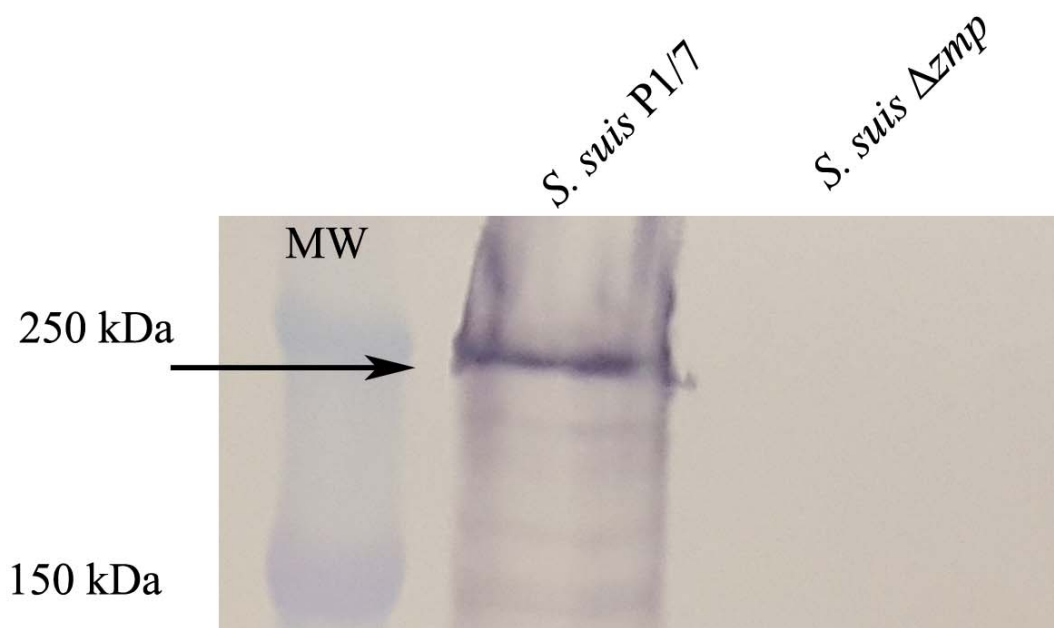


**Author's contribution**

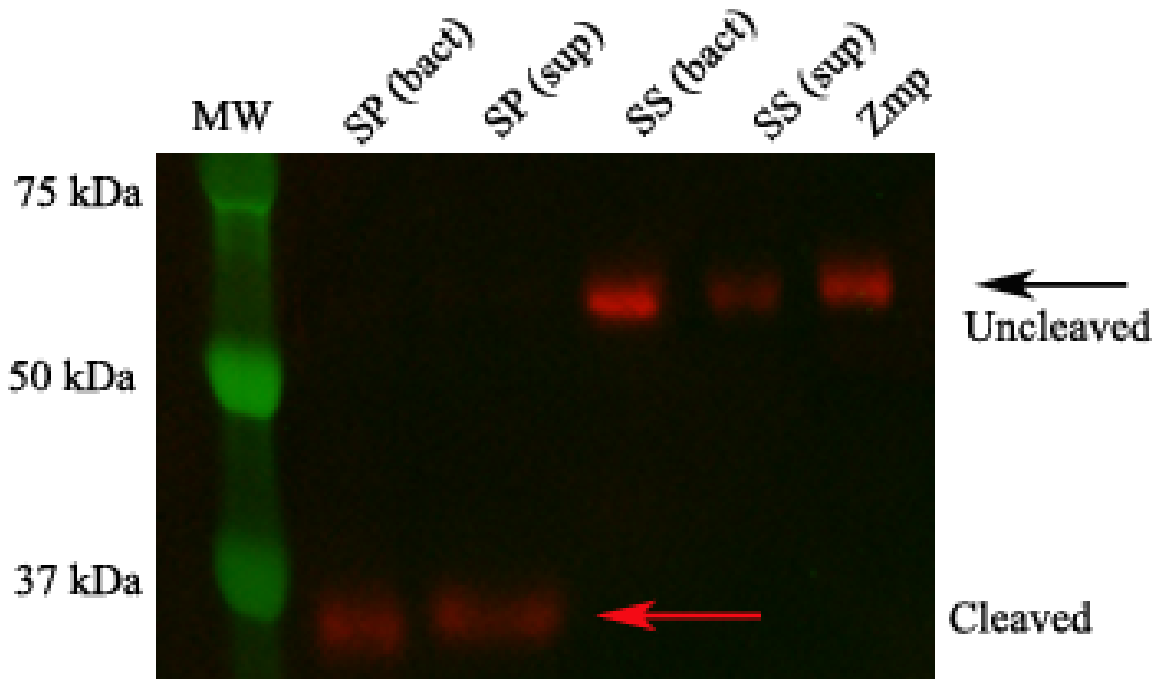
Conception of the work: AD, NF, JH, MG; laboratory techniques: AD, JPA; acquisition, analysis and interpretation of data: AD, JPA, NF, JH, MG; preparation of the manuscript: AD, MG. All authors have read and approved this manuscript.

**Acknowledgments**

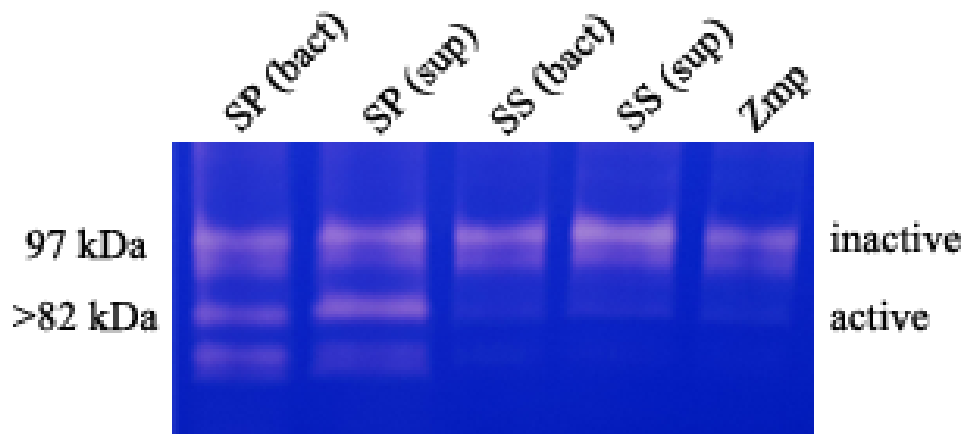
The authors would like to thank Sonia Lacouture (University of Montreal) for invaluable technical assistance.



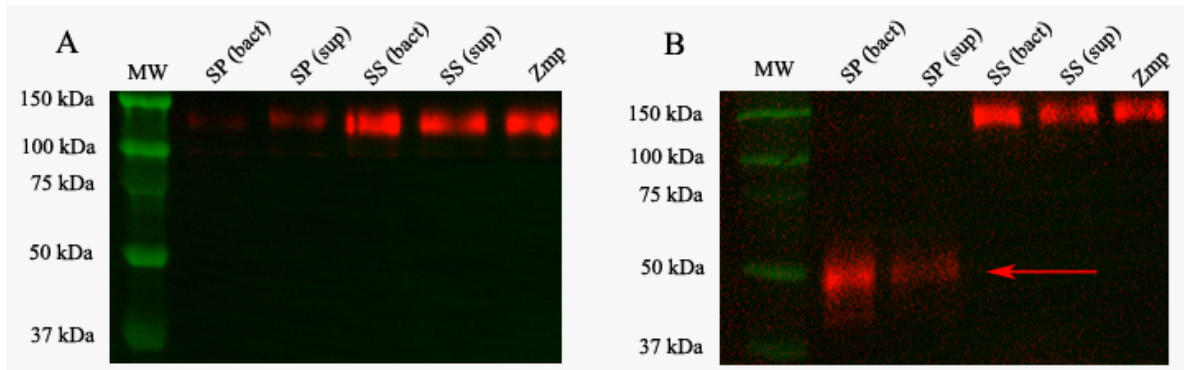
**Fig. 1. Expression of the *S. suis* Zmp protein is abrogated in the *zmp*-deficient mutant.** Culture supernatants of the *S. suis* wild-type strain P1/7 (lane 1) and *zmp*-deficient mutant ( $\Delta zmp$ ) (lane 2) were separated by SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. The Zmp protein was detected using a rabbit antiserum against Zmp.



**Fig 2. *S. suis* is unable to cleave human IgA<sub>1</sub>.** Purified Zmp protein (100 µg/mL), live washed bacteria (bact) or bacterial supernatant (sup; 10x) from *S. suis* (SS) or non-concentrated *S. pneumoniae* (SP) in exponential growth phase were incubated with human IgA<sub>1</sub> for 16 h and the reactions separated by SDS-PAGE. Cleaved IgA<sub>1</sub> (red arrow) by live washed *S. pneumoniae* bacteria or bacterial supernatant (lane 1 and 2) and uncleaved IgA<sub>1</sub> (black arrow) by live washed *S. suis* bacteria (lane 3), bacterial supernatant (lane 4), and purified Zmp protein (lane 5) were visualized using a specific antibody against human IgA<sub>1</sub>. Similar results were also observed with *S. suis* non-concentrated and 3x concentrated samples (data not shown). Alongside, different concentrations of the purified Zmp protein (1, 10 µg/mL) were also unable to cleave human IgAs (data not shown).

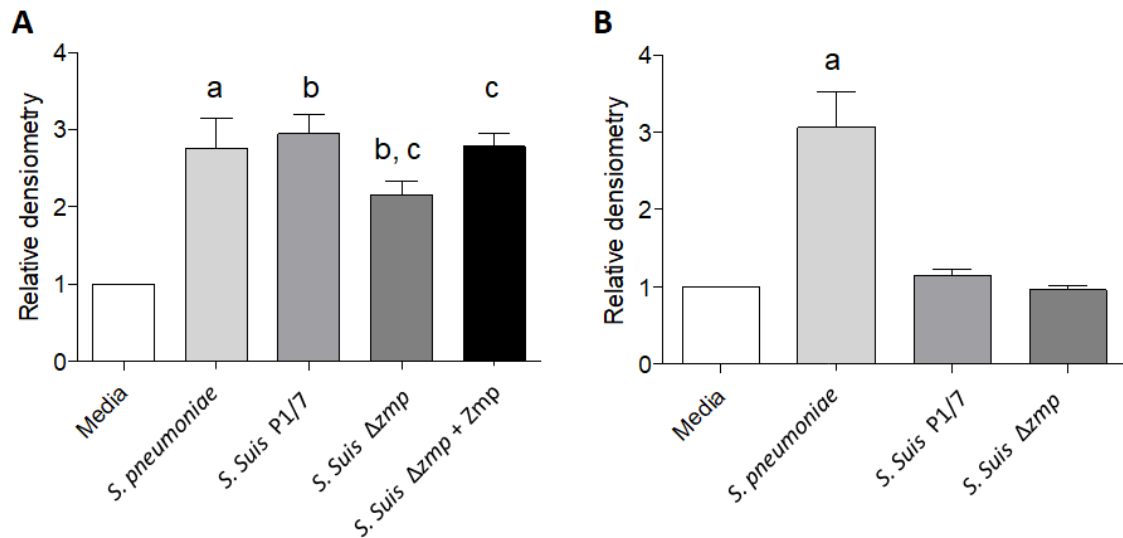


**Fig 3. *S. suis* does not activate the matrix metalloprotease-9 (MMP-9).** Pro-enzyme MMP-9 was incubated 1 h with purified Zmp protein (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), live washed bacteria (bact) or bacterial supernatant (sup; 10x) from *S. suis* or non-concentrated *S. pneumoniae* in exponential growth phase. Samples were separated in non-denaturing conditions on a gelatin B zymogram. Coomassie coloration shows a second gelatinolytic band for live washed *S. pneumoniae* bacteria or bacterial supernatants (lane 1 and 2) corresponding to activated MMP-9, while no second band was observed for live washed *S. suis* bacteria (lane 3), bacterial supernatant (lane 4) or purified Zmp protein (lane 5). Similar results were also obtained with *S. suis* non-concentrated or 3x concentrated samples and with 1 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of purified Zmp protein (results not shown).

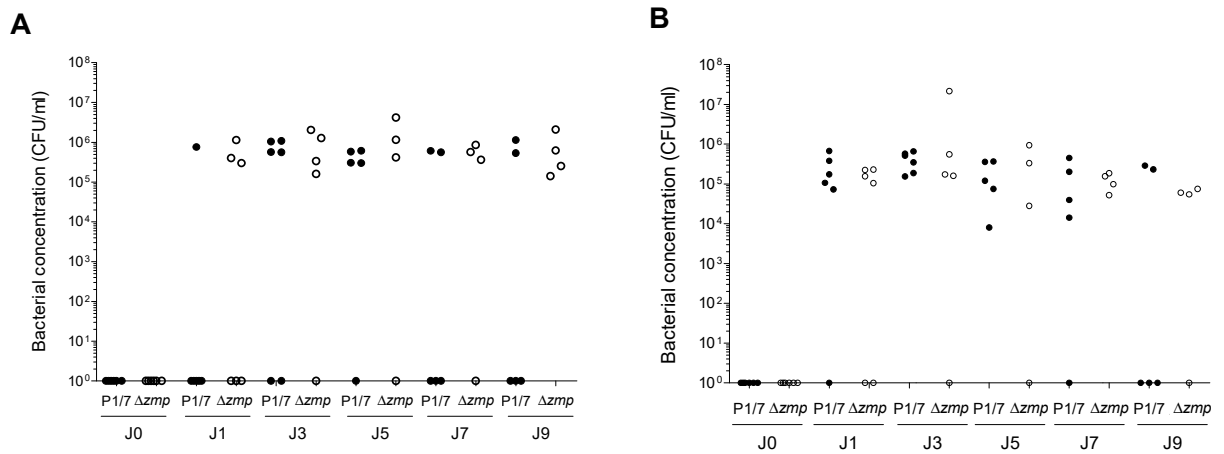


**Fig 4. *S. suis* is unable to cleave P-Selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) ectodomains.**

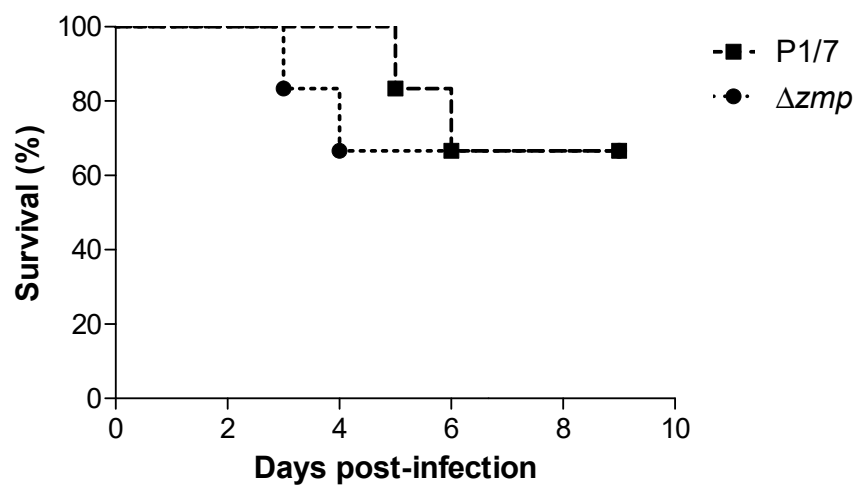
Purified Zmp protein (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), live washed bacteria (bact) or bacterial supernatant (sup; 10x) from *S. suis* or non-concentrated *S. pneumoniae* in exponential growth phase were incubated with PSGL-1/fc for 1 h. Samples were separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes which were incubated with KPL-1 antibody (A) or PL2 (B). No recognition of PSGL-1 by the KPL-1 antibody and visualization of lower molecular weight band with PL2 antibody were observed for live washed *S. pneumoniae* bacteria and bacterial supernatant (lane 1 and 2), which is expected following PSGL-1 ectodomain cleavage. There was no change in the recognition by KPL-1 or in the molecular weight visualized with PL2 for PSGL-1 treated with live washed *S. suis* bacteria (lane 3), bacterial supernatant (lane 4) or the purified Zmp protein (lane 5). Similar results were also obtained with *S. suis* non-concentrated or 3x concentrated samples and with 1 or 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of purified Zmp protein (results not shown).



**Fig 5. Zmp is implicated in mucin16 (MUC16) ectodomain cleavage.** Relative densitometry of HeLa cell culture medium conditioned with *S. pneumoniae*, *S. suis* P1/7 or *S. suis*  $\Delta zmp$  supernatant supplemented or not with 100  $\mu$ g of the purified Zmp protein. (A) The capacity of the mutant strain to cleave MUC16 ectodomains is significantly reduced ( $p = 0.017$ ) in comparison to the wild-type strain using 3x concentrated supernatant. The addition of the Zmp protein to a final concentration of 100  $\mu$ g/mL also restored the wild-type phenotype ( $p = 0.039$ ). (B) There was no cleavage of MUC16 ectodomains using non-concentrated *S. suis* supernatant, in comparison with *S. pneumoniae* non-concentrated supernatant ( $p=0.002$ ). Data represent the mean  $\pm$  SEM from at least three independent experiments.



**Fig. 6. *Zmp* does not impact the colonization potential of *S. suis* serotype 2 in a pig model of infection.** Bacterial concentrations recovered in the tonsils (A) or trachea (B) of piglets infected with the wild-type strain P1/7 or its  $\Delta zmp$  mutant. No reduction of the potential to colonize the upper respiratory tract of piglets was observed following infection with the  $\Delta zmp$  mutant. Each point represents an individual animal.



**Fig. 7. Zmp does not play a role in the virulence of *S. suis* serotype 2 in an intranasal pig model of infection.** Survival of four-week old piglets infected with the wild-type strain P1/7 strain or the  $\Delta zmp$  mutant. No significant differences were observed between groups ( $p=0.839$ ).



Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

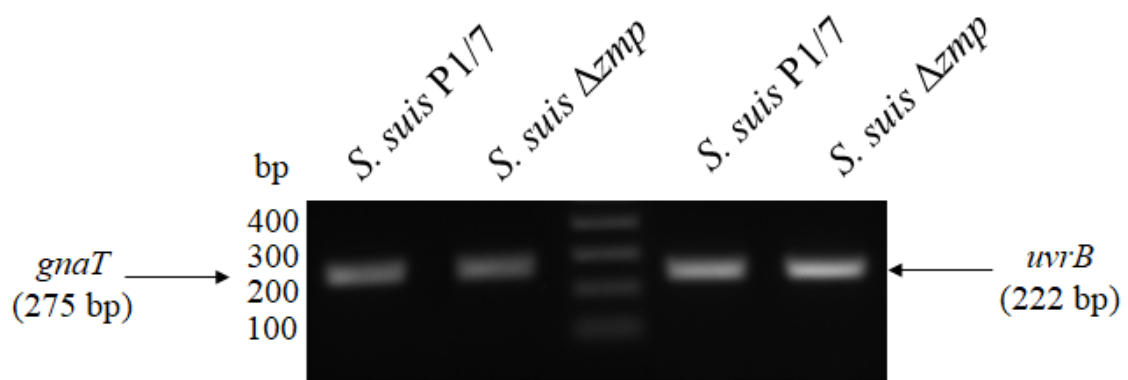
Strains/plasmids	General characteristics	Source/reference
<i>Escherichia coli</i>		
TOP 10	F <sup>-</sup> mrcA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG	Invitrogen
BL21	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm rne131	Invitrogen (DE3)
<i>Streptococcus suis</i>		
P1/7	Wild-type, virulent European serotype 2 ST1 strain isolated from pig with meningitis	(45)
Δzmp	Isogenic mutant strain derived from P1/7. In frame deletion of <i>zmp</i>	This work
SC84	Highly virulent clonal serotype 2 ST7 strain isolated from the 2005 human outbreak in China	(46)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
TIGR4	Virulent serotype 4 strain isolated from human blood in Norway	ATCC
Plasmids		
PCR2.1	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , oriR(f1) MCS oriR (ColE1)	Invitrogen
pSET4s	Thermosensitive vector for allelic replacement in <i>S. suis</i> . Replication functions of pG + host3, MCS oriR pUC19 lacZ Sp <sup>R</sup>	(47)
pET101	Ap <sup>r</sup> , pBR322 <i>ori</i> , T7 promotor	Invitrogen
p4Δzmp	pSET4s carrying the construct of <i>zmp</i> allelic replacement	This work
pET101zmp	pET101 carrying <i>zmp</i> gene for protein production	This work

Table 2. Oligonucleotide primers used in this study

Primer name	Sequence (5' – 3')
zmp-ID1	CCTTGGTTTAGATGCCC
zmp-ID2	CTGAGACAAGTCCCACT
zmp-ID3	CAAGCCTTGATGAACTCTAC
zmp-ID4	GCTATTCCTAGCTTCTACCT
zmp-ID5	TGTTTCTTTCATCCTTGACAG
zmp-ID6	CTTGTTAATGATTATTTAATAAGTTGTTACTCCCTAAAATAG
zmp-ID7	TAGGGAGTAACAACCTTATTAATAATCATTAAACAAGTTGGTC
zmp-ID8	ATCTGGCTCATCCATGAC
pET101-zmp-F	CACCATGGCTCGATATAACCATGCAATC
pET101-zmp-R	TGGGTAAAAATCGATGTTCTG
gnat-F	GCGCATTCCCCTCCAATA
gnat-R	CGAACTGCCAGTCTTGA
uvrB-F	CATGGAAGAAACAGCCCG
uvrB-R	CACTTCTGCGGCTTCCTG

Table 3. Clinical signs observed in both wild-type- and  $\Delta zmp$ -infected pigs

Clinical signs	WT	$\Delta zmp$
Fever	4/6	4/6
Respiratory problem	0/6	1/6
Arthritis	3/6	5/6
Nervous signs	2/6	2/6



**Fig S1. mRNA expression of upstream (*gnaT*) and downstream (*uvrB*) genes flanking the *zmp* gene were not affected by the in-frame deletion in the mutant strain.**

## References

1. 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. *Emerging microbes & infections*. 2014;3(6):e45.
2. Okura M, Osaki M, Nomoto R, Arai S, Osawa R, Sekizaki T, et al. Current Taxonomical Situation of *Streptococcus suis*. *Pathogens*. 2016;5(3).
3. 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):2239-44.
4. 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 letters*. 2016;590(21):3772-99.
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(2):259-79.
6. Segura M, Fittipaldi N, Calzas C, Gottschalk M. Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors: Are They All Really Critical? *Trends in microbiology*. 2017;25(7):585-99.
7. Zhang A, Mu X, Chen B, Liu C, Han L, Chen H, et al. Identification and characterization of IgA1 protease from *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol*. 2010;140(1-2):171-5.
8. Corthesy B. Role of secretory IgA in infection and maintenance of homeostasis. *Autoimmunity reviews*. 2013;12(6):661-5.

9. Bek-Thomsen M, Poulsen K, Kilian M. Occurrence and evolution of the paralogous zinc metalloproteases IgA1 protease, ZmpB, ZmpC, and ZmpD in *Streptococcus pneumoniae* and related commensal species. *mBio*. 2012;3(5).
10. Weinert LA, Chaudhuri RR, Wang J, Peters SE, Corander J, Jombart T, et al. Genomic signatures of human and animal disease in the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *Nature communications*. 2015;6:6740.
11. Leib SL, Leppert D, Clements J, Tauber MG. Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infect Immun*. 2000;68(2):615-20.
12. 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.
13. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry*. 1981;112(2):195-203.
14. Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S, Gottschalk M. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology*. 1998;144 ( Pt 2):325-32.
15. Gottschalk M, Higgins R, Boudreau M. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*. 1993;31(8):2192-4.
16. Li Y, Martinez G, Gottschalk M, Lacouture S, Willson P, Dubreuil JD, et al. Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. *Infect Immun*. 2006;74(1):305-12.

17. Oggioni MR, Memmi G, Maggi T, Chiavolini D, Iannelli F, Pozzi G. Pneumococcal zinc metalloproteinase ZmpC cleaves human matrix metalloproteinase 9 and is a virulence factor in experimental pneumonia. *Molecular microbiology*. 2003;49(3):795-805.
18. Surewaard BG, Trzcinski K, Jacobino SR, Hansen IS, Vughs MM, Sanders EA, et al. Pneumococcal immune evasion: ZmpC inhibits neutrophil influx. *Cellular microbiology*. 2013;15(10):1753-65.
19. Govindarajan B, Menon BB, Spurr-Michaud S, Rastogi K, Gilmore MS, Argueso P, et al. A metalloproteinase secreted by *Streptococcus pneumoniae* removes membrane mucin MUC16 from the epithelial glycocalyx barrier. *PloS one*. 2012;7(3):e32418.
20. Menon BB, Govindarajan B. Identification of an atypical zinc metalloproteinase, ZmpC, from an epidemic conjunctivitis-causing strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog*. 2013;56:40-6.
21. Lalonde M, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology*. 2000;146 ( Pt 8):1913-21.
22. Silva LM, Baums CG, Rehm T, Wisselink HJ, Goethe R, Valentin-Weigand P. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Vet Microbiol*. 2006;115(1-3):117-27.
23. 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).
24. Pallares FJ, Halbur PG, Schmitt CS, Roth JA, Opriessnig T, Thomas PJ, et al. Comparison of experimental models for *Streptococcus suis* infection of conventional pigs. *Can J Vet Res*. 2003;67(3):225-8.

25. Epperson TK, Patel KD, McEver RP, Cummings RD. Noncovalent association of P-selectin glycoprotein ligand-1 and minimal determinants for binding to P-selectin. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(11):7839-53.
26. Cerutti A, Cols M, Gentile M, Cassis L, Barra CM, He B, et al. Regulation of mucosal IgA responses: lessons from primary immunodeficiencies. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1238:132-44.
27. Janoff EN, Rubins JB, Fasching C, Charboneau D, Rahkola JT, Plaut AG, et al. Pneumococcal IgA1 protease subverts specific protection by human IgA1. *Mucosal immunology*. 2014;7(2):249-56.
28. Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(12):821-32.
29. Zhang A, Mu X, Chen B, Han L, Chen H, Jin M. IgA1 protease contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol*. 2011;148(2-4):436-9.
30. Fu L, Zhao J, Lin L, Zhang Q, Xu Z, Han L, et al. Characterization of IgA1 protease as a surface protective antigen of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbes Infect*. 2016;18(4):285-9.
31. Yu H, Jing H, Chen Z, Zheng H, Zhu X, Wang H, et al. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(6):914-20.
32. Zheng X, Zheng H, Lan R, Ye C, Wang Y, Zhang J, et al. Identification of genes and genomic islands correlated with high pathogenicity in *Streptococcus suis* using whole genome tiling microarrays. *PloS one*. 2011;6(3):e17987.
33. 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):1203-8.



34. Auger JP, Chuzeville S, Roy D, Mathieu-Denoncourt A, Xu J, Grenier D, et al. The bias of experimental design, including strain background, in the determination of critical *Streptococcus suis* serotype 2 virulence factors. PloS one. 2017;12(7):e0181920.
35. Jobin MC, Fortin J, Willson PJ, Gottschalk M, Grenier D. Acquisition of plasmin activity and induction of arachidonic acid release by *Streptococcus suis* in contact with human brain microvascular endothelial cells. FEMS Microbiol Lett. 2005;252(1):105-11.
36. Tanabe S, Grenier D. Endothelial cell/macrophage cocultures as a model to study *Streptococcus suis*-induced inflammatory responses. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009;55(1):100-6.
37. Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. Critical reviews in biochemistry and molecular biology. 2013;48(3):222-72.
38. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. Physiology. 2013;28(6):391-403.
39. Carlow DA, Gossens K, Naus S, Veerman KM, Seo W, Ziltener HJ. PSGL-1 function in immunity and steady state homeostasis. Immunological reviews. 2009;230(1):75-96.
40. Jonckheere N, Van Seuningen I. The membrane-bound mucins: how large O-glycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies. Critical reviews in oncogenesis. 2008;14(2-3):177-96.
41. Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. Mucins in the mucosal barrier to infection. Mucosal immunology. 2008;1(3):183-97.
42. Perez BH, Gipson IK. Focus on Molecules: human mucin MUC16. Experimental eye research. 2008;87(5):400-1.

43. Chiavolini D, Memmi G, Maggi T, Iannelli F, Pozzi G, Oggioni MR. The three extracellular zinc metalloproteinases of *Streptococcus pneumoniae* have a different impact on virulence in mice. *BMC microbiology*. 2003;3:14.
44. Yamaguchi M, Nakata M, Sumioka R, Hirose Y, Wada S, Akeda Y, et al. Zinc metalloproteinase ZmpC suppresses experimental pneumococcal meningitis by inhibiting bacterial invasion of central nervous systems. *Virulence*. 2017:1-9.
45. 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.
46. Ye C, Zheng H, Zhang J, Jing H, Wang L, Xiong Y, et al. Clinical, experimental, and genomic differences between intermediately pathogenic, highly pathogenic, and epidemic *Streptococcus suis*. *The Journal of infectious diseases*. 2009;199(1):97-107.
47. Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid*. 2001;46(2):140-8.

## **IV- Discussion**

# **1. Caractérisation de la zinc métalloprotéase de *S. suis* sérotype 2**

## **1.1 La protéine *S. suis* n'a pas la capacité de cliver les IgA<sub>1</sub> humains**

En 2010, une protéine ayant pour fonction le clivage des IgA<sub>1</sub> humaines a été décrite pour la première fois chez *S. suis* (9). Cette étude a été réalisée à partir de la protéine purifiée de la souche clonale de *S. suis* sérotype 2 ST7, responsable pour l'écllosion mortelle de 2005 en Chine (143). Cette souche possède un îlot de pathogénicité, caractéristique qui n'est pas représentative de la grande majorité des souches de *S. suis* (144). Néanmoins, une autre équipe a obtenu des résultats contradictoires, et ce avec 7 différentes souches de *S. suis* provenant de sérotypes ou de ST différents (13). Étant donné cette controverse, des tests de clivage des IgA<sub>1</sub> humaines ont été effectués de nouveau, afin d'essayer de connaître la véritable fonction de la zinc métalloprotéase de *S. suis* sérotype 2 et ce en utilisant 2 souches appartenant à des ST différents. En effet, une souche de *S. suis* sérotype 2 ST1 virulente, isolée d'un cas de méningite chez le porc, a été utilisée (145). De plus, tout comme Zhang *et al.*, une souche de *S. suis* sérotype 2 ST7, issue elle aussi d'un cas clinique de l'écllosion mortelle de 2005 (88), a également été utilisée. Tout comme pour la deuxième équipe, aucun clivage des IgA n'a pu être observé, autant pour la souche ST1 que pour la souche ST7 (données non-montrées), et ce peu importe les conditions utilisées (voir Tableau I).

Tableau I. Comparaison des méthodes expérimentales employées pour réaliser le clivage des IgA<sub>1</sub> humains

Clivage des IgA <sub>1</sub> humains			
Facteurs	IgA protéase (9) Sérotype 2, ST7	IgA protéase (13) Sérotype 2, ST1 + 6 autres souches	Zmp/IgA protéase (cette étude) Sérotype 2, ST1 et ST7
Substrat (origine)	IgA <sub>1</sub> (humaine)	IgA <sub>1</sub> (humaine)	IgA <sub>1</sub> (humaine)
<i>S. suis</i> (bactérie, surnageant, protéine purifiée)	X mg protéine purifiée (2 his tag : N+C terminal)	Bactéries entières 10X	Bactéries entières et surnageant (1, 3, 10X); 1 à 100 µg protéines purifiées (1 his tag : C-terminal)
Résultats	Clivage	Aucun clivage	Aucun clivage
Conclusions	Résultats différents dus à l'échantillon de <i>S. suis</i> utilisé (bactérie, surnageant vs protéine purifiée et/ou méthode de clonage et purification)?		

Comme il est possible de le voir dans le tableau I, il peut s'avérer difficile de reproduire les expériences réalisées par d'autres équipes de recherche, comme cela a déjà été démontré dans une autre étude (7). En effet, le manque d'informations, en ce qui concerne la quantité de protéines purifiée utilisée pour obtenir ce résultat de clivage positif, empêche de reproduire l'expérience le plus fidèlement possible. De plus, la méthode utilisée pour cloner les 2 protéines diffère. En effet, étant donné la présence d'un motif LPXTG atypique en N-terminal, il a été fortement suggéré, par une étude réalisée avec les zincs métalloprotéases de *S. pneumoniae*, d'utiliser un vecteur d'expression avec un tag histidine en C-terminal pour conserver la fonction de la protéine (89). Néanmoins, Zhang *et al.* ont utilisé un vecteur d'expression possédant deux tags histidines, 1 en C-terminal et 1 en N-terminal (9), ce qui ne les a pas empêchés de rapporter un résultat positif.

Il est également possible que l'absence d'activité IgA protéase soit due à l'origine des IgA<sub>1</sub> utilisés. En effet, étant donné que *S. suis* est un pathogène du porc, il est fort probable que sa zinc métalloprotéase ait une plus grande affinité pour les IgA<sub>1</sub> de type porcin. Néanmoins, il n'existe pas de trousse commerciale pour la purification des IgA porcins. En 2011, une équipe travaillant sur l'IgA protéase d'*Haemophilus parasuis* a réussi à purifier des IgA sécrétoires issus du lait d'une truie, à l'aide d'une chromatographie sur une résine sépharose (146). Le problème qui demeure est l'accessibilité au substrat, d'autant plus que les quantités de lait requises pour obtenir une quantité raisonnable d'IgA pour faire les expériences ne sont pas

mentionnées. Une autre étude a également démontré que l'IgA protéase de *S. pneumoniae* a la capacité de cliver les IgA sécrétoires issus de colostrum humain (147). Il est cependant peu probable qu'il ait la capacité de le faire avec des IgAs d'origine porcine. Ainsi, l'évaluation du clivage des IgA sécrétoires porcins par *S. suis* pourrait être la dernière étape à franchir pour confirmer l'absence de cette fonction.

## **1.2 La protéine Zmp de *S. suis* sérotype 2 a un rôle partiel dans le clivage de la mucine 16**

Comme mentionné dans la section 3.2.2 de la revue de la littérature, l'IgA protéase de *S. suis*, suite à une étude phylogénétique, a été classée comme étant un homologue de la protéine ZmpC de *S. pneumoniae* (13). En comparant les séquences en acides aminés de l'IgA protéase de *S. suis*, à celle de ZmpA, ZmpB et ZmpC de *S. pneumoniae*, il est possible d'obtenir des pourcentages d'homologie de 32 %, 30 % et 42 %, respectivement. Ces résultats, obtenus grâce à l'outil Blast, permettent de démontrer, qu'en effet, la séquence de la zinc métalloprotéase de *S. suis* semble plus homologue à la protéine ZmpC de *S. pneumoniae*.

Le premier rôle a avoir été décrit pour la protéine ZmpC de *S. pneumoniae* est le clivage de MMP-9 (105). Il y a quelques années, la production de MMP-9 par des macrophages était induite par une infection *in vitro* de ces cellules par *S. suis* sérotype 2 (148). De plus, dans un modèle de co-infection avec des cellules endothéliales, cette production était augmentée (149). Bien que le mécanisme responsable de l'activation de MMP-9 est toujours inconnu, l'hypothèse que MMP-9 pourrait jouer un rôle important lors de l'invasion du CNS par *S. suis* a pu être émise (148, 149). Néanmoins, comme il est possible de le voir dans la Figure 3 de l'article scientifique, *S. suis* ou la protéine Zmp purifiée n'ont pas la capacité d'activer directement la proenzyme MMP-9. Il est donc fort probable que MMP-9 soit activée directement par les cellules de l'hôte. En effet, différentes études ont démontré que les cellules peuvent produire MMP-3, de la plasmine ou encore de l'élastase, tous trois étant des activateurs naturels de MMP-9. Ce faisant, l'hôte pourrait arriver à contrecarrer l'infection grâce au recrutement d'un plus grand nombre de cellules immunitaires (macrophages, neutrophiles), qui pourraient participer à la régénération de la MEC entre autres (113, 115).

La seconde fonction ayant été décrite pour la protéine ZmpC de *S. pneumoniae* est le clivage des ectodomains de PSGL-1 (109). Par le clivage des ectodomains de PSGL-1, la protéine ZmpC de *S. pneumoniae* inhibe la cascade de signaux menant à la diapédèse des cellules du système immunitaire (109). Étant donné le rôle important joué par PSGL-1, que ce soit dans l'inflammation et dans l'élimination du pathogène, l'inactivation de cette glycoprotéine permet aux pathogènes de coloniser l'hôte plus facilement (109, 124). Néanmoins, *S. suis* ou sa protéine purifiée ne sont pas impliqués dans le clivage des ectodomains de PSGL-1. Ainsi, PSGL-1 n'est pas impliqué dans la pathogenèse de *S. suis* dans ce modèle d'étude.

Finalement, la protéine ZmpC de *S. pneumoniae* a été décrite comme étant impliquée dans le clivage de la MUC16 (107, 108). Compte tenu que cette mucine est retrouvée dans la barrière épithéliale respiratoire (130, 131) et que la principale route d'entrée de *S. suis* chez le porc est au niveau des voies respiratoires (1), le clivage de la MUC16 pourrait donc grandement participer aux premières étapes de sa colonisation. Tout comme pour la protéine ZmpC de *S. pneumoniae*, *S. suis* a la capacité de cliver les ectodomains de cette mucine et ce partiellement grâce à sa zinc métalloprotéase. En effet, *S. suis* sérotype 2 semble libérer la protéine Zmp dans son surnageant, qui une fois en présence de cellules HeLa, a la capacité de libérer les ectodomains de MUC16. Néanmoins, l'activité observée dans le surnageant de *S. suis* sérotype 2 est moins importante que celle observée pour *S. pneumoniae*, puisque le surnageant de *S. suis* doit être concentré pour voir une activité qui, en plus, est moins élevée que celle de *S. pneumoniae*. Il est également important de noter qu'une activité résiduelle dans le clivage de MUC16 est toujours visible dans le mutant déficient  $\Delta zmp$ . Ceci laisse donc présager que d'autres facteurs de la bactérie pourraient participer à cette activité. En effet, comme mentionné dans la section 2.1 de la revue de la littérature, environ 40 protéines ont été démontrées comme ayant un rôle en tant qu'adhésine aux protéines de la MEC. Parmi ces 40 protéines, 18 ont un rôle à jouer dans la liaison à la fibronectine (5). Ceci met donc en évidence la redondance des facteurs de virulence décrits pour *S. suis* et laisse donc présager que l'absence d'un facteur de virulence pourrait être compensé par la présence d'autres facteurs avec des rôles similaires (86). D'autres parts, la protéine Zmp purifiée seule n'est pas capable d'induire le clivage de la MUC16 (résultats non montrés), et ce malgré l'ajout de six différents ions

métalliques ayant été proposés comme jouant un rôle dans l'activation des zincs métalloprotéases (150). Toutefois, la protéine Zmp purifiée est capable de cliver les ectodomains de la MUC16 lorsqu'elle est ajoutée dans le surnageant bactérien de *S. suis*  $\Delta zmp$ . Il est donc fort probable qu'un cofacteur soit présent dans le surnageant bactérien, tels qu'un ion ou encore une protéase. Cependant, des études supplémentaires seront nécessaires, afin de déterminer quel est ce cofacteur. Notre étude est la première à démontrer un rôle direct de la zinc métalloprotéase de *S. suis* dans le clivage des ectodomains de la MUC16. Cette activité pourrait participer à la colonisation des cellules épithéliales par *S. suis*, comme c'est le cas pour *Staphylococcus aureus* (133).

Les différentes expériences réalisées ont permis de démontrer que la protéine Zmp de *S. suis* sérotype 2 ne possède pas tous les rôles attribués à la protéine ZmpC de *S. pneumoniae*. Ceci pourrait s'expliquer par les différences présentes entre ces 2 protéines, que ce soit au niveau de la séquence en acides aminés ou encore au niveau de l'expression de la protéine. Il est néanmoins important de se rappeler qu'il pourrait y avoir d'autres fonctions décrites pour la protéine ZmpC de *S. pneumoniae* qui pourraient également être attribuées à la protéine Zmp de *S. suis*. Il sera donc important de poursuivre la caractérisation de la protéine, afin d'évaluer des rôles potentiels dans l'avenir.

### **1.3 La protéine Zmp de *S. suis* sérotype 2 n'est pas un facteur de virulence critique**

#### **1.3.1 Chez le porc**

Une étude de virulence, elle aussi réalisée avec la souche clonale de *S. suis* sérotype 2 ST7 (143), a démontré que l'IgA protéase ou Zmp a un rôle à jouer dans la virulence de *S. suis* (10). Il est important de se rappeler que contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature, cette souche n'a pas d'activité IgA protéase dans nos expériences. D'autre part, le gène codant pour la protéine Zmp a été retrouvée dans des souches de *S. suis* sérotype 2 ST28 virulentes (Figure 5, Annexe 1). En effet, ces souches possèdent le gène intact au sein de leur génome, tandis que toutes les autres souches ont une copie du gène interrompue en 2 à 3 fragments, que ce soit par la présence d'un transposon ou par des mutations ponctuelles. Ceci permet donc de



poser l'hypothèse que la protéine Zmp est effectivement importante pour la virulence de *S. suis* sérotype 2.

Puisque la protéine Zmp de *S. suis* a été associée avec le clivage des ectodomains de la MUC16, elle pourrait avoir un rôle important à jouer dans les premières étapes de l'infection causée par *S. suis*, soit la colonisation des surfaces épithéliales. Ainsi, un modèle d'infection intranasale chez le porc a tout d'abord été utilisé (151), afin de déterminer le rôle de Zmp dans la colonisation des tissus. Néanmoins, aucune différence n'a pu être observée dans la colonisation des amygdales et de la trachée des animaux infectés avec la souche mère ou le mutant  $\Delta zmp$ . Ceci pourrait une fois de plus s'expliquer par le concept de la redondance bactérienne (86), c'est-à-dire que d'autres facteurs pourraient venir compenser l'absence de la protéine Zmp, d'autant plus qu'environ quarante facteurs ont été décrits comme étant impliqués dans la colonisation des surfaces épithéliales chez *S. suis* (5). Le concept de redondance s'applique aussi à d'autres pathogènes. Par exemple, plusieurs adhésines ont également été décrites pour *Streptococcus agalactiae* (ou Streptocoque du groupe A ; GAS) comme ayant un haut degré de redondance dans leurs fonctions. La présence de ces adhésines, aux fonctions très similaires pourrait être considérée comme un mécanisme d'adaptation. En effet, ceci pourrait permettre à la bactérie de coloniser plus facilement différents types de tissus dans des environnements différents. Chez les GAS, la redondance peut également faire référence à un seul facteur de virulence. Cet unique facteur de virulence doit être composé de différents domaines, pouvant tous interagir avec des composantes différentes du système immunitaire de l'hôte, comme c'est le cas de la protéine M (152). Le concept de redondance peut également être appliqué au niveau génétique. Il a été démontré que certaines bactéries vont doubler la présence de certains gènes dans leur génome, afin de mieux s'adapter contre les traitements aux antibiotiques, par exemple. En effet, la première copie du gène effectuera sa fonction naturelle, tandis que la deuxième pourra aider la bactérie à se défendre contre l'antibiotique (153).

Deuxièmement, en utilisant le même modèle d'infection intranasale (151), le rôle de la protéine Zmp dans la virulence de *S. suis* sérotype 2 a été évalué en utilisant la souche de référence de sérotype 2 ST1 (P1/7). Cependant, il a été impossible de reproduire les mêmes résultats que pour l'expérience de Zhang *et al.* En effet, le mutant  $\Delta zmp$  est toujours aussi virulent que la souche mère. Néanmoins, il ne faut pas exclure la possibilité que la protéine

Zmp puisse jouer un rôle important dans la virulence d'autres sérotypes de *S. suis*. En effet, il a été démontré récemment que l'AgI/II de *S. suis* est un facteur sérotype dépendant impliqué dans la virulence de *S. suis* (Annexe II). Alors que son rôle est très minime dans la pathogenèse de *S. suis* sérotype 2, l'AgI/II participe à plusieurs mécanismes chez *S. suis* sérotype 9, tels que la colonisation des surfaces épithéliales, la formation de biofilms et la résistance au stress acide. Des études pourraient être réalisées, afin d'évaluer le potentiel de Zmp dans la pathogenèse d'autres sérotypes, d'autant plus que la protéine est retrouvée dans un grand nombre de souches appartenant à des sérotypes différents ((9); données non-montrées).

### 1.3.2 Chez la souris

En parallèle, des études de virulence ont également été réalisées chez la souris (Annexe III et IV), car cet animal est souvent utilisé comme modèle d'infection pour *S. suis* (154-156). Bien que la plupart des études ait utilisé la voie intrapéritonéale chez la souris (154), la voie intranasale a été utilisée dans cette étude, étant donné la présence de la MUC16 au niveau des muqueuses respiratoires (156). Le modèle d'infection intranasale avec *S. suis* chez la souris a déjà été rapporté (156). Les résultats ont montré que, tout comme pour le porc, la protéine Zmp n'est pas un facteur de virulence critique dans la virulence de *S. suis* sérotype 2 (Annexe III). Comme mentionné un peu plus haut, il est probable que la protéine Zmp ait d'autres fonctions, qui n'ont pas encore été caractérisées à ce jour. Ainsi, à titre de comparaison, un modèle murin d'infection intrapéritonéale a également été utilisé, afin d'évaluer le rôle de Zmp dans la virulence de *S. suis* sérotype 2 (154). Une fois de plus, Zmp ne s'avère pas être un facteur de virulence critique dans la phase systémique de l'infection causée par *S. suis* sérotype 2 (Annexe III).

Les résultats obtenus concordent avec les études de virulence réalisées avec la protéine ZmpC de *S. pneumoniae* dans un modèle d'infection intranasal. Dans ce modèle, il a été démontré que la virulence de *S. pneumoniae* est légèrement affectée par l'absence de la protéine ZmpC (105, 134). Plus récemment, une infection systémique chez la souris, via une injection intraveineuse, a permis de démontrer que la protéine ZmpC participerait plutôt au contrôle de l'infection chez *S. pneumoniae* (135). Ceci ne semble cependant pas être le cas pour *S. suis*. Néanmoins, la voie d'inoculation dans ces 2 infections systémiques diffère : intrapéritonéale

pour *S. suis* et intraveineuse pour *S. pneumoniae*. Il est important de tenir en compte que ce n'est pas les mêmes cellules du système immunitaire qui seront rencontrées par le pathogène dans ces deux voies d'inoculation. En effet, l'inoculation via la voie intrapéritonéale se traduit par l'activation des macrophages du péritoine, tandis que ce sont les leucocytes sanguins qui seront stimulés directement via la voie intraveineuse (85). Il n'est donc pas possible d'éliminer la possibilité que des résultats similaires à ceux de *S. pneumoniae* soit obtenus pour *S. suis* lorsqu'inoculé par la voie intraveineuse.

#### **1.4 La protéine Zmp de *S. suis* est un antigène protecteur**

En plus d'avoir été décrite comme un facteur de virulence critique (ce qui ne semble pas être le cas), l'IgA protéase de *S. suis* a également été décrite comme étant un antigène protecteur. En effet, une protection de 100 % est obtenue chez des souris BALB/c après immunisation avec la protéine recombinante purifiée (12). Afin de confirmer que la zinc métalloprotéase de *S. suis* est bien un antigène protecteur, des souris CD1 ont été immunisées avec la protéine Zmp purifiée. Comme il est possible de le voir en Annexe V, les souris ayant été inoculées avec la protéine purifiée et les adjuvants A et B ont été protégées contre une infection avec une dose létale de *S. suis* sérotype 2, tandis que la protection était moindre pour la protéine Zmp avec les adjuvants C et D.

Dans le cas présent, il est important de s'attarder au choix du modèle animal employé par Fu *et al* en comparaison avec le modèle employé dans notre étude. Il y a principalement trois lignées de souris employées lors des études *in vivo* chez *S. suis*, soit les BALB/c, les C57BL/6 et les CD1 (27). Ces 2 premières lignées de souris sont des lignées consanguines, tandis que les CD1 ne le sont pas. Bien que les BALB/c et les C57BL/6, soient toutes 2 des lignées consanguines, elles possèdent une réponse immunitaire différente (157). En effet, les C57BL/6 sont très souvent utilisées dans les études de virulence chez la souris. Ces souris ont une réponse de type Th1, caractérisée par une forte production de médiateurs pro-inflammatoires (29, 155, 157). Une réponse humorale de type 1 y est généralement associée chez la souris (27). Pour leur part, les BALB/c vont plutôt développer une réponse de type Th2, qui dans le cas actuel résulte plutôt en la production d'anticorps de type 2 (IgG1) (27, 157). Ainsi, en utilisant un de ces 2 modèles pour des études de protection, en plus d'être consanguines, ces souris auront à la base

une réponse immunitaire biaisée face à l'antigène administré. Les CD1, pour leur part, ont une réponse immunitaire mixte et constituent un meilleur choix pour des études d'immunisation, étant donné que ce ne sont pas des souris consanguines. En effet, lors d'une immunisation, l'objectif est de protéger le plus d'individus possible. L'utilisation d'animaux consanguins (BALB/c ou C57BL/6) ne permet donc pas d'avoir un pool génétique varié, limitant ainsi les conclusions pouvant être tirées dans ces expériences.

D'autre part, les adjuvants A à D ont été choisis dans différentes classes d'adjuvants (voir tableau II), afin de maximiser les chances d'obtenir la meilleure réponse vaccinale possible. Il est intéressant de noter que la protection obtenue diffère entre les différents adjuvants utilisés, mais diffère également au sein d'une même classe d'adjuvant. En effet, l'émulsion composée de la protéine Zmp avec l'adjuvant B confère une protection de 70 %, comparativement à une protection d'uniquement 40 % pour l'adjuvant C, même si ces deux adjuvants appartiennent à la même catégorie. De plus, la protection contre une dose létale de *S. suis* obtenue avec l'émulsion de la protéine IgA protéase avec le Marcol-52, autre adjuvant eau-dans-huile, est également très élevée (12). Il est important de rappeler que l'hôte utilise principalement le processus de l'opsonophagocytose pour contrer une infection à *S. suis*, processus associé à une réponse anticorps de type 1 (27). Il serait donc probable que les animaux ayant été immunisés avec la protéine Zmp et les adjuvants A et B aient développé une meilleure réponse anticorps de type 1 que les animaux ayant reçus les adjuvants C et D. Néanmoins, le dosage des différents isotypes d'IgG n'ont pas permis de confirmer cette théorie. En effet, aucun patron d'une réponse humorale de type 1 ou de type 2 n'a pu être observé (données non-montrées). Cependant, les niveaux d'anticorps étaient très élevés pour la majorité des IgG et ce, peu importe l'adjuvant utilisé.

Tableau II. Nature des adjuvants utilisés pour les études d'immunisation et résultats de protection

Adjuvants	Nature	Protection?	Référence
Marcol-52	Eau-dans-huile	Complète (100 %)	(12)
A	Copolymère (huile-dans-eau)	Partielle (80 %)	Cette étude
B	Eau-dans-huile	Partielle (70 %)	Cette étude
C	Eau-dans-huile	Partielle (40 %)	Cette étude
D	Saponine	Aucune (20 %)	Cette étude

Des études supplémentaires sont toujours nécessaires, afin de confirmer le potentiel de Zmp comme candidat vaccinal. En effet, bien qu'une très bonne protection ait été obtenue avec les adjuvants A et B, il serait intéressant de poursuivre la recherche d'adjuvants pouvant permettre d'amplifier cette protection. De plus, comme mentionné un peu plus haut, Zmp est retrouvée dans différentes souches, appartenant à des sérotypes différents. Il sera donc intéressant d'évaluer la protection obtenue contre ces souches.

## **V- Conclusions et perspectives**

## Conclusions générales

Ce projet de maîtrise a permis de démontrer que :

- La protéine Zmp de *S. suis* sérotype 2 n'a pas d'activité dans le clivage des IgA<sub>1</sub> humaines, rappelant l'importance de la reproductibilité des résultats obtenus entre différents laboratoires.
- La protéine Zmp de *S. suis* sérotype 2 a un rôle partiel en tant que ZmpC.
  - ❖ Elle n'est pas capable d'activer MMP-9.
  - ❖ Elle n'est pas impliquée dans la libération des ectodomains de PSGL-1.
  - ❖ Elle est impliquée dans la libération des ectodomains de la MUC16. Néanmoins, un autre facteur semble impliqué dans cette activité, d'où l'importance de poursuivre les études à ce sujet.
- La protéine Zmp n'est pas impliquée de façon critique dans la pathogenèse de *S. suis* sérotype 2, que ce soit au niveau de la colonisation des surfaces épithéliales ou encore de sa virulence.
  - ❖ L'étude de colonisation réalisée chez le porc a permis d'émettre l'hypothèse que d'autres facteurs pourraient venir compenser la perte de la protéine Zmp chez le mutant (redondance bactérienne).
  - ❖ Les infections chez la souris ont également permis de démontrer que la protéine Zmp n'est pas impliquée dans la phase de colonisation ou dans la phase systémique de l'infection causée par *S. suis* sérotype 2.
- La protéine Zmp est un bon candidat vaccinal
  - ❖ Néanmoins, le choix d'un bon modèle d'étude et d'un bon adjuvant est essentiel, afin d'obtenir des résultats concluants.

## Perspectives

- Poursuivre la caractérisation de l'activité de libération des ectodomains de la MUC16 par *S. suis*, afin de déterminer quel(s) autre(s) facteur(s) pourrait être impliqué. Il est possible que ces nouveaux facteurs puissent jouer un rôle plus important que celui joué par la protéine Zmp dans la virulence de *S. suis* sérotype 2.
- Il serait également intéressant d'étudier l'impact de cette protéine dans la pathogenèse d'autres sérotypes de *S. suis*, étant donné la présence de la protéine dans d'autres souches de *S. suis*. Il est possible que la protéine ait un rôle plus important à jouer dans la pathogenèse d'un autre sérotype de *S. suis*, comme c'est le cas pour l'AgI/II.
- Puisque la protéine Zmp de *S. suis* est un candidat vaccinal prometteur et parce qu'elle est retrouvée dans plusieurs autres sérotypes, il serait intéressant de tester la protection obtenue contre d'autres souches de *S. suis*.



## Bibliographie

1. Gottschalk M. Streptococcosis. In: Zimmerman JJ KL, Ramirez A SK, Stevenson GW, editors. Diseases of Swine. 10Th ed. Hoboken, NJ: WileyBlackwell; 2012. p. 841-55.
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. *Emerging microbes & infections*. 2014;3(6):e45.
3. 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. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(12):2239-44.
4. 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 letters*. 2016;590(21):3772-99.
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 microbiology*. 2012;7(2):259-79.
6. Segura M, Fittipaldi N, Calzas C, Gottschalk M. Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors: Are They All Really Critical? *Trends in microbiology*. 2017;25(7):585-99.
7. Auger JP, Chuzeville S, Roy D, Mathieu-Denoncourt A, Xu J, Grenier D, et al. The bias of experimental design, including strain background, in the determination of critical *Streptococcus suis* serotype 2 virulence factors. *PloS one*. 2017;12(7):e0181920.
8. 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).
9. Zhang A, Mu X, Chen B, Liu C, Han L, Chen H, et al. Identification and characterization of IgA1 protease from *Streptococcus suis*. *Veterinary microbiology*. 2010;140(1-2):171-5.
10. Zhang A, Mu X, Chen B, Han L, Chen H, Jin M. IgA1 protease contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Veterinary microbiology*. 2011;148(2-4):436-9.
11. Corthesy B. Role of secretory IgA in infection and maintenance of homeostasis. *Autoimmunity reviews*. 2013;12(6):661-5.

12. Fu L, Zhao J, Lin L, Zhang Q, Xu Z, Han L, et al. Characterization of IgA1 protease as a surface protective antigen of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2016;18(4):285-9.
13. Bek-Thomsen M, Poulsen K, Kilian M. Occurrence and evolution of the paralogous zinc metalloproteases IgA1 protease, ZmpB, ZmpC, and ZmpD in *Streptococcus pneumoniae* and related commensal species. *mBio*. 2012;3(5).
14. Athey TB, Auger JP, Teatero S, Dumesnil A, Takamatsu D, Wasserscheid J, et al. Complex Population Structure and Virulence Differences among Serotype 2 *Streptococcus suis* Strains Belonging to Sequence Type 28. *PloS one*. 2015;10(9):e0137760.
15. Weinert LA, Chaudhuri RR, Wang J, Peters SE, Corander J, Jombart T, et al. Genomic signatures of human and animal disease in the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *Nature communications*. 2015;6:6740.
16. Feng Y, Zhang H, Wu Z, Wang S, Cao M, Hu D, et al. *Streptococcus suis* infection: an emerging/reemerging challenge of bacterial infectious diseases? *Virulence*. 2014;5(4):477-97.
17. Baele M, Chiers K, Devriese LA, Smith HE, Wisselink HJ, Vaneechoutte M, et al. The gram-positive tonsillar and nasal flora of piglets before and after weaning. *Journal of applied microbiology*. 2001;91(6):997-1003.
18. Wisselink HJ, Joosten JJ, Smith HE. Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(8):2922-9.
19. Reams RY, Harrington DD, Glickman LT, Thacker HL, Bowersock TL. Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. 1996;8(1):119-21.
20. Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Veterinary microbiology*. 2000;76(3):259-72.
21. Su Y, Yao W, Perez-Gutierrez ON, Smidt H, Zhu WY. Changes in abundance of *Lactobacillus spp.* and *Streptococcus suis* in the stomach, jejunum and ileum of piglets after weaning. *FEMS microbiology ecology*. 2008;66(3):546-55.

22. Thanawongnuwech R, Brown GB, Halbur PG, Roth JA, Royer RL, Thacker BJ. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis* infection. *Veterinary pathology*. 2000;37(2):143-52.
23. Gottschalk M, Segura M, Xu J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Animal health research reviews*. 2007;8(1):29-45.
24. Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, Chengappa MM. *Streptococcus suis*: past and present. *Veterinary research communications*. 1997;21(6):381-407.
25. Varela NP, Gadbois P, Thibault C, Gottschalk M, Dick P, Wilson J. Antimicrobial resistance and prudent drug use for *Streptococcus suis*. *Animal health research reviews*. 2013;14(1):68-77.
26. Li LL, Liao XP, Sun J, Yang YR, Liu BT, Yang SS, et al. Antimicrobial resistance, serotypes, and virulence factors of *Streptococcus suis* isolates from diseased pigs. *Foodborne pathogens and disease*. 2012;9(7):583-8.
27. Segura M. *Streptococcus suis* vaccines: candidate antigens and progress. *Expert review of vaccines*. 2015;14(12):1587-608.
28. 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 ( Pt 11):3607-14.
29. 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. *Infection and immunity*. 2016;84(7):2059-75.
30. Higgins R, Gottschalk M. Streptococcal disease. In: Ames IBP, editor. *Diseases of swine*. 6th ed2006. p. 769-83.
31. Okura M, Osaki M, Nomoto R, Arai S, Osawa R, Sekizaki T, et al. Current Taxonomical Situation of *Streptococcus suis*. *Pathogens*. 2016;5(3).
32. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR, Henrichsen J. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *Journal of clinical microbiology*. 1989;27(12):2633-6.
33. Okura M, Lachance C, Osaki M, Sekizaki T, Maruyama F, Nozawa T, et al. Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(5):1714-9.

34. Zheng H, Ji S, Liu Z, Lan R, Huang Y, Bai X, et al. Eight Novel Capsular Polysaccharide Synthesis Gene Loci Identified in Nontypeable *Streptococcus suis* Isolates. *Applied and environmental microbiology*. 2015;81(12):4111-9.
35. Zheng H, Qiu X, Roy D, Segura M, Du P, Xu J, et al. Genotyping and investigating capsular polysaccharide synthesis gene loci of non-serotypeable *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in Canada. *Veterinary research*. 2017;48(1):10.
36. King SJ, Leigh JA, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, Dowson CG, et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(10):3671-80.
37. Obert CA, Gao G, Sublett J, Tuomanen EI, Orihuela CJ. Assessment of molecular typing methods to determine invasiveness and to differentiate clones of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2007;7(6):708-16.
38. Athey TB, Teatero S, Takamatsu D, Wasserscheid J, Dewar K, Gottschalk M, et al. Population Structure and Antimicrobial Resistance Profiles of *Streptococcus suis* Serotype 2 Sequence Type 25 Strains. *PloS one*. 2016;11(3):e0150908.
39. 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. *Emerging microbes & infections*. 2014;3:e45.
40. Chuzeville S, Auger JP, Dumesnil A, Roy D, Lacouture S, Fittipaldi N, et al. Serotype-specific role of antigen I/II in the initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*. *Veterinary research*. 2017;48(1):39.
41. Du B, Ji W, An H, Shi Y, Huang Q, Cheng Y, et al. Functional analysis of c-di-AMP phosphodiesterase, GdpP, in *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbiological research*. 2014;169(9-10):749-58.
42. Gao T, Tan M, Liu W, Zhang C, Zhang T, Zheng L, et al. GidA, a tRNA Modification Enzyme, Contributes to the Growth, and Virulence of *Streptococcus suis* Serotype 2. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2016;6:44.

43. Huang K, Yuan Z, Li J, Zhang Q, Xu Z, Yan S, et al. Identification and characterisation a surface-associated arginine peptidase in *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbiological research*. 2015;170:168-76.
44. 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):631-41.
45. Musyoki AM, Shi Z, Xuan C, Lu G, Qi J, Gao F, et al. Structural and functional analysis of an anchorless fibronectin-binding protein FBPS from Gram-positive bacterium *Streptococcus suis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(48):13869-74.
46. Shao J, Zhang W, Wu Z, Lu C. The truncated major pilin subunit Sbp2 of the srtBCD pilus cluster still contributes to *Streptococcus suis* pathogenesis in the absence of pilus shaft. *Current microbiology*. 2014;69(5):703-7.
47. Xiao G, Tang H, Zhang S, Ren H, Dai J, Lai L, et al. *Streptococcus suis* small RNA rss04 contributes to the induction of meningitis by regulating capsule synthesis and by inducing biofilm formation in a mouse infection model. *Veterinary microbiology*. 2017;199:111-9.
48. Xu J, Fu S, Liu M, Xu Q, Bei W, Chen H, et al. The two-component system NisK/NisR contributes to the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbiological research*. 2014;169(7-8):541-6.
49. 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):1948-62.
50. Zhang C, Sun W, Tan M, Dong M, Liu W, Gao T, et al. The Eukaryote-Like Serine/Threonine Kinase STK Regulates the Growth and Metabolism of Zoonotic *Streptococcus suis*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:66.
51. Zhang H, Ma Z, Li Y, Zheng J, Yi L, Fan H, et al. Identification of a novel collagen type capital I, Ukrainian-binding protein from *Streptococcus suis* serotype 2. *Veterinary journal*. 2013;197(2):406-14.
52. Zhang H, Ravcheev DA, Hu D, Zhang F, Gong X, Hao L, et al. Two novel regulators of N-acetyl-galactosamine utilization pathway and distinct roles in bacterial infections. *MicrobiologyOpen*. 2015;4(6):983-1000.

53. Zhou J, Zhang X, He K, Wang W, Ni Y, Zhu H, et al. Characterization and proteome analysis of inosine 5-monophosphate dehydrogenase in epidemic *Streptococcus suis* serotype 2. *Current microbiology*. 2014;68(5):663-9.
54. Zhu H, Zhou J, Ni Y, Yu Z, Mao A, Hu Y, et al. Contribution of eukaryotic-type serine/threonine kinase to stress response and virulence of *Streptococcus suis*. *PloS one*. 2014;9(3):e91971.
55. Zhu J, Zhang T, Su Z, Li L, Wang D, Xiao R, et al. (p)ppGpp synthetases regulate the pathogenesis of zoonotic *Streptococcus suis*. *Microbiological research*. 2016;191:1-11.
56. 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. *Veterinary microbiology*. 2013;162(1):186-94.
57. Sun Y, Li N, Zhang J, Liu H, Liu J, Xia X, et al. Enolase of *Streptococcus Suis* Serotype 2 Enhances Blood-Brain Barrier Permeability by Inducing IL-8 Release. *Inflammation*. 2016;39(2):718-26.
58. Zheng JX, Li Y, Zhang H, Fan HJ, Lu CP. Identification and characterization of a novel hemolysis-related gene in *Streptococcus suis* serotype 2. *PloS one*. 2013;8(9):e74674.
59. Tenenbaum T, Adam R, Eggelpohler I, Matalon D, Seibt A, GE KN, et al. Strain-dependent disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier by *Streptococcus suis* in vitro. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2005;44(1):25-34.
60. Fulde M, Willenborg J, Huber C, Hitzmann A, Willms D, Seitz M, et al. The arginine-ornithine antiporter ArcD contributes to biological fitness of *Streptococcus suis*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2014;4:107.
61. Haas B, Bonifait L, Vaillancourt K, Charette SJ, Gottschalk M, Grenier D. Characterization of DNase activity and gene in *Streptococcus suis* and evidence for a role as virulence factor. *BMC research notes*. 2014;7:424.
62. Haas B, Grenier D. Isolation, Characterization and Biological Properties of Membrane Vesicles Produced by the Swine Pathogen *Streptococcus suis*. *PloS one*. 2015;10(6):e0130528.
63. Li Y, Zheng JX, Zhang H, Fan HJ, Lu CP. Effect of Tran on virulence through regulating metabolism and stress tolerance of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbiological research*. 2014;169(9-10):666-74.

64. Liu P, Pian Y, Li X, Liu R, Xie W, Zhang C, et al. *Streptococcus suis* adenosine synthase functions as an effector in evasion of PMN-mediated innate immunity. *The Journal of infectious diseases*. 2014;210(1):35-45.
65. Seele J, Beineke A, Hillermann LM, Jaschok-Kentner B, von Pawel-Rammingen U, Valentin-Weigand P, et al. The immunoglobulin M-degrading enzyme of *Streptococcus suis*, IdeSsuis, is involved in complement evasion. *Veterinary research*. 2015;46:45.
66. Seele J, Singpiel A, Spoerry C, von Pawel-Rammingen U, Valentin-Weigand P, Baums CG. Identification of a novel host-specific IgM protease in *Streptococcus suis*. *Journal of bacteriology*. 2013;195(5):930-40.
67. Wu Z, Shao J, Ren H, Tang H, Zhou M, Dai J, et al. A *Streptococcus suis* LysM domain surface protein contributes to bacterial virulence. *Veterinary microbiology*. 2016;187:64-9.
68. Zheng C, Ren S, Xu J, Zhao X, Shi G, Wu J, et al. Contribution of NADH oxidase to oxidative stress tolerance and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *Virulence*. 2017;8(1):53-65.
69. Zheng C, Xu J, Li J, Hu L, Xia J, Fan J, et al. Two Spx regulators modulate stress tolerance and virulence in *Streptococcus suis* serotype 2. *PloS one*. 2014;9(9):e108197.
70. Yu J, Pian Y, Ge J, Guo J, Zheng Y, Jiang H, et al. Functional and Structural Characterization of the Antiphagocytic Properties of a Novel Transglutaminase from *Streptococcus suis*. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(31):19081-92.
71. Segura M, Gottschalk M. *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity. *Infection and immunity*. 2002;70(8):4312-22.
72. Segura M, Gottschalk M, Olivier M. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infection and immunity*. 2004;72(9):5322-30.
73. Segura M, Stankova J, Gottschalk M. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infection and immunity*. 1999;67(9):4646-54.
74. 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. *Clinical and experimental immunology*. 2002;127(2):243-54.
75. Schwerk C, Adam R, Borkowski J, Schneider H, Klenk M, Zink S, et al. In vitro transcriptome analysis of porcine choroid plexus epithelial cells in response to *Streptococcus*

*suis*: release of pro-inflammatory cytokines and chemokines. *Microbes and infection* / Institut Pasteur. 2011;13(11):953-62.

76. Tenenbaum T, Essmann F, Adam R, Seibt A, Janicke RU, Novotny GE, et al. Cell death, caspase activation, and HMGB1 release of porcine choroid plexus epithelial cells during *Streptococcus suis* infection in vitro. *Brain research*. 2006;1100(1):1-12.

77. Tenenbaum T, Matalon D, Adam R, Seibt A, Wewer C, Schwerk C, et al. Dexamethasone prevents alteration of tight junction-associated proteins and barrier function in porcine choroid plexus epithelial cells after infection with *Streptococcus suis* in vitro. *Brain research*. 2008;1229:1-17.

78. Tenenbaum T, Papandreou T, Gellrich D, Friedrichs U, Seibt A, Adam R, et al. Polar bacterial invasion and translocation of *Streptococcus suis* across the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro. *Cellular microbiology*. 2009;11(2):323-36.

79. Wewer C, Seibt A, Wolburg H, Greune L, Schmidt MA, Berger J, et al. Transcellular migration of neutrophil granulocytes through the blood-cerebrospinal fluid barrier after infection with *Streptococcus suis*. *Journal of neuroinflammation*. 2011;8:51.

80. 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. *Current microbiology*. 2009;59(3):248-55.

81. Ju CX, Gu HW, Lu CP. Characterization and functional analysis of atl, a novel gene encoding autolysin in *Streptococcus suis*. *Journal of bacteriology*. 2012;194(6):1464-73.

82. 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*. *Infection and immunity*. 2012;80(7):2402-13.

83. Wu Z, Zhang W, Lu Y, Lu C. Transcriptome profiling of zebrafish infected with *Streptococcus suis*. *Microbial pathogenesis*. 2010;48(5):178-87.

84. Zaccaria E, Cao R, Wells JM, van Baarlen P. A Zebrafish Larval Model to Assess Virulence of Porcine *Streptococcus suis* Strains. *PloS one*. 2016;11(3):e0151623.

85. 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. *Laboratory animals*. 1992;26(3):200-5.



86. 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):1440-4.
87. 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. *Microbiological research*. 2017;196:17-25.
88. Ye C, Zhu X, Jing H, Du H, Segura M, Zheng H, et al. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(8):1203-8.
89. Bender MH, Weiser JN. The atypical amino-terminal LPNTG-containing domain of the pneumococcal human IgA1-specific protease is required for proper enzyme localization and function. *Molecular microbiology*. 2006;61(2):526-43.
90. Novick RP. Sortase: the surface protein anchoring transpeptidase and the LPXTG motif. *Trends in microbiology*. 2000;8(4):148-51.
91. Desvaux M, Dumas E, Chafsey I, Hebraud M. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS microbiology letters*. 2006;256(1):1-15.
92. Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods in enzymology*. 1995;248:183-228.
93. Ben Mkaddem S, Rossato E, Heming N, Monteiro RC. Anti-inflammatory role of the IgA Fc receptor (CD89): from autoimmunity to therapeutic perspectives. *Autoimmunity reviews*. 2013;12(6):666-9.
94. Gutzeit C, Magri G, Cerutti A. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunological reviews*. 2014;260(1):76-85.
95. Singh K, Chang C, Gershwin ME. IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2014;13(2):163-77.
96. Cerutti A, Chen K, Chorny A. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annual review of immunology*. 2011;29:273-93.
97. Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD. Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body. *Trends in immunology*. 2012;33(4):160-7.
98. Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(12):821-32.

99. van Riet E, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. *Vaccine*. 2012;30(40):5893-900.
100. Cerutti A, Cols M, Gentile M, Cassis L, Barra CM, He B, et al. Regulation of mucosal IgA responses: lessons from primary immunodeficiencies. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1238:132-44.
101. Mantis NJ, Rol N, Corthesy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal immunology*. 2011;4(6):603-11.
102. Janoff EN, Rubins JB, Fasching C, Charboneau D, Rahkola JT, Plaut AG, et al. Pneumococcal IgA1 protease subverts specific protection by human IgA1. *Mucosal immunology*. 2014;7(2):249-56.
103. De Paolis F, Beghetto E, Spadoni A, Montagnani F, Felici F, Oggioni MR, et al. Identification of a human immunodominant B-cell epitope within the immunoglobulin A1 protease of *Streptococcus pneumoniae*. *BMC microbiology*. 2007;7:113.
104. Clementi CF, Hakansson AP, Murphy TF. Internalization and trafficking of nontypeable *Haemophilus influenzae* in human respiratory epithelial cells and roles of IgA1 proteases for optimal invasion and persistence. *Infection and immunity*. 2014;82(1):433-44.
105. Oggioni MR, Memmi G, Maggi T, Chiavolini D, Iannelli F, Pozzi G. Pneumococcal zinc metalloproteinase ZmpC cleaves human matrix metalloproteinase 9 and is a virulence factor in experimental pneumonia. *Molecular microbiology*. 2003;49(3):795-805.
106. Blue CE, Paterson GK, Kerr AR, Berge M, Claverys JP, Mitchell TJ. ZmpB, a novel virulence factor of *Streptococcus pneumoniae* that induces tumor necrosis factor alpha production in the respiratory tract. *Infection and immunity*. 2003;71(9):4925-35.
107. Govindarajan B, Menon BB, Spurr-Michaud S, Rastogi K, Gilmore MS, Argueso P, et al. A metalloproteinase secreted by *Streptococcus pneumoniae* removes membrane mucin MUC16 from the epithelial glycocalyx barrier. *PloS one*. 2012;7(3):e32418.
108. Menon BB, Govindarajan B. Identification of an atypical zinc metalloproteinase, ZmpC, from an epidemic conjunctivitis-causing strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial pathogenesis*. 2013;56:40-6.
109. Surewaard BG, Trzcinski K, Jacobino SR, Hansen IS, Vughs MM, Sanders EA, et al. Pneumococcal immune evasion: ZmpC inhibits neutrophil influx. *Cellular microbiology*. 2013;15(10):1753-65.

110. Murphy G, Gavrilovic J. Proteolysis and cell migration: creating a path? *Current opinion in cell biology*. 1999;11(5):614-21.
111. Nakada M, Okada Y, Yamashita J. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2003;8:e261-9.
112. Nascimento Dda C, Durigan Rde C, Tibana RA, Durigan JL, Navalta JW, Prestes J. The response of matrix metalloproteinase-9 and -2 to exercise. *Sports medicine*. 2015;45(2):269-78.
113. Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2013;48(3):222-72.
114. Stawarski M, Stefaniuk M, Wlodarczyk J. Matrix metalloproteinase-9 involvement in the structural plasticity of dendritic spines. *Frontiers in neuroanatomy*. 2014;8:68.
115. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology*. 2013;28(6):391-403.
116. Bouchet S, Bauvois B. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), Pro-Matrix Metalloproteinase-9 (pro-MMP-9) and Their Complex Pro-MMP-9/NGAL in Leukaemias. *Cancers*. 2014;6(2):796-812.
117. Leib SL, Leppert D, Clements J, Tauber MG. Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infection and immunity*. 2000;68(2):615-20.
118. Paul R, Lorenzl S, Koedel U, Sporer B, Vogel U, Frosch M, et al. Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis. *Annals of neurology*. 1998;44(4):592-600.
119. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia*. 2002;39(3):279-91.
120. Wang P, Dai J, Bai F, Kong KF, Wong SJ, Montgomery RR, et al. Matrix metalloproteinase 9 facilitates West Nile virus entry into the brain. *Journal of virology*. 2008;82(18):8978-85.
121. Azeh I, Mader M, Smirnov A, Beuche W, Nau R, Weber F. Experimental pneumococcal meningitis in rabbits: the increase of matrix metalloproteinase-9 in cerebrospinal fluid correlates with leucocyte invasion. *Neuroscience letters*. 1998;256(3):127-30.

122. Grandgirard D, Gaumann R, Coulibaly B, Dangy JP, Sie A, Junghanss T, et al. The causative pathogen determines the inflammatory profile in cerebrospinal fluid and outcome in patients with bacterial meningitis. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:312476.
123. Leppert D, Leib SL, Grygar C, Miller KM, Schaad UB, Hollander GA. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2000;31(1):80-4.
124. Carlow DA, Gossens K, Naus S, Veerman KM, Seo W, Ziltener HJ. PSGL-1 function in immunity and steady state homeostasis. *Immunological reviews*. 2009;230(1):75-96.
125. Vandendries ER, Furie BC, Furie B. Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2004;92(3):459-66.
126. Zarbock A, Muller H, Kuwano Y, Ley K. PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *Journal of leukocyte biology*. 2009;86(5):1119-24.
127. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76(2):301-14.
128. Haridas D, Ponnusamy MP, Chugh S, Lakshmanan I, Seshacharyulu P, Batra SK. MUC16: molecular analysis and its functional implications in benign and malignant conditions. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014;28(10):4183-99.
129. Singh PK, Hollingsworth MA. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends in cell biology*. 2006;16(9):467-76.
130. Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal immunology*. 2008;1(3):183-97.
131. Jonckheere N, Van Seuningen I. The membrane-bound mucins: how large O-glycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies. *Critical reviews in oncogenesis*. 2008;14(2-3):177-96.
132. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Menon BB. Comparison of the transmembrane mucins MUC1 and MUC16 in epithelial barrier function. *PloS one*. 2014;9(6):e100393.
133. Perez BH, Gipson IK. Focus on Molecules: human mucin MUC16. *Experimental eye research*. 2008;87(5):400-1.

134. Chiavolini D, Memmi G, Maggi T, Iannelli F, Pozzi G, Oggioni MR. The three extra-cellular zinc metalloproteinases of *Streptococcus pneumoniae* have a different impact on virulence in mice. BMC microbiology. 2003;3:14.
135. Yamaguchi M, Nakata M, Sumioka R, Hirose Y, Wada S, Akeda Y, et al. Zinc metalloproteinase ZmpC suppresses experimental pneumococcal meningitis by inhibiting bacterial invasion of central nervous systems. Virulence. 2017:1-9.
136. Janeway CA, Murphy K, Travers P, Walport M. Immunobiologie. 3e ed. 39 rue des Minimes, Bruxelles2009.
137. Michaelsen TE, Kolberg J, Aase A, Herstad TK, Hoiby EA. The four mouse IgG isotypes differ extensively in bactericidal and opsonophagocytic activity when reacting with the P1.16 epitope on the outer membrane PorA protein of *Neisseria meningitidis*. Scandinavian journal of immunology. 2004;59(1):34-9.
138. Crawley A, Wilkie BN. Porcine Ig isotypes: function and molecular characteristics. Vaccine. 2003;21(21-22):2911-22.
139. Vermout S, Denis M, Losson B, Mignon B. Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. Annales de Medecine Veterinaire. 2003;147:393-401.
140. Vogel FR. Improving vaccine performance with adjuvants. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2000;30 Suppl 3:S266-70.
141. Pallares FJ, Schmitt CS, Roth JA, Evans RB, Kinyon JM, Halbur PG. Evaluation of a ceftiofur-washed whole cell *Streptococcus suis* bacterin in pigs. Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire. 2004;68(3):236-40.
142. Wisselink HJ, Vecht U, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE. Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine. The Veterinary record. 2001;148(15):473-7.
143. Yu H, Jing H, Chen Z, Zheng H, Zhu X, Wang H, et al. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. Emerging infectious diseases. 2006;12(6):914-20.
144. Zheng X, Zheng H, Lan R, Ye C, Wang Y, Zhang J, et al. Identification of genes and genomic islands correlated with high pathogenicity in *Streptococcus suis* using whole genome tiling microarrays. PloS one. 2011;6(3):e17987.

145. Slater JD, Allen AG, May JP, Bolitho S, Lindsay H, Maskell DJ. Mutagenesis of *Streptococcus equi* and *Streptococcus suis* by transposon Tn917. *Veterinary microbiology*. 2003;93(3):197-206.
146. Mullins MA, Register KB, Bayles DO, Butler JE. *Haemophilus parasuis* exhibits IgA protease activity but lacks homologs of the IgA protease genes of *Haemophilus influenzae*. *Veterinary microbiology*. 2011;153(3-4):407-12.
147. Almogren A, Kerr MA. Irreversible aggregation of the Fc fragment derived from polymeric but not monomeric serum IgA1--implications in IgA-mediated disease. *Molecular immunology*. 2008;45(1):87-94.
148. Jobin MC, Fortin J, Willson PJ, Gottschalk M, Grenier D. Acquisition of plasmin activity and induction of arachidonic acid release by *Streptococcus suis* in contact with human brain microvascular endothelial cells. *FEMS microbiology letters*. 2005;252(1):105-11.
149. Tanabe S, Grenier D. Endothelial cell/macrophage cocultures as a model to study *Streptococcus suis*-induced inflammatory responses. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2009;55(1):100-6.
150. Niu Q, Huang X, Zhang L, Li Y, Li J, Yang J, et al. A neutral protease from *Bacillus nematocida*, another potential virulence factor in the infection against nematodes. *Archives of microbiology*. 2006;185(6):439-48.
151. Pallares FJ, Halbur PG, Schmitt CS, Roth JA, Opriessnig T, Thomas PJ, et al. Comparison of experimental models for *Streptococcus suis* infection of conventional pigs. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*. 2003;67(3):225-8.
152. Walker MJ, Barnett TC, McArthur JD, Cole JN, Gillen CM, Henningham A, et al. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of Group A Streptococcus. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27(2):264-301.
153. Patel S. Drivers of bacterial genomes plasticity and roles they play in pathogen virulence, persistence and drug resistance. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2016;45:151-64.
154. 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).

155. 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. *Infection and immunity*. 2008;76(9):3901-10.
156. Seitz M, Beineke A, Seele J, Fulde M, Valentin-Weigand P, Baums CG. A novel intranasal mouse model for mucosal colonization by *Streptococcus suis* serotype 2. *Journal of medical microbiology*. 2012;61(Pt 9):1311-8.
157. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*. 2004;22(5):460-6.

## Annexe I:

### **Complex Population Structure and Virulence Differences among Serotype 2 *Streptococcus suis* Strains Belonging to Sequence Type 28**

Taryn B.T. Athey<sup>1</sup>, Jean-Philippe Auger<sup>2</sup>, Sarah Teatero<sup>1</sup>, Audrey Dumesnil<sup>2</sup>, Daisuke Takamatsu<sup>3,4</sup>, Jessica Wasserscheid<sup>5</sup>, Ken Dewar<sup>5</sup>, Marcelo Gottschalk<sup>2</sup>, and Nahuel Fittipaldi<sup>1,6\*</sup>

#### **Affiliations:**

<sup>1</sup> Public Health Ontario, Toronto, Ontario, Canada

<sup>2</sup> Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada

<sup>3</sup> Bacterial and Parasitic Diseases Research Division, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Japan

<sup>4</sup> The United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University, Gifu, Japan

<sup>5</sup> Department of Human Genetics, McGill University and Génome Québec Innovation Centre, Montreal, Quebec, Canada

<sup>6</sup> Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

**Short title:** Population Structure of ST28 *Streptococcus suis*

**Keywords:** *Streptococcus suis*, Whole-genome sequencing, MLST, ST28, Recombination, Virulence

\* Corresponding author: nahuel.fittipaldi@oahpp.ca

Publié chez: PLoS One, 2015 Sep 16;10(9):e0137760. doi: 10.371/journal.pone.0137760

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

Je suis co-auteur de cet article. J'ai participé aux analyses des génomes lors de mon stage dans le laboratoire du Dr Fittipaldi à Toronto à l'hiver 2015. J'ai également participé à la correction de ce manuscrit.



## **Abstract**

*Streptococcus suis* is a major swine pathogen and a zoonotic agent. Serotype 2 strains are the most frequently associated with disease. However, not all serotype 2 lineages are considered virulent. Indeed, sequence type (ST) 28 serotype 2 *S. suis* strains have been described as a homogeneous group of low virulence. However, ST28 strains are often isolated from diseased swine in some countries, and at least four human ST28 cases have been reported. Here, we used whole-genome sequencing and animal infection models to test the hypothesis that the ST28 lineage comprises strains of different genetic backgrounds and different virulence. We used 50 *S. suis* ST28 strains isolated in Canada, the United States and Japan from diseased pigs, and one ST28 strain from a human case isolated in Thailand. We report a complex population structure among the 51 ST28 strains. Diversity resulted from variable gene content, recombination events and numerous genome-wide polymorphisms not attributable to recombination. Phylogenetic analysis using core genome single-nucleotide polymorphisms revealed four discrete clades with strong geographic structure, and a fifth clade formed by US, Thai and Japanese strains. When tested in experimental animal models, strains from this latter clade were significantly more virulent than a Canadian ST28 reference strain, and a closely related Canadian strain. Our results highlight the limitations of MLST for both phylogenetic analysis and virulence prediction and raise concerns about the possible emergence of ST28 strains in human clinical cases.

## Introduction

*Streptococcus suis* is a major swine pathogen responsible for septicemia, meningitis and other diseases in swine that often result in severe economic losses to the porcine industry (1). *S. suis* is also an emerging zoonotic agent (2). Two outbreaks of human *S. suis* disease occurred in China in 1998 and 2005, affecting hundreds of people and killing more than forty (3). Relatively recent reports found that this pathogen is the first and second-most commonly reported cause of adult streptococcal meningitis in Vietnam and Thailand, respectively (4, 5). On the other hand, in European countries, human *S. suis* disease has never been associated with large outbreaks, and has mostly affected workers in the swine industry (6). Relatively very few cases of human *S. suis* disease have been reported in North America (6). Most cases of animal and human *S. suis* infection are caused by serotype 2 strains (7). Interestingly, the percentage of *S. suis* serotype 2 strains recovered from diseased pigs has historically been lower in North America than in other parts of the world (8).

Increased research in recent years has identified a myriad of virulence factors involved in the pathogenesis of infection of *S. suis* serotype 2 (9). *S. suis* strains belonging to serotype 2 can be divided by multilocus sequence typing (MLST), into at least 16 sequence types (STs) with closely related STs grouped into ST clonal complexes (CCs) (7, 10). Most virulence studies have been carried out with a limited number of ST1 and ST7 serotype 2 strains, which were predominately isolated from diseased pigs in the Netherlands, France, Spain, the United Kingdom, and China (7, 9). While ST1 and ST7 strains are more prevalent in these and a few other countries, previous work has shown that in North America ST25 and ST28 strains predominate, accounting for 44% (ST25) and 51% (ST28) of all strains investigated (11). The *S. suis* MLST scheme is based on the sequence of seven housekeeping genes (10). Thus, a significant amount of information such as DNA polymorphisms occurring in other parts of the genome, and gene content variation encoded in mobile genetic elements, is not captured by this typing method. Virulence studies showed that one ST28 strain from Canada was significantly less virulent than ST1 and ST25 strains (11). However, little is known about variation within the ST28 group. Assessing this intra-ST variation is important. For example, earlier work showed that ST28 *S. suis* strain 1330 was avirulent in both mice and swine (12). More recently,

it was shown that an ST28 strain isolated from the tonsils of an asymptomatic pig in China had very low virulence in a swine model of infection (13). However, ST28 strains are often isolated from diseased swine in China and Japan (14-16), and at least four human ST28 cases have been reported in Thailand and Japan (17-19). Moreover, some have speculated that while porcine ST28 *S. suis* infections in North America are most often associated with a concomitant viral infection, in some Asian countries ST28 strains may be the primary pathogen (1). These findings support the hypothesis that not all ST28 strains have the same virulence potential. They also raise doubts about the universal value of previous virulence studies conducted with only one ST28 organism.

Here, we sought to use genomics to analyze the population structure of a collection of 51 *S. suis* serotype 2 ST28 strains isolated in four different countries (Canada, the United States of America, Japan, and Thailand), and to investigate virulence traits of selected ST28 strains. We report a complex population structure among ST28 strains, which were shown to belong to at least 5 different clades following whole-genome-single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. We also show important virulence differences between some of these genetic groups.

## **Materials and Methods**

### **Strains, culture conditions and DNA preparation**

A total of 50 *S. suis* serotype 2 ST28 strains isolated from diseased pigs (20 from Canada, 15 from USA, and 15 from Japan) and one strain isolated from a human case in Thailand, collected from 1990 to 2011, were used (S1 Table). These strains had previously been serotyped, and typed by MLST using standard procedures (10, 20). Strains were cultured on Columbia blood agar plates containing 5% sheep blood, and grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Liquid cultures were grown in Todd-Hewitt broth supplemented with 0.2% yeast extract. DNA was prepared from 5 ml of overnight *S. suis* cultures using the QIAamp DNA minikit (Qiagen, Toronto, ON, Canada) following the manufacturers' protocol for Gram positive organisms.

### **Whole-genome sequencing and closure of a reference ST28 genome**

Whole genome sequencing libraries were prepared for all 51 isolates using Nextera XT kits (Illumina, San Diego, CA, USA) and sequenced as paired-end reads with either a HiSeq 2500 (101 bp + 101 bp) or a MiSeq (150 bp + 150 bp) instrument. Parsing of the multiplexed sequencing reads and removal of barcode information was done using onboard software. Short-read sequences have been deposited in the Sequence Read Archive under accession number SRP058193. MLST STs were derived directly from the short-read data using SRST2 software (21) and used to confirm previous MLST results. We next sequenced to closure the genome of strain NSUIS002 using SMRT sequencing (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA). This strain had previously been named 1088563 and was selected for genome closure because 1) it belonged to the more prevalent Canadian group and 2) virulence data in a murine model of infection had previously been obtained (11). Briefly, two SMRT cells of sequence were run, generating 51,367 reads exceeding 3 kb in length (average read length of 6.4 kb; 112X coverage for reads >3 kb). Next, we used HGAP v2 (22) to correct the long reads and Celera Assembler 7.0 (23) to assemble the corrected reads, followed by two rounds of polishing with Quiver (<https://github.com/PacificBiosciences/GenomicConsensus>). The coverage of the final assembly in reads >3 kb was 146X. To assess base-calling accuracy in the Pacific Biosciences assembly, Illumina short-reads were aligned to the assembly using BLAT (24). The genome

assembly was completely concordant with full length perfectly aligning Illumina short-reads. The genome was formatted to begin at the first nucleotide of the intergenic region immediately preceding gene *dnaA*, encoding a chromosomal replication initiation protein. The finalized genome was annotated using Prokka (25) and deposited in GenBank under Accession number CP011419.

### **Core-genome, assessment of recombination, phylogenetic analysis, and antibiotic resistance genes**

The A5 pipeline was used for *de novo* assembly of Illumina sequenced strains (26). Obtained contigs were ordered relative to the NSUI002 reference genome using Progressive Mauve (27). Then, pseudochromosomes were created for the remaining 50 strains by concatenating the ordered contigs using the sequence NNNNNCATTCCATTCATTAATTAATTAATGAATGAATGNNNNN, which introduces start and stop codons in all 6 reading frames, as a separator. Pseudochromosomes were annotated using Prokka. We next defined a core chromosome following the method of de Been *et al* (28). Briefly, InParanoid (29) and QuickParanoid (<http://pl.postech.ac.kr/QuickParanoid>) were used to identify ortholog gene clusters between all ST28 strains. Genes encoded in mobile genetic elements and ortholog genes varying in length by more than 9 bp were not considered. Next, for each ortholog group, the sequences were aligned using Muscle v3.7 (30) and gaps were removed using trimAl v1.2 (31). These aligned and trimmed genes were then reassembled for each strain in the order in which the gene appeared in the NSUI002 reference. Recombination occurring in the so defined core genome was assessed using BRATNextGen (32) run with 20 iterations and 100 replicates, using a *p*-value of 0.05 as the significance cutoff. For phylogenetic analysis, SNPs relative to the genome of reference strain NSUI002 were identified for each of the 50 additional ST28 strains using VAAL (33). A matrix file containing the genotype of all strains at each polymorphic locus was then created from the VAAL polymorphism output data using a custom script. Next, all SNPs occurring in areas of the genome not found in the above-defined core genome (i.e. those occurring in mobile genetic elements, intergenic regions, and NSUI002 genes without an ortholog in all 51 ST strains) were discarded. As well, we eliminated SNPs occurring in genes that were deemed to have undergone recombination based on BRATNextGen

results. Then, for each individual strain, SNPs were concatenated in order of occurrence relative to the genome of the reference strain and converted to a multiFASTA sequence. Neighbor-joining phylogenetic trees (1,000 bootstrap replications) were generated with SplitsTree4 (34). We used SRST2 and a database listing 1913 variants of genes encoding antimicrobial resistance (21) (<https://github.com/katholt/srst2>) to test for presence or absence of genetic determinants of antimicrobial resistance in the genomes of the ST28 strains. Genome visualizations were created using BRIG (35) and edited using Adobe Illustrator.

### **Experimental mouse infections**

We used a validated C57BL/6 murine model of infection (36). Briefly, 75 mice (aged 6-10 weeks, Jackson Laboratory) were acclimatized to standard laboratory conditions with a 12-h light/12-h dark cycle and unlimited access to water and food. On the day of the experimental infection, five groups of 15 animals each were defined. Group 1 received a 1-ml injection of the Canadian ST28 strain NSUI002 suspension (at  $1 \times 10^8$  CFU), delivered using the intraperitoneal route. Groups 2, 3, 4, and 5 received the same amount of strains NSUI062, NSUI010, NSUI081, and NSUI036, respectively. Mice were monitored 3 times/day for the first 72 h and then twice daily until 14 days post-infection (pi) for clinical signs and assigned clinical scores as previously described (37). Blood was collected 24 h and 48 h pi from the tail vein (5  $\mu$ l), appropriately diluted and used to evaluate bacterial load by plating onto sheep blood agar plates and enumeration (37). All experiments involving mice were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care. Humane endpoints approved by the Animal Welfare and Ethics Committee, Université de Montréal, were used. Animals were evaluated every 8 h during the first 72 h and twice daily after, and clinical scores were assigned. Animals presenting a score of 4 or 5 (moderately sick) were evaluated every 4 h. Mice presenting a score of 6 were evaluated every 4 h and euthanized if their score remained constant after 24 h. Mice presenting a score of 7 were immediately euthanized. Animals were euthanized using inhaled CO<sub>2</sub>. Animal suffering was minimized by careful and timed evaluation of animals, by closely following the scoring grid, and by immediate euthanasia, if required.

## **Statistical Analysis**

The R package (38) was used for statistical analysis. Differences in survival curves were assessed using log-rank test. Differences in bacteremia were assessed using ANOVA on ranks and Tukey test at 24 h and 48 h post-infection (pi). A *P*-value of less than 0.05 was used as the cutoff for significance.

## Results and Discussion

### Genome closure of reference strain NSUI002 and comparison to other *S. suis* genomes

We first sequenced to closure the genome of Canadian ST28 strain NSUI002. The genome was a circular chromosome of 2,255,345 bp with a G+C content of 41.1 % (Fig. 1A). The GC content of the NSUI002 genome was similar to that of the 19 *S. suis* genomes previously sequenced to closure (S2 Table). It was also one of the largest *S. suis* genomes sequenced so far, and the largest genome of a serotype 2 strain. One reason for the difference in genome sizes between strains is the presence in NSUI002 of one large mobile genetic element (MGE, ~ 83 kbp) spanning from position 1,105,623 to 1,188,671, which carries gene *tetO* encoding resistance to tetracycline, and several other MGE scattered throughout the genome (Fig. 1A). We identified 2,221 CDSs in NSUI002. This is a slightly higher number than found in the very recently finished genome of avirulent ST28 Chinese strain 05HAS68 (2,009 CDSs) (13). Most other closed *S. suis* genomes belong to either ST1 or ST7 strains, both included in MLST CC1.

Based on previous reports that questioned the annotation quality of some of the *S. suis* closed genomes (39), we chose strain P1/7 as a representative member of CC1 strains to compare the ST28 genomes. Ortholog analysis revealed 1,656 NSUI002 CDSs common between Canadian ST28 strain NSUI002, Chinese ST28 strain O5HAS68 and reference ST1 strain P1/7 (Fig. 1B). NSUI002 had 192 unique CDSs, most of them encoded in MGEs. A total of 34 NSUI002 CDSs had an orthologue in P1/7. When the Illumina reads for NSUI002 were aligned to the P1/7 reference genome using VAAL, there was a total of 42,896 SNPs between them, as well as 1196 deletions and 738 insertions. Key differences between NSUI002 and P1/7 genomes include the absence in NSUI002 of virulence markers *sly* and *epf* (encoding a hemolysin known as suilysin, and a secreted protein known as extracellular factor, respectively) (40-42). NSUI002 possessed a *srtG* pilus island which was absent from P1/7 (43). The two strains possessed gene *mrp*, encoding a muramidase-released protein that has been described as important but not essential in virulence (44, 45). Using the typing scheme developed by Silva *et al* (46), which amplifies a short region of the *mrp* gene, *in silico* PCR identified that strains P1/7 and NSUI002 both possess the 1148 *mrp* variant. However, when comparing the full predicted translated MRP sequences we identified several amino acid differences between the two strains (S1 Fig.). In



addition, although it has been reported that *mrp* was absent from the genome of Chinese ST28 isolate O5HAS68 (13), we did find this gene in that isolate. When we inspected the reported O5HAS68 genome, *in silico* PCR determined it had *mrp*<sup>S</sup> variant (S1 Fig.).

Consistent with previous findings in ST28 strains (43), NSUI002 genome had a complete *srtF* pilus cluster, but did not possess pilus cluster *srtBCD*. A truncated *srtE* pilus cluster (lacking genes encoding pilin subunits) was also identified. The genome of strain NSUI002 possessed the same two-component systems (TCSs) and global virulence regulators previously identified in strain O5HAS68 (13). Namely, NSUI002 contains *ihk/irr*, *ciaRH*, *covR* and *vicK*. Genes encoding other regulators such as *virR/virS* and *revS*, present in strain P1/7 (39), were absent from the NSUI002 genome (Table 1). Other regulators such as *salK/salR* and *nisK/nisR*, so far only found among Chinese ST7 strains (47), were also not identified in the NSUI002 genome. Homology between NSUI002 and ST1 P1/7 CDSs was lower than between NSUI002 and O5HAS68 (Figs. 1 A and B). Both ST28 strains shared a significant number of orthologous CDSs that were not present in P1/7 (Fig. 1B). Genome alignments using progressiveMauve (27) identified several areas of genome rearrangements, including inversions (Fig. 1C) between the ST28 strains. The majority of these rearrangements occurred at genome areas encoding transposases (76.7%). Other genomic rearrangements occurred at rRNA operons, or sites encoding phage integrases and/or phage related proteins. Finally, we identified that while both ST28 strains possessed gene *tetO*, encoding resistance to tetracycline, only the Canadian ST28 strain NSUI002 possessed gene *ermB*, encoding resistance to macrolides. Resistance to tetracycline and to macrolide and glycosamides is carried in different MGE inserted in different regions of the NSUI002 genome (Figs. 1A and S2).

### **Sequencing of additional ST28 strains and presence of markers of antimicrobial resistance**

We next sequenced the genomes of 50 additional ST28 serotype 2 strains using Illumina technology. The number of short reads obtained for each strain and the calculated coverage are presented in S1 Table. ST28 was confirmed in all 50 strains by extracting MLST information directly from the short-read WGS data using SRST2 (21). We also used SRST2 to identify genes associated with antimicrobial resistance in our strain collection. This information is important to obtain, as *S. suis* is a microorganism that can live in different animal hosts as well as the

human host and thus there is potential for possible intersections between animal and human resistomes (48, 49). Gene *tetO* was identified in 49 of the strains, while gene *ermB* was present in 41. Gene *lnuC*, associated with clindamycin and lincomycin resistance, and genes *ant6* and *aph3'*, associated with resistance to aminoglycosides, were identified in 8 and 2 of the strains, respectively (S1 Table). Resistance to these antimicrobials has previously been identified in several other diverse *S. suis* isolates (48). We did not notice any clear indication of geographical differences in antimicrobial resistance markers among the strains in this study.

### **Complex population structure of ST28 *S. suis* revealed by phylogenetic analysis**

We next defined the ST28 *S. suis* core and pan genomes by performing ortholog analysis between the reference NSUI002 genome and annotated pseudochromosomes of all other 50 ST28 strains. We identified 1,786 core gene clusters and 2,776 pan genome clusters (S3 Fig.). Previously, Zhang *et al.* studied 13 strains of *S. suis* belonging to seven different serotypes and at least six different STs, and defined a core genome size of 1,343 genes and a pan genome of 3,585 genes (50). Since these authors analyzed strains of highly diverse genetic backgrounds, a larger core genome and smaller pan genome was expected in our cohort. We also identified a total of 31,488 non-redundant SNPs between all strains and the NSUI002 reference. To establish phylogenies, we defined a reduced ST28 core genome by first eliminating from the analysis gene clusters encoded in MGEs, and those CDSs present in all strains but whose length differed by > 9bp among the isolates. This left a final number of 1422 core gene clusters (1,269,771 bp) between the 51 ST28 *S. suis* strains under investigation. In this reduced core genome, 11,305 SNPs were identified. However, most of these SNPs were clustered in a few discrete areas of the core genome, which is suggestive of recombination.

Recombination is common among some streptococcal species for which extensive genetic recombination within populations has been observed (51-53). Extensive recombination among highly diverse *S. suis* isolates has also very recently been described (54). To assess recombination in more detail, we used Bayesian analysis, which revealed 49 regions of recombination containing 441 genes (Fig. 2A and S3 Table). Neighbor joining phylogenetic analysis using the 1,421 informative SNPs remaining after exclusion of areas of the core genome having undergone recombination revealed two singletons (NSUI091, from Canada, and

NSUI003 isolated in the USA), and two larger clades (Fig. 2B). One of them, identified here as clade I, comprised most of the Canadian strains in our collection, including the NSUI002 reference strain, and three US strains. The second major clade could be divided into four different subclades, identified here as clades II-V.

Clades II and III had a strong signal of geographical structure: clade II contained solely US isolates, while clade III was formed solely by strains isolated in Japan. Interestingly, while most strains found in clade IV were isolated in Japan, one Canadian and one US strain were also found in this clade. Import into Japan of live pigs from either the US or Canada for the purposes of breeding occurs frequently. Thus, we hypothesize that clade IV may have originated from *S. suis* ST28 strains that were introduced to Japan by import of live hogs from North America. Similarly, clade V had no unambiguous signal of geographic clustering and was formed by three US, one Canadian, one Japanese, and one Thai strain, the latter isolated from a case of human disease (Fig. 2B). We next compared gene content among the five clades defined by phylogenetic analysis. The total number of common genes was 1795 (Fig. 3). As a group, clade I strains did not possess unique gene content, while one unique gene cluster was found among strains of each clades II and IV. A total of 39 genes clusters were specific of clade III strains. Finally, clade V strains had 8 unique gene clusters. S4-S8 Tables list genes found in all strains of each clade.

### **Significant differences in virulence between ST28 *S. suis* strains of clades I and V**

Previous studies that each analyzed one ST28 strain have led to the notion that ST28 *S. suis* are typically avirulent or of low virulence (11-13). However, this notion can be challenged based on reports describing frequent isolation of ST28 strains from diseased pigs in some countries, as well as four human cases of *S. suis* ST28 disease (14-19). Inasmuch as our genomics and phylogenetic analysis revealed that rather than being a homogeneous group of organisms, ST28 strains are genetically heterogeneous, we hypothesized that these genetic differences may, in some cases, correlate with dissimilar virulence potential. To begin to test this hypothesis we compared the virulence of two selected clade I strains (NSUI002 and NSUI062) and three selected clade V strains (NSUI036, NSUI081 and NSUI010) in a murine model of infection. We chose clade I because previous results had demonstrated low virulence of strain NSUI002

in a murine infection model (11); clade V strains were selected because there was no obvious geographic clustering structure and because this clade included a human isolate. Although swine is *S. suis* natural host, mice have frequently been used as a model to study the pathogenesis of *S. suis* diseases. Indeed, several reliable murine models using different mouse strains and routes of infection have been validated for *S. suis* (36, 55-57). Here we used one of these models that uses C57BL/6 mice and the intraperitoneal route of infection (36). Consistent with previous findings (11), no mice in the NSUI002 group died (Fig. 4A) nor showed clinical signs associated with *S. suis* infection, with the exception of slight depression following inoculation which subsided 24 h pi. Bacteria could not be isolated from the blood of most mice in this group at 24 h pi (Fig. 4B). Similar results were observed in the group that received clade I strain NSUI0062, although bacteremia was observed in more animals at 24 and at 48 h pi (Figs. 4B and 4C) in this group than in the NSUI002 group. In strong contrast, mice that received clade V strain NSUI036 showed severe clinical signs associated with septicemia, such as depression, swollen eyes, weakness, and prostration during the first 24 h pi. In fact, several mice died or met standard criteria for euthanasia during the first 4 days pi. There were several cases of meningitis between day 4 and day 6 pi in this group. *S. suis* was isolated in pure cultures at high titers ( $> 1 \times 10^7$  CFU/ml in some animals) from blood samples in the NSUI036 group (Figs. 4B and 4C). The other clade V strains evaluated here (NSUI010 and NSUI081) also caused relatively severe clinical signs and induced high bacteremia in inoculated mice (Figs. 4B and 4C). Although mortality was lower than in the NSUI036 group (Fig. 4A), statistical analysis revealed significant differences in survival between NSUI002 and the two clade I strains.

Inspection of unique gene content in clade V strains identified two genes encoding an ABC-type cobalt transport system. This ABC transporter has previously been found to be upregulated *in vivo* by virulent *S. suis* strains (58). Another key difference between clade V and clade I strains was that in the latter group a gene encoding a zinc-dependent IgA protease previously found to be important in *S. suis* virulence (59, 60) was disrupted by a transposon insertion, while the gene was intact in clade V strains (Fig. 5). Interestingly, in clade I strains, an ICE carrying *tetO*, which is absent from clade V strains, lies between another gene encoding a different putative zinc-dependent protease present in strains of both clades (Fig. 5). We also discovered that NSUI036, the most virulent clade V strain, and the only human case included in our

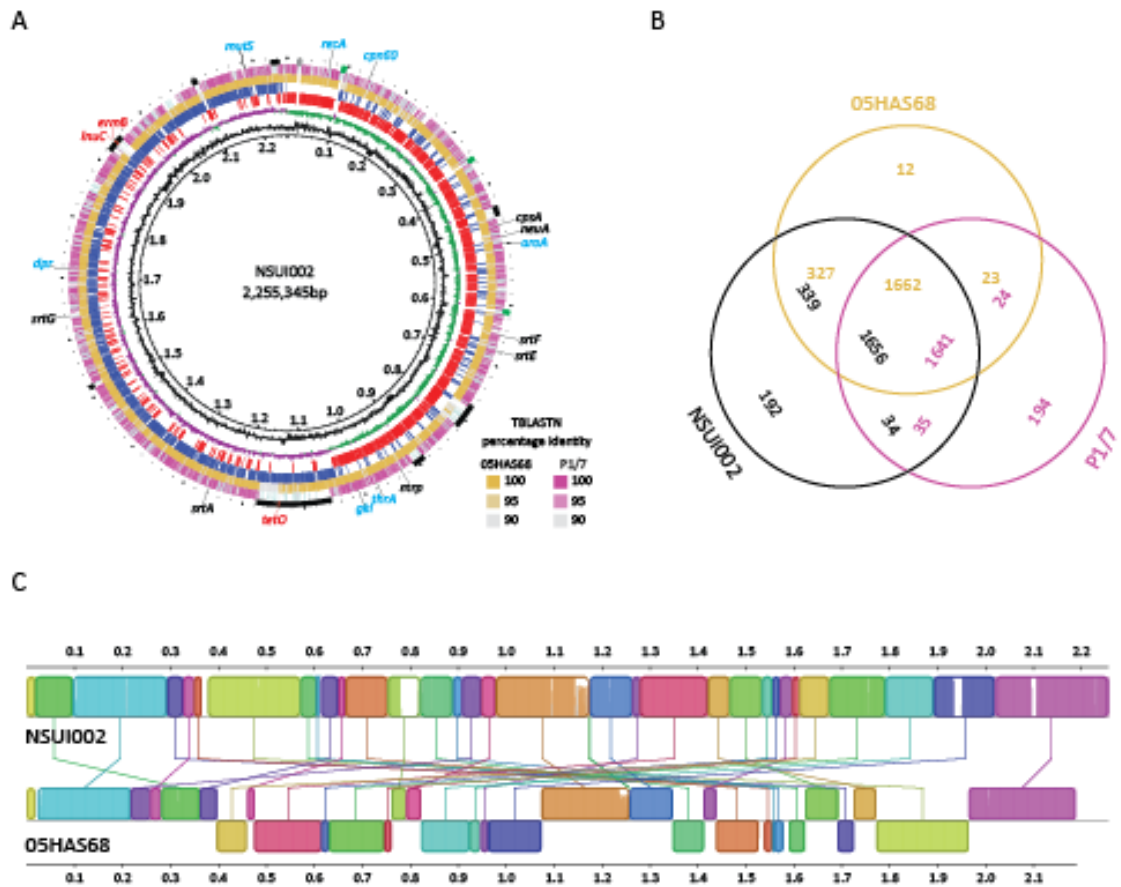
collection, had a 1bp insertion in the *sgp2* gene predicted to result in premature termination of translation of Sgp2, the putative adhesin of the *srtG* pilus (61). Previous reports in *Streptococcus pyogenes* have shown that strains impaired in pilus production are better fit to survive in blood and cause invasive disease (62).

### **Concluding remarks**

Recent technological advances in whole-genome sequencing now permit the cost-effective and rapid generation of data that can be used to precisely inform us about the population structure of pathogenic or commensal bacteria (63). The characteristics of *S. suis* serotype 2 strains belonging to ST28 (highly prevalent in North America) are poorly known. The use of whole-genome sequencing allowed us to uncover a relatively high level of genetic diversity among a large collection of strains isolated from diseased pigs and humans in different geographies. Experimental animal infections also discovered significant differences in virulence among strains belonging to two of the five different clades identified by whole-genome SNP-based phylogenetic analysis. Our results clearly highlight the limitations of typing *S. suis* strains using the commonly used MLST scheme (10), which failed to reveal the genetically heterogeneous nature of our strain collection. Furthermore, it now seems apparent that using MLST alone as a predictor of *S. suis* strain virulence can be misleading. Indeed, previous reports have proposed that ST28 *S. suis* strains are of low virulence (7, 11, 13), while here we show that at least some ST28 serotype 2 strains can induce severe disease in an experimental infection model. A key difference between these previous studies and this work is that, while the former drew their conclusions from results obtained after evaluation of the virulence of a single ST28 strain, here we used a population-based strain collection. In this regard, our results are consistent with previous findings describing frequent isolation of ST28 strains from diseased swine, and from human cases in China, Japan and Thailand (14-18). Our work is the first step towards better characterization of this diverse group of organisms heretofore considered genetically homogeneous. Further mining of the genome data generated in this study, coupled with mutagenesis of selected virulence factor candidates and animal studies will be instrumental in understanding the genetic basis of virulence differences among serotype 2 ST28 *S. suis* strains.

## **Acknowledgements**

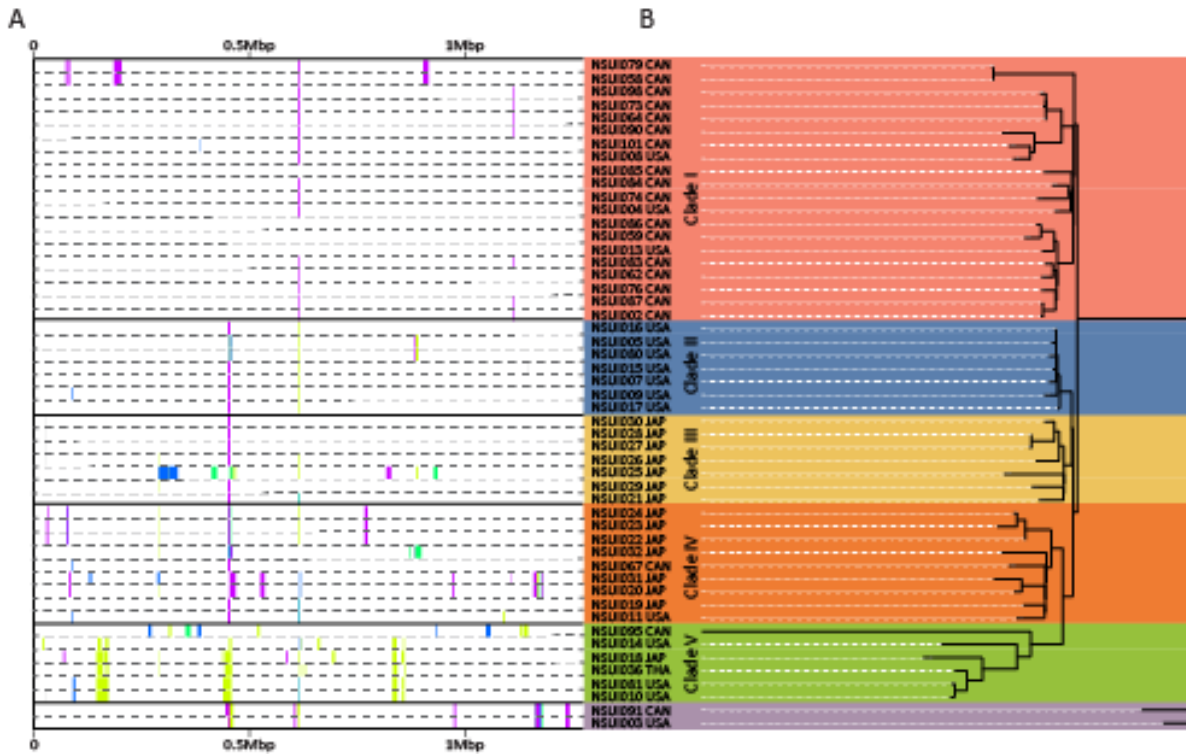
We thank Aimin Li and the staff at Public Health Ontario Genome Core facility, and Dax Torti, University of Toronto Donnelly Centre, for Illumina sequencing of the *S. suis* ST28 strains. We thank Geneviève Geneau and Alfredo Staffa and the staff at the McGill University and Génome Québec Innovation Centre for PacBio sequencing. We are grateful to Sonia Lacouture (University of Montreal) for help with bacterial strain collection. We thank Charles Keown-Stoneman (University of Guelph) for help with statistical analysis. We also thank Mildred Haley (United States Department of Agriculture) for data on US hog exports to Japan.



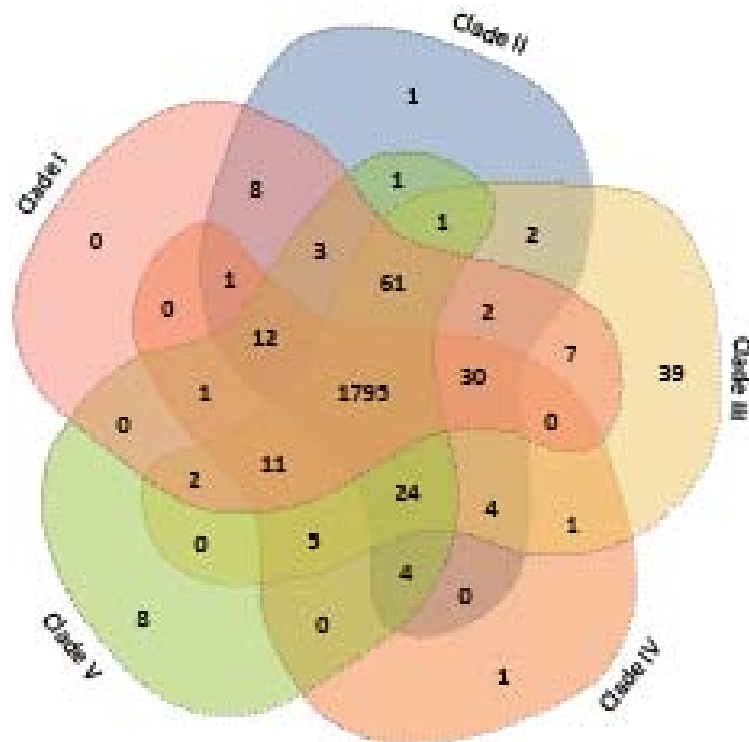
**Fig. 1. A) Genome atlas of Canadian *S. suis* ST28 strain NSUI002.** Depicted data from innermost to outermost circles represent genome size in Mbp (circle 1); percent G+C content (circle 2); GC skew (circle 3),  $(G-C)/(G+C)$  averaged over a moving window of 10,000 bp, with excess G and excess C shown in green and purple, respectively; annotated coding sequences (CDSs) encoded on the forward/direct (circle 4, red), and reverse/complementary (circle 5, blue) chromosomal strands; TBLASTN comparisons of the CDSs predicted in ST28 strains NSUI002 and O5HAS68 (circle 6, percent identity defined in the Fig.), TBLASTN comparisons of ST28 strain NSUI002 and ST1 strain P1/7 (circle 7, percent identity defined in the Fig.); reference genome landmarks (circle 8) : ribosomal RNAs are labeled in green; mobile genetic elements are labeled in black, genes used in the *S. suis* MLST scheme are labeled in light blue; genes encoding resistance to antimicrobial agents are labeled in red; other genes are labeled in black. **B) Venn diagram depicting unique and shared CDSs in each of the *S. suis* strains as identified by ortholog analysis.** Each strain is represented by one color, and the number of

CDSs are displayed in the same color. Numbers in the intersectional regions indicate CDSs shared by two or three strains. Since there may be more than one CDS in the same ortholog cluster, number of CDSs in the intersections are slightly different between strains C) **Collinearity of the genomes of *S. suis* ST28 strains NSUI002 and 05HAS68.** The genomes of the strains were aligned using progressiveMauve. Sequence alignments that are free of rearrangements are shown as colored local collinear blocks (LCBs). Sequence inversions are denoted by differential positioning of the LCBs relative to a reference axis. Several genome rearrangements between NSUI002 and 05HAS68 are noticeable.

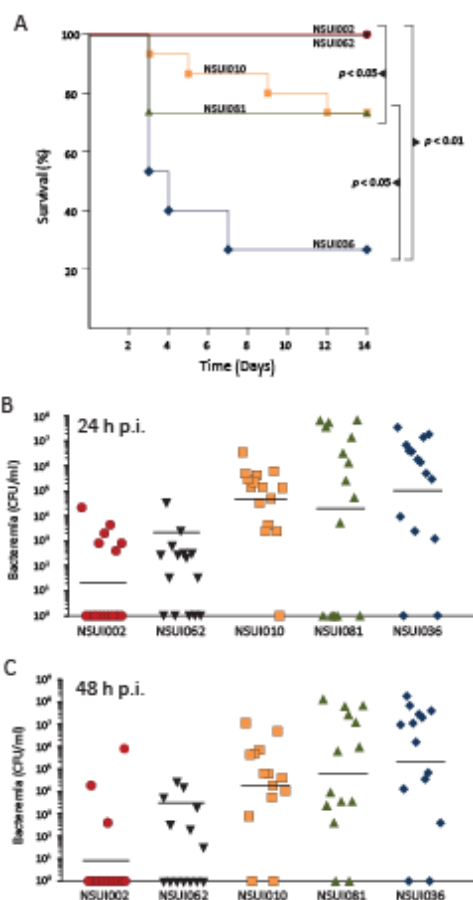




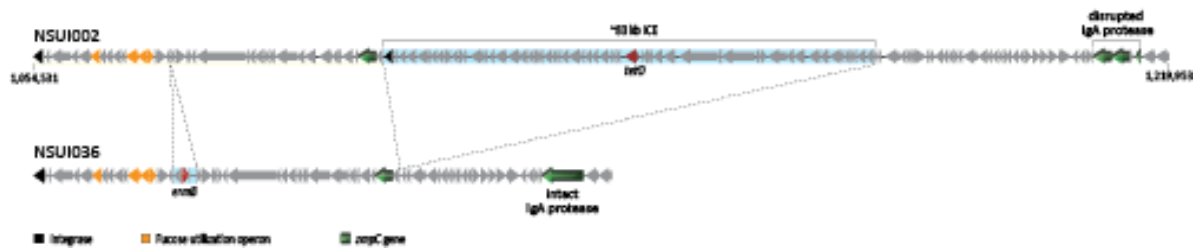
**Fig. 2. A) Results of Bayesian analysis of recombination for the 51 ST28 *S. suis* strains.** The names and countries of isolation of the strains are shown on the right. The colored bars denote the recombination events in the strains along the core genome. The coloring of the bars at a specific genomic location reflects the clustering of the recombination events into groups, and is unrelated to other bars at distant genomic locations. CAN: Canada, USA: United States of America; JAP: Japan; Tha: Thailand. **B) Neighbor-joining phylogenetic tree depicting the relationships between the 51 ST28 *S. suis* strains.** The tree was constructed using 1,421 SNPs identified against the core genome (see text for details). Two singletons and five distinct clades (I to V) were identified.



**Fig. 3. Venn diagram depicting unique and shared ortholog gene clusters in each of the five clades defined among the *S. suis* strains.** Numbers shown in the different sections indicate the numbers of ortholog groups. The two ST28 singletons were not included in this analysis.



**Fig. 4. Results of animal experimental infections.** A) Survival of mice inoculated with the different *S. suis* ST28 strains. All the mice in the NSUI002 and NSUI062 groups survived, while approx. 75 % of the animals in the NSUI036 group died from septicemia or meningitis. Animals that received strains NSUI010 or NSUI081 showed reduced mortality compared to NSUI036. Significant differences in survival (LogRank test) are depicted in the Fig. **Bacteremia at 24 h (B) and 48 h (C) post-infection (pi)**. NSUI002 and NSUI062 were isolated at lower titers than the other three strains following inoculation. The different symbols represent values from individual mice. The horizontal lines indicate the geometrical mean for each group. Significant differences in isolation from blood were noted at 24 h between NSUI036 and NSUI002 and NSUI062 and 48 h pi between NSUI002 and NSUI010, NSUI081 and NSUI036 and between NSUI062 and NSUI036 only (ANOVA on ranks,  $P < 0.05$ ).



**Figure 5. Genetic organization and predicted open reading frames of NSUI002 (clade I) and NSUI036 (clade V) regions containing a fucose utilization operon and *zmpC* genes.** The region spans from position 1,054,531 to 1,219,953 in strain NSUI002, and contains 152 CDSs. In NSUI036, the region is notably smaller (83,658 bp). Differences in size are mainly due to the absence in the genome of strain NSUI036 of an approx. 83 kbp mobile genetic element (MGE), highlighted in light blue, that contains gene *tetO*. Other differences include a small MGE (highlighted in light blue) in NUI036 that contains gene *ermB*. In the conserved area, we observed a high degree of gene content conservation, with the exception of a *zmpC* gene also known as *iga*, encoding an IgA protease involved in *S. suis* virulence (59, 60), which is intact in NSUI036 but disrupted by a transposon insertion in strain NSUI002.

**Table 1.** Presence of two component or standalone global regulators in the different ST28 and ST1 strains.

Regulator	NSUI002 (ST28)	05HAS68 (ST28)	P1/7 (ST1)
<i>ihK/irr</i>	+	+	+
<i>ciaRH</i>	+	+	+
<i>vicK</i>	+	+	+
<i>salK/salR</i>	-	-	-
<i>nisK/nisR</i>	-	-	-
<i>virR/virS</i>	-	-	+
<i>covR</i>	+	+	+
<i>revS</i>	-	-	+

**Supporting informations** (Disponibles sur le site web de PLoS One)

S1 Fig. ClustalW alignment of the predicted translated sequences of the different *mrp* gene variants of ST28 strains 05HAS68 and NSUI002, and ST1 strain P1/7.

S2 Fig. Diagram showing the genetic organization of mobile genetic elements carrying genes encoding resistance to antimicrobial agents in ST28 strains NSUI002 and 05HAS68.

S3 Fig. Core and pan-genome of the 51 ST 28 *S. suis* strains.

S1 Table. *Streptococcus suis* strains used in this study.

S2 Table: Characteristics of the NSUI002 and other previously closed *Streptococcus suis* genomes.

S3 Table. Recombination among the 51 ST28 *S. suis* strains as defined by BratNextGen.

S4 Table. Common ortholog gene clusters among clade I ST28 *Streptococcus suis* strains.

S5 Table. Common ortholog gene clusters among clade II ST28 *Streptococcus suis* strains.

S6 Table. Common ortholog gene clusters among clade III ST28 *Streptococcus suis* strains.

S7 Table. Common ortholog gene clusters among clade IV ST28 *Streptococcus suis* strains.

S8 Table. Common ortholog gene clusters among clade V ST28 *Streptococcus suis* strains.

## References

1. Gottschalk M. Streptococcosis. In: Zimmerman JJ, Karriker L, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson G, editors. Diseases of swine: Wiley Publishers, NJ; 2011. p. 841-55.
2. Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultsz C. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. Clin Infect Dis. 2009;48(5):617-25.
3. Yu H, Jing H, Chen Z, Zheng H, Zhu X, Wang H, *et al.* Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. Emerg Infect Dis. 2006;12(6):914-20.
4. Mai NT, Hoa NT, Nga TV, Linh le D, Chau TT, Sinh DX, *et al.* *Streptococcus suis* meningitis in adults in Vietnam. Clin Infect Dis. 2008;46(5):659-67.
5. Suankratay C, Intalaporn P, Nunthapisud P, Arunyingmongkol K, Wilde H. *Streptococcus suis* meningitis in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2004;35(4):868-76.
6. Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? Future Microbiol. 2010;5(3):371-91.
7. 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.
8. Gottschalk M, Lacouture S, Bonifait L, Roy D, Fittipaldi N, Grenier D. Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Quebec, Canada. Vet Microbiol. 2013;162(2-4):819-25.
9. 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):259-79.
10. King SJ, Leigh JA, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, Dowson CG, *et al.* Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of

virulent clones and potential capsular serotype exchange. *J Clin Microbiol.* 2002;40(10):3671-80.

11. 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):2239-44.

12. Quessy S, Dubreuil JD, Caya M, Higgins R. Discrimination of virulent and avirulent *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates from different geographical origins. *Infect Immun.* 1995;63(5):1975-9.

13. Yao X, Li M, Wang J, Wang C, Hu D, Zheng F, *et al.* Isolation and characterization of a native avirulent strain of *Streptococcus suis* serotype 2: a perspective for vaccine development. *Sci Rep.* 2015;5:9835.

14. Onishi H, Sugawara M, Okura M, Osaki M, Takamatsu D. Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in isolates from porcine endocarditis in East Japan. *J Vet Med Sci.* 2012;74(12):1681-4.

15. Chen L, Song Y, Wei Z, He H, Zhang A, Jin M. Antimicrobial susceptibility, tetracycline and erythromycin resistance genes, and multilocus sequence typing of *Streptococcus suis* isolates from diseased pigs in China. *J Vet Med Sci.* 2013;75(5):583-7.

16. Tang Y, Zhao H, Wu W, Wu D, Li X, Fang W. Genetic and virulence characterization of *Streptococcus suis* type 2 isolates from swine in the provinces of Zhejiang and Henan, China. *Folia Microbiol (Praha).* 2011;56(6):541-8.

17. Chang B, Wada A, Ikebe T, Ohnishi M, Mita K, Endo M, *et al.* Characteristics of *Streptococcus suis* isolated from patients in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2006;59(6):397-9.

18. Kerdsin A, Dejsirilert S, Puangpatra P, Sripakdee S, Chumla K, Boonkerd N, *et al.* Genotypic profile of *Streptococcus suis* serotype 2 and clinical features of infection in humans, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):835-42.

19. Takamatsu D, Wongsawan K, Osaki M, Nishino H, Ishiji T, Tharavichitkul P, *et al.* *Streptococcus suis* in humans, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(1):181-3.



20. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR, Henriksen J. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. J Clin Microbiol. 1989;27(12):2633-6.
21. Inouye M, Dashnow H, Raven LA, Schultz MB, Pope BJ, Tomita T, *et al.* SRST2: Rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. Genome Med. 2014;6(11):90.
22. Chin CS, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, *et al.* Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. Nat Methods. 2013;10(6):563-9.
23. Myers EW, Sutton GG, Delcher AL, Dew IM, Fasulo DP, Flanigan MJ, *et al.* A whole-genome assembly of *Drosophila*. Science. 2000;287(5461):2196-204.
24. Kent WJ. BLAT--the BLAST-like alignment tool. Genome Res. 2002;12(4):656-64.
25. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 2014;30(14):2068-9.
26. Tritt A, Eisen JA, Facciotti MT, Darling AE. An integrated pipeline for *de novo* assembly of microbial genomes. PLoS One. 2012;7(9):e42304.
27. Darling AE, Mau B, Perna NT. progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. PLoS One. 2010;5(6):e11147.
28. de Been M, van Schaik W, Cheng L, Corander J, Willems RJ. Recent recombination events in the core genome are associated with adaptive evolution in *Enterococcus faecium*. Genome Biol Evol. 2013;5(8):1524-35.
29. Sonnhammer EL, Ostlund G. InParanoid 8: orthology analysis between 273 proteomes, mostly eukaryotic. Nucleic Acids Res. 2015;43(Database issue):D234-9.
30. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 2004;32(5):1792-7.
31. Capella-Gutierrez S, Silla-Martinez JM, Gabaldon T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. Bioinformatics. 2009;25(15):1972-3.

32. Marttinen P, Baldwin A, Hanage WP, Dowson C, Mahenthiralingam E, Corander J. Bayesian modeling of recombination events in bacterial populations. *BMC Bioinformatics*. 2008;9:421.
33. Nusbaum C, Ohsumi TK, Gomez J, Aquadro J, Victor TC, Warren RM, *et al.* Sensitive, specific polymorphism discovery in bacteria using massively parallel sequencing. *Nat Methods*. 2009;6(1):67-9.
34. Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol*. 2006;23(2):254-67.
35. Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics*. 2011;12:402.
36. 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):3901-10.
37. Fittipaldi N, Sekizaki T, Takamatsu D, de la Cruz Dominguez-Punaro M, Harel J, Bui NK, *et al.* Significant contribution of the *pgdA* gene to the virulence of *Streptococcus suis*. *Mol Microbiol*. 2008;70(5):1120-35.
38. Ihaka R, Gentleman R. R: A Language for Data Analysis and Graphics. *J Comp Graph Stats*. 1996;5(3):299-314.
39. Holden MT, Hauser H, Sanders M, Ngo TH, Cherevach I, Cronin A, *et al.* Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *PLoS One*. 2009;4(7):e6072.
40. Smith HE, Reek FH, Vecht U, Gielkens AL, Smits MA. Repeats in an extracellular protein of weakly pathogenic strains of *Streptococcus suis* type 2 are absent in pathogenic strains. *Infect Immun*. 1993;61(8):3318-26.
41. Jacobs AA, Loeffen PL, van den Berg AJ, Storm PK. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun*. 1994;62(5):1742-8.

42. Gottschalk MG, Lacouture S, Dubreuil JD. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology*. 1995;141 ( Pt 1):189-95.
43. Takamatsu D, Nishino H, Ishiji T, Ishii J, Osaki M, Fittipaldi N, *et al.* Genetic organization and preferential distribution of putative pilus gene clusters in *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol*. 2009;138(1-2):132-9.
44. Smith HE, Vecht U, Gielkens AL, Smits MA. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the 136-kilodalton surface protein (muramidase-released protein) of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun*. 1992;60(6):2361-7.
45. Smith HE, Vecht U, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Biermann Y, Smits MA. Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs. *Infect Immun*. 1996;64(10):4409-12.
46. Silva LM, Baums CG, Rehm T, Wisselink HJ, Goethe R, Valentin-Weigand P. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Vet Microbiol*. 2006;115(1-3):117-27.
47. Chen C, Tang J, Dong W, Wang C, Feng Y, Wang J, *et al.* A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. *PLoS One*. 2007;2(3):e315.
48. Palmieri C, Varaldo PE, Facinelli B. *Streptococcus suis*, an Emerging Drug-Resistant Animal and Human Pathogen. *Front Microbiol*. 2011;2:235.
49. Marini E, Palmieri C, Magi G, Facinelli B. Recombination between *Streptococcus suis* ICESsu32457 and *Streptococcus agalactiae* ICESa2603 yields a hybrid ICE transferable to *Streptococcus pyogenes*. *Vet Microbiol*. 2015.
50. Zhang A, Yang M, Hu P, Wu J, Chen B, Hua Y, *et al.* Comparative genomic analysis of *Streptococcus suis* reveals significant genomic diversity among different serotypes. *BMC Genomics*. 2011;12:523.
51. Hanage WP, Fraser C, Tang J, Connor TR, Corander J. Hyper-recombination, diversity, and antibiotic resistance in pneumococcus. *Science*. 2009;324(5933):1454-7.

52. Teatero S, McGeer A, Low DE, Li A, Demczuk W, Martin I, *et al.* Characterization of invasive group B *Streptococcus* strains from the greater Toronto area, Canada. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1441-7.
53. Mostowy R, Croucher NJ, Hanage WP, Harris SR, Bentley S, Fraser C. Heterogeneity in the frequency and characteristics of homologous recombination in pneumococcal evolution. *PLoS Genet.* 2014;10(5):e1004300.
54. Weinert LA, Chaudhuri RR, Wang J, Peters SE, Corander J, Jombart T, *et al.* Genomic signatures of human and animal disease in the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *Nat Commun.* 2015;6:6740.
55. 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):1842-54.
56. Seitz M, Beineke A, Seele J, Fulde M, Valentin-Weigand P, Baums CG. A novel intranasal mouse model for mucosal colonization by *Streptococcus suis* serotype 2. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt 9):1311-8.
57. Takeuchi D, Akeda Y, Nakayama T, Kerdsin A, Sano Y, Kanda T, *et al.* The contribution of suilysin to the pathogenesis of *Streptococcus suis* meningitis. *J Infect Dis.* 2014;209(10):1509-19.
58. Li S, Song J, Huang H, Chen W, Li M, Zhao Y, *et al.* Identification of *in-vivo* induced genes of *Streptococcus suis* serotype 2 specially expressed in infected human. *Microb Pathog.* 2013;63:8-15.
59. Zhang A, Mu X, Chen B, Han L, Chen H, Jin M. IgA1 protease contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol.* 2011;148(2-4):436-9.
60. Zhang A, Mu X, Chen B, Liu C, Han L, Chen H, *et al.* Identification and characterization of IgA1 protease from *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol.* 2010;140(1-2):171-5.

61. 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(4):822-31.
62. Crotty Alexander LE, Maisey HC, Timmer AM, Rooijackers SH, Gallo RL, von Kockritz-Blickwede M, *et al.* M1T1 group A streptococcal pili promote epithelial colonization but diminish systemic virulence through neutrophil extracellular entrapment. J Mol Med (Berl). 2010;88(4):371-81.
63. Wilson DJ. Insights from genomics into bacterial pathogen populations. PLoS Pathog. 2012;8(9):e1002874.

## **Annexe II :**

### **Serotype-specific role of antigen I/II in the initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis***

Sarah Chuzeville<sup>1,2,a</sup>, Jean-Philippe Auger<sup>1,2,a</sup>, Audrey Dumesnil<sup>1,2</sup>, David Roy<sup>1,2</sup>, Sonia Lacouture<sup>1,2</sup>, Nahuel Fittipaldi<sup>3</sup>, Daniel Grenier<sup>1,4</sup>, and Marcelo Gottschalk<sup>1,2,\*</sup>

#### **Affiliations:**

<sup>1</sup> Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA)

<sup>2</sup> Groupe de recherche sur les maladies infectieuses en production animale (GREMIP), Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>3</sup> Public Health Ontario Laboratory Toronto, and Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

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

<sup>a</sup> Equal contribution

\* Corresponding author. Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal, 3200 Sicotte St., Saint-Hyacinthe, QC, Canada J2S 2M2.

Publié chez: *Veterinary Research*, 2017 Jul 14;48(1):39. doi: 10.1186/s13567-017-0443-4.

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

Je suis deuxième auteur de cet article. J'ai participé activement à plusieurs expériences (conception des mutants, expérience de colonisation chez le porc). J'ai également participé à l'analyse des résultats et à la correction de ce manuscrit.

## Abstract

*Streptococcus suis* is one of the most important post-weaning porcine bacterial pathogens worldwide. The serotypes 2 and 9 are often considered the most virulent and prevalent serotypes involved in swine infections, especially in Europe. However, knowledge of the bacterial factors involved in the first steps of the pathogenesis of the infection remains scarce. In several pathogenic streptococci, expression of multimodal adhesion proteins known as antigen I/II (AgI/II) have been linked with persistence in the upper respiratory tract and the oral cavity, as well as with bacterial dissemination. Herein, we report expression of these immunostimulatory factors by *S. suis* serotype 2 and 9 strains and that AgI/II-encoding genes are carried by integrative and conjugative elements. Using mutagenesis and different in vitro assays, we demonstrate that the contribution of AgI/II to the virulence of the serotype 2 strain used herein appears to be modest. In contrast, data demonstrate that the serotype 9 AgI/II participates in self-aggregation, induces salivary glycoprotein 340-related aggregation, contributes to biofilm formation and increased strain resistance to low pH, as well as in bacterial adhesion to extracellular matrix proteins and epithelial cells. Moreover, the use of a porcine infection model revealed that AgI/II contributes to colonization of the upper respiratory tract of pigs. Taken together, these findings suggest that surface exposed AgI/II likely play a key role in the first steps of the pathogenesis of the *S. suis* serotype 9 infection.

**Keywords:** *Streptococcus suis*; antigen I/II; biofilm; aggregation; glycoprotein 340; adhesion; colonization; pig.

## Introduction

*Streptococcus suis* is one of the most important post-weaning bacterial pathogens of pigs and a major economic problem for the porcine industry [1]. Septicemia with sudden death, meningitis, arthritis, and endocarditis are the most frequent clinical signs caused by *S. suis* in pigs [2]. *S. suis* is also a zoonotic agent responsible for numerous human cases of meningitis, septicemia, and streptococcal toxic shock-like syndrome [2]. In Western countries, human *S. suis* infections mostly occur in individuals directly or indirectly linked with the porcine industry. In contrast, the general population is at risk of *S. suis* disease in certain Asian countries where this pathogen has been shown to be an important cause of adult meningitis [3]. Serotype 2 is, globally, considered the most virulent serotype and the one most frequently isolated from both porcine and human infections [4]. The use of multilocus sequence typing has revealed that serotype 2 strains belonging to certain sequence types (STs) are more virulent than others. ST1 strains (virulent) predominate in most Eurasian countries, whereas ST25 and ST28 strains (intermediate and low virulence, respectively) are mainly present in North America [4]. Meanwhile, highly virulent ST7 strains, responsible for at least two important human outbreaks in China, have only been reported in that country [5]. The serotype 9 has recently emerged in certain European countries, such as Spain, the Netherlands, and Germany [4]. Yet, very few studies have addressed the presence of virulence factors in this serotype, and putative virulence factors described for serotype 2 strains may not always be present in serotype 9 strains [6]. Moreover, the first *S. suis* serotype 9 human case of infection was reported in 2015 [7].

The early steps of the pathogenesis of the *S. suis* infection are not well understood [1,8]. Currently, the most accepted hypothesis is that virulent strains reach the bloodstream after breaching the mucosal epithelium of either the upper respiratory or the gastrointestinal tracts of pigs [1]. Similarly, infection of humans occurs via skin wounds or at the intestinal interface following ingestion of raw or undercooked infected meat [1]. However, the precise mechanisms and virulence factors involved remain unknown. Of note, the upper respiratory tract of pigs, particularly the tonsils and nasal cavities, are important reservoirs of *S. suis* [1]. Furthermore, *S. suis* has also been shown to be present in nearly half of the submaxillary lymph node samples



of clinically healthy pigs [9]. Bacterial loads in saliva swab and tonsillar brush samples are similar, indicating that *S. suis* is indeed a natural inhabitant of the oral cavity [10].

Antigens I/II (AgI/II) have been extensively described in oral as well as invasive pathogenic streptococci, including *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus pyogenes*, and *Streptococcus agalactiae* [11]. AgI/II are immunostimulatory components and multimodal adhesion proteins implicated in host upper respiratory tract and oral cavity persistence and dissemination [11]. Affinity of AgI/II-like proteins for binding salivary glycoproteins, especially the glycoprotein (gp) 340 (also called DMBT1 protein) is a common feature of this protein family [12]. Large quantities of gp340 are present in the saliva of mammals in either a surface-immobilized-form or fluid phase-form. It is also present at all mucosal surfaces, including the nasal and intestinal cavities [13,14]. Interestingly, it has been shown that *S. suis* is able to adhere to gp340 and that this protein aggregates certain strains of *S. suis* [15]. However, the strains tested did not express AgI/II when using a heterologous monospecific antibody [15].

In this study, using in silico analyses, genes with homology to those coding for AgI/II were identified in *S. suis* serotype 2 and 9 strains. Using isogenic mutants deficient for the expression and production of AgI/II in both serotype 2 (S2 $\Delta$ agI/II) and serotype 9 (S9 $\Delta$ agI/II), the role of this protein in different aspects of the pathogenesis of the infection caused by *S. suis* was evaluated. We report for the first time that these proteins play a limited or important role in the pathogenesis of the infection caused by *S. suis* serotype 2 and 9, respectively.

## Materials and methods

### Bacterial strains and culture conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in **Table 1**. The virulent serotype 2 ST7 strain SC84, responsible for the 2005 human outbreak in China [5], and the serotype 9 strain 1135776 (isolated from a diseased pig in Canada) were used herein as models to study the role of Ag I/II in the pathogenesis of the infection caused by *S. suis*. Twenty-five additional *S. suis* serotype 9 strains recovered from diseased pigs were also used to evaluate the prevalence of *agI/II* genes by PCR (**Additional File 1**). Seventeen of these strains originated from Canada, 3 from Brazil, 1 from Denmark (reference strain), and 4 from Germany. A strain isolated from a human case of infection was also included [7]. The *S. mutans* strain Ingbritt was used as a tool for collection of porcine salivary agglutinins (pSAGs) whereas the *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), MC1061 [16], and BL21(DE3) (Invitrogen) strains were used for DNA manipulations and/or AgI/II protein production. The different *Streptococcus* and *E. coli* strains were grown at 37 °C in Todd Hewitt (THB) under static conditions or in Luria-Bertoni broth (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) with shaking, respectively. Antibiotics (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), where needed, were used at the following concentrations for *S. suis* and *E. coli*: spectinomycin at 500 µg/mL and 50 µg/mL and erythromycin at 5 µg/mL and 200 µg/mL, respectively. Ampicillin was also used at a concentration of 50 µg/mL for *E. coli*.

### Bioinformatics analyses

In silico analyses of AgI/II-coding DNA sequences (CDS) in *S. suis* genomes were performed using BLASTN (expected threshold  $< 10^{-3}$ ) as previously described [17]. The *S. suis* nucleotide collection nr/nt database available in GenBank (taxid 1307) was queried for *S. suis* genomes. Alongside, a bank of *S. suis* serotype 2 North American ST25 and ST28 strains isolated from diseased pigs whose genomes were previously published [18,19] were also queried. Moreover, BLASTN was used to detect homologies with genes coding for AgI/II or orthologues that have already been described in other bacterial species: *S. mutans* SpaP (accession number NC\_004350.2), *S. gordonii* SspA and SspB (accession number

CP000725.1), *S. pyogenes* (accession number NC\_007296.1), *S. agalactiae* (accession number AAJP01000002.1), and *Enterococcus faecalis* (accession number AY855841.2). Examination of CDS carriage by putative integrative and conjugative elements (ICEs) was conducted using the ICEberg database [20], followed by BLASTN using the *S. suis* serotype 2 SC84 (accession number GCA\_000026725.1) and serotype 9 D12 (accession number GCA\_000231905.1) genomes as queries. Protein domains were analyzed using the NCBI conserved domain database with the help of the BatchCD tool [21]. Cell wall anchored domains were predicted using CW-PRED [22], while transmembrane domains and signal peptide cleavage sites were detected using the TMHMM [23] and the SignalP [24] tools, respectively. The Expasy bioinformatics resource portal was used to determine the theoretical protein molecular weight [25].

### **DNA manipulations**

Chromosomal *S. suis* DNA was prepared using standard methods [26] or InstaGene matrix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Plasmid DNA preparations and purification of PCR amplicons were performed using the QIAprep Spin Miniprep Kit and the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany), respectively, according to the manufacturer's instructions. Oligonucleotide primers (listed in **Additional File 2**) were purchased from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). Primers were designed from the available *S. suis* serotype 2 (strain SC84) and serotype 9 (strain D12) genomes. DNA ligations and transformation of competent *E. coli* were performed as previously described [27]. Sequencing reactions were carried out using an ABI 3730xl Automated DNA Sequencer and the ABI PRISM Dye Terminator Cycle Version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and analyses of sequences performed using the BioEdit<sup>®</sup> software and/or BLASTN.

### **Generation of the isogenic *agl/II*-deficient mutants and complemented strains**

For precise in-frame deletions of the *agl/II* genes in the *S. suis* serotype 2 strain SC84 and serotype 9 strain 1135776, regions upstream and downstream of the genes were amplified and fused by overlap-extension PCR. The amplification products were subcloned into vector pCR2.1 (Invitrogen), excised using HindIII (Promega, Madison, WI, USA), and cloned into the thermosensitive gene replacement vector pSET4s as previously described [27]. The resulting

serotype 2 and serotype 9 pSET4S-*agI/II* vectors were introduced into recipient serotype 2 and 9 strains, respectively. Allelic replacement and absence of AgI/II expression in resulting serotype 2 and serotype 9 *agI/II*-deficient mutants were confirmed by sequencing and Western blot, respectively.

The pOri23 plasmid [28], which carries a gene conferring resistance to erythromycin, was used for complementation assays. A DNA fragment composed of the full sequence of the *agI/II* genes, as well as their putative endogenous promoters and terminators was cloned into pOri23 using the EcoRI and PstI restriction enzymes (two constructs, one for the serotype 2 *agI/II* and another for the serotype 9 *agI/II*). Since the serotype 9 strain used is highly resistant to erythromycin (data not shown), and several reports have described increased resistance to this antimicrobial among serotype 2 strains [29,30], a spectinomycin resistance cassette derived from pSET4s was introduced into the pOri23-S2*agI/II* and pOri23-S9*agI/II* plasmids. Following subcloning steps using *E. coli* MC1061, the generated pOri23<sub>spc</sub>-S2*agI/II* and pOri23<sub>spc</sub>-S9*agI/II* plasmids were then introduced into the S2Δ*agI/II* and S9Δ*agI/II* strains to generate the complemented S2CΔ*agI/II* and S9CΔ*agI/II* strains, respectively.

### **Cloning, expression, and purification of the His-tagged recombinant AgI/II protein and production of polyclonal mono-specific antibodies**

A 4430 bp fragment of the serotype 2 *agI/II* gene, excluding the sequences coding for the cell wall anchorage and the LPXTG domains, was cloned into the pET151 expression vector (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions (**Figure 1**). Protein synthesis was induced using 0.5 mM of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside and cells lysed using lysozyme (Sigma-Aldrich) and sonication. The resulting recombinant His-tagged AgI/II, henceforth rAgI/II, was purified by affinity chromatography using the His-Bind Resin Chromatography Kit (Novagen, Madison, WI, USA,) according to manufacturer's instructions. Protein purity was evaluated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis following dialysis. Protein concentration was determined using the Pierce Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Rabbits were inoculated with the purified rAgI/II to produce a mono-specific polyclonal serum as previously described [31]. This serum was then

used to verify presence of the protein in wild-type, isogenic *agI/II*-deficient mutants, and complemented strains by Western blot as previously described [32].

### **Cell surface hydrophobicity**

The relative surface hydrophobicity of the *S. suis* wild-type strains and *agI/II*-deficient mutants was determined by measuring their adsorption to n-hexadecane as previously described [33]. A serotype 2 non-encapsulated mutant strain showing a high percentage of hydrophobicity was used as a positive control [33].

## **In vitro pathogenesis assays**

### **Self-aggregation and biofilm assays**

For the self-aggregation assay, overnight cultures of *S. suis* were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, and re-suspended in THB to obtain an optical density (OD) at 600 nm of 0.05. Samples were incubated at 37 °C for 24 h under static conditions and self-aggregation quantified as previously described [34]. Biofilm formation capacity was determined as previously described [35] in the absence or presence of 2 mg/mL of porcine fibrinogen (Sigma-Aldrich).

### ***S. suis* aggregation to soluble porcine salivary agglutinins**

Saliva was obtained from pigs as previously described [36] with a few modifications. Briefly, cotton ropes were suspended for 30 min to allow a total of 80 growing pigs from a high health status herd with no recent history of endemic *S. suis* disease to chew. No clinical signs of disease were present during collection. Whole saliva was decanted and impurities eliminated by centrifugation at  $8000 \times g$  for 20 min at 4 °C. pSAGs were then purified from clarified saliva as previously described for human salivary agglutinins using *S. mutans* [37]. The pSAGs were dialyzed in PBS and the concentration determined using the Pierce BCA Protein Assay Kit. Bacterial aggregation was quantified every 20 min for 1 h in the absence or presence of pSAGs [37].

## **Evaluation of *S. suis* adhesion to extracellular matrix proteins, porcine salivary agglutinins, and the gp340-derived SRCRP2 peptide by ELISA**

Bacterial cultures were produced as previously described [38]. Formaldehyde-killed bacteria were washed using either PBS-T (PBS containing 0.05% Tween-20) for experiments involving extracellular matrix proteins (ECM), or TBS-T (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5 containing 0.1% Tween-20) supplemented with 1 mM CaCl<sub>2</sub>, for experiments involving pSAGs and the gp340-derived SRCRP2 peptide [39]. Maxisorp flat-bottom microtiter plates (NUNC, Rochester, NY, USA) were coated with 12.5 µg/mL of human plasma fibronectin (Sigma-Aldrich), 15 µg/mL of human type I collagen (Corning, Corning, NY, USA), 1 mg/mL of porcine fibrinogen or 50 µg/mL of pSAGs, all diluted in carbonate coating buffer (0.1 M, pH 9.6), or with 200 µg/mL of the SRCRP2 peptide (Bio Basic Canada Inc., Markham, ON, Canada) diluted in water, overnight at 4 °C. After washing with PBS-T or TBS-T and blocking with non-fat dry milk, bacterial suspensions equivalent to 1 × 10<sup>8</sup> CFU/mL were added to the plates and incubated at 37 °C for 2 h. Subsequent steps were undertaken as previously described [38] using serotype 2 or 9 specific rabbit antisera and the OD at 450 nm determined.

### **Acid stress killing assay**

The ability of *S. suis* to withstand acid challenge was determined as previously described with some modifications [39]. Briefly, *S. suis* strains were grown in THB, washed twice with PBS, and adjusted to a concentration of 1 × 10<sup>8</sup> CFU/mL. Cells were then resuspended in 0.1 M glycine buffer adjusted to either pH 3.0 or 5.0 and incubated at 37 °C. Surviving bacteria were accurately determined using an Autoplate 4000 Spiral Plater (Spiral Biotech, Norwood, MA, USA).

### **Cell adhesion and invasion assays**

The newborn porcine tracheal epithelial cell line (NPTr) was cultured until confluent as previously described [40]. Cells were infected with *S. suis* as previously described with minor modifications [41]. Briefly, PBS-washed NPTr cells were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> and infected with *S. suis* at a multiplicity of infection of 10. After 2 h of incubation, wells were washed with PBS to remove non-associated bacteria. For adhesion assays, cells were lysed with

1 mL of cold water, while the invasion assay was performed using the antibiotic protection method as previously described [40], and associated or intracellular bacteria enumerated as described above.

### **Intranasal colonization in a porcine model of infection**

All experiments involving animals were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals by the Animal Welfare Committee of the University of Montreal, which approved the protocols and procedures used herein (permit number RECH-1570). Four-week old pigs (providing from the same high health status herd mentioned above) were used. The 10 pigs were randomly separated into two rooms upon arrival and their nasal cavities, saliva, and tonsils swabbed to confirm absence of serotype 9. The *S. suis* serotype 9 wild-type strain 1135776 and *agI/II*-deficient mutant were cultured as previously described [42] to obtain a final concentration of  $2 \times 10^9$  CFU/mL. Intranasal infections were carried out as previously described with some modifications [43]. Pigs were inoculated with 1 mL of 2% acetic acid per nostril 1 h prior to infection with 1 mL per nostril of either the wild-type or the S9 $\Delta$ *agI/II* mutant strain.

Nasal cavities were swabbed using sterile cotton-tipped applicators. Swabs were placed in sterile tubes containing PBS supplemented with 0.1% bovine serum albumin and immediately cultured. Serial dilutions of swab samples ( $10^0$  to  $10^{-6}$ ) were plated on Columbia agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood (Cedarlane, Burlington, ON, Canada), *Streptococcus* selective reagent SR0126 (Oxoid, Hampshire, UK), and selected antibiotics to which the serotype 9 strain is resistant at the concentrations used (50  $\mu$ g/mL spectinomycin, 5  $\mu$ g/mL erythromycin, 0.2  $\mu$ g/mL penicillin G, and 1  $\mu$ g/mL tetracycline). After incubation for 24 h at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub>, plates containing 30 to 300 colonies were selected. Suspected alpha-hemolytic colonies were enumerated and 10 *S. suis*-like colonies per plate were sub-cultured and tested by coagglutination assay using anti-*S. suis* serotype 9 rabbit serum as previously described [44]. Three weeks post-infection, pigs were euthanized and tonsils recovered. Tonsil samples were processed as previously described [45] and *S. suis* serotype 9 carriage evaluated as described above.

## **Statistical analyses**

At least three independent biological replicates were performed for each experiment and results expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Raw data were analyzed using the non-parametric statistical Mann Whitney test. Statistical differences are defined as being greater than  $p < 0.05$ .



## Results

### Prevalence and molecular characteristics of the *S. suis* AgI/II

Bioinformatics analyses using the *S. suis* (taxid 1307) genome database available in GenBank revealed the presence of genes coding for AgI/II-like proteins in the genomes of serotype 2 strains, including the ST7 strain SC84, ST1 strain BM407, ST25 strain 89-1591, and in a bank of North American *S. suis* serotype 2 ST25 and ST28 strain genomes [18,19]. However, they were absent from the genome of the reference ST1 strain P1/7. The gene was also present in the genome of the serotype 9 strain D12. Given the low number of published *S. suis* serotype 9 genomes, PCR analyses were undertaken using field strains, which confirmed the presence of the gene in the 25 strains tested (**Additional File 1**), including strains from Canada, Germany, and Brazil, as well as in the reference *S. suis* serotype 9 strain from Denmark and a human isolate from Thailand. *S. suis* serotype 2 and 9 genes coding for AgI/II share approximately 95% of nucleotide identity. In addition, the promoters share 92% of nucleotide identity with the -35 and -10 boxes and the ribosome binding site for *agI/II* genes being present in all available genomes. Moreover, the terminators of *agI/II* genes are conserved in all strains (100% of nucleotide identity). The percentage of identity between the AgI/II proteins of serotypes 2 and 9 is 95 %, being both highly similar. Alignment of the amino acid sequence of both proteins is presented in **Additional File 3**. Bioinformatics analyses revealed that the *S. suis* AgI/II has a theoretical molecular weight of 180 kDa, which is slightly larger than that of other described AgI/II, probably due to the SspB-like isopeptide-forming domain being repeated thrice in the C-terminal part of the *S. suis* AgI/II (**Figure 1**) [11]. The *S. suis* AgI/II shares between 29% and 42% of protein sequence identity with other streptococcal AgI/II, such as AspA (*S. pyogenes*), SpaP (*S. mutans*), SspA (*S. gordonii*), and SspB (*S. gordonii*) (**Figure 1**). Alongside, the *S. suis* AgI/II also shares 32% of protein identity with the aggregation substance PrgB (also called Asc10) of *E. faecalis* [46]. The *S. suis* AgI/II has similar characteristic domains to those described in oral streptococci (**Figure 1**) [11].

Further bioinformatics investigations, including the use of the ICEberg database, revealed that the gene encoding for the AgI/II protein in the serotype 2 strain SC84 is carried by the 89 K ICE (89 Kbp) [47], while that of the serotype 2 ST1 strain BM407 is carried by two

putative ICEs annotated as ICES<sub>Ssu</sub>(BM407)1 and ICES<sub>Ssu</sub>(BM407)2 (75 Kbp and 80 Kbp, respectively). Moreover, the gene coding for AgI/II in the serotype 9 strain D12 is also carried by an element sharing 95% of nucleotide identity with the whole sequence of ICES<sub>Ssu</sub>(BM407)1. Altogether, these analyses suggest that the *S. suis* AgI/II are mainly carried by ICEs.

### **Confirmation of AgI/II-deficient mutants in both *S. suis* serotypes 2 and 9**

Production of AgI/II by the serotype 2 and 9 strains SC84 and 1135776, respectively, was confirmed by immunoblotting using mono-specific antisera produced with the recombinant protein, rAgI/II (**Figure 2**). The proteins had a molecular weight of approximately 180 kDa, as predicted by bioinformatics analyses. Deletion of the *agI/II* gene resulted in absence of detectable signal while complementation of the mutant strains restored detection with a band at the expected molecular weight (**Figure 2**). Growth of the S2 $\Delta$ *agI/II* and S9 $\Delta$ *agI/II* mutants as well as that of the complemented strains was similar to their respective wild-type strains (data not shown).

It was previously described that AgI/II positively impacts surface hydrophobicity of oral streptococci. However, we did not observe significant differences in hydrophobicity between the *S. suis* serotype 2 or 9 wild-type strains and their AgI/II-deficient mutants (S2 $\Delta$ *agI/II* and S9 $\Delta$ *agI/II*) (**Additional File 4**). Interestingly, the serotype 2 wild-type strain was significantly more hydrophobic than that of serotype 9 ( $p < 0.05$ ).

### **In vitro pathogenesis assays**

#### **Serotype-dependent role of the *S. suis* AgI/II in self-aggregation and biofilm formation**

*S. suis* serotype 2 self-aggregation was not modified by the absence of AgI/II (**Figure 3A**). However, deletion of AgI/II significantly reduced self-aggregation of *S. suis* serotype 9 by 80% ( $p < 0.01$ ) (**Figure 3A**). On the other hand, self-aggregation was completely restored when using the complemented S9C $\Delta$ *agI/II* strain (**Figure 3A**). Thus, the serotype 9 AgI/II, but not that of serotype 2, is involved in bacterial self-aggregation.

The role of AgI/II in biofilm formation was evaluated for both serotype 2 and 9 in the presence of porcine fibrinogen. The capacity of the serotype 2 strain to form biofilm was relatively low, and no difference was observed in the absence of AgI/II (**Figure 3B**). On the

other hand, the serotype 9 wild-type strain showed a significantly greater capacity to form biofilm than the wild-type serotype 2 strain in the presence of porcine fibrinogen ( $p < 0.01$ ). Furthermore, the serotype 9 AgI/II was significantly involved in this bacterial function ( $p < 0.001$ ) (**Figure 3B**). The capacity to form biofilm was restored in the complemented S9C $\Delta$ agI/II strain (**Figure 3B**). Minimal biofilm formation was observed in the absence of porcine fibrinogen for both the serotype 2 and 9 strains (**Additional File 5**). Consequently, the serotype 9 AgI/II, but not that of serotype 2, plays an important role in the capacity to form biofilm.

### **The *S. suis* AgI/II increases both porcine salivary agglutinin induced-aggregation and adhesion to salivary agglutinins**

Salivary agglutinins are major receptors of streptococcal AgI/II [12]. Thus, we investigated the interactions of the *S. suis* serotype 2 and 9 AgI/II with fluid-phase (mimicking the conditions in saliva) and surface-immobilized (mimicking mucosa such as in the oral cavity) pSAGs. pSAGs collected from pig saliva was obtained at a concentration of 50  $\mu$ g/mL, which is similar to that usually obtained for human salivary agglutinins [37].

Results showed a significantly more rapid and greater aggregation of both *S. suis* serotype 2 or serotype 9 strains in the presence of pSAGs ( $p < 0.05$ ) (**Figure 4**). Moreover, this fluid-phase pSAG-induced aggregation significantly increased with time ( $p < 0.05$ ) (**Figure 4**). However, the pSAG-mediated aggregation induced by the serotype 9 strain was significantly higher than that induced by the serotype 2 strain, but only after 60 min of incubation ( $p < 0.05$ ) (**Figure 4**). AgI/II-deficiency significantly reduced fluid phase pSAG-induced aggregation for both serotypes ( $p < 0.05$ ) (**Figures 5A and B**), and complementation of AgI/II-deficient mutants restored fluid phase pSAG-induced aggregation ( $p < 0.01$ ) (**Figures 5A and B**).

The adhesion of *S. suis* to surface-immobilized pSAGs was then evaluated using ELISA. Since background obtained with crude pSAGs was very elevated (data not shown), the gp340-derived peptide SRCRP2, described as the major binding sequence for AgI/II [37], was used. Results showed that deletion of the *S. suis* serotype 2 agI/II had no effect on adhesion to SRCRP2 (**Figure 5C**), while that of serotype 9 significantly reduced adhesion to SRCRP2 ( $p < 0.05$ ), but only at a concentration of 200  $\mu$ g/mL (**Figure 5D**). As expected,

complementation of the *S. suis* serotype 9 AgI/II-deficient mutant restored adhesion to SRCRP2 (**Figure 5D**).

Taken together, these results demonstrate that AgI/II promotes pSAG-induced aggregation when in fluid phase for both serotypes, and adhesion to the gp340-derived peptide SRCRP2 at a high concentration for serotype 9 only.

#### **The *S. suis* AgI/II confers protection to acid stress**

Once swallowed, *S. suis* will reach the stomach, in which it must overcome hostile environmental conditions such as low pH. We thus investigated the role of AgI/II and aggregation in resistance to low pH. Acid stress killing assays revealed that the *S. suis* serotype 2 AgI/II was not involved in acid resistance at pH 3 (**Figure 6A**) nor at pH 5 (**Figure 6C**). On the other hand, results showed that the S9 $\Delta$ agI/II mutant strain survived significantly less than its wild-type strain ( $p < 0.05$ ) at both pH 3 (**Figure 6B**) and pH 5 (**Figure 6D**). Thus, AgI/II confers partial protection to *S. suis* serotype 9, but not to serotype 2, against acidic environments.

#### **The *S. suis* serotype 9 AgI/II contributes to adhesion to extracellular matrix proteins and to porcine epithelial cells**

AgI/II was previously described in other streptococci as binding ECM proteins and contributing to adhesion to and invasion of epithelial cells. Our results showed that while the serotype 2 AgI/II was not involved in adhesion to collagen I, that of the serotype 9 played a significant role ( $p < 0.01$ ) (**Figures 7A and B**). In accordance, complementation of the S9 $\Delta$ agI/II mutant restored the wild-type phenotype (**Figure 7B**). Moreover, as previously described with other serotype 2 strains [38], the serotype 2 wild-type strain used in this study (SC84) did not bind porcine fibrinogen (**Figure 7C**). On the other hand, the serotype 9 wild-type strain did bind to porcine fibrinogen, with absence of AgI/II significantly reducing this ability ( $p < 0.05$ ) (**Figure 7D**). Once again, complementation of the S9 $\Delta$ agI/II mutant strain restored this adhesion capacity (**Figure 7D**). Finally, the deletion of the *S. suis* serotype 9 agI/II gene and, to a lesser extent, that of the serotype 2, significantly decreased adhesion to plasma fibronectin ( $p < 0.05$ ) (**Figures 7E and F**). Consequently, these results demonstrate the

importance of AgI/II as a multimodal adhesin for *S. suis* serotype 9 while only playing a minor role for serotype 2.

The role of AgI/II in adhesion to and invasion of porcine tracheal epithelial cells was subsequently investigated. Interestingly, the serotype 9 wild-type strain adhered significantly more to epithelial cells than did the serotype 2 ( $p < 0.05$ ) (**Figure 8**). Adhesion assays revealed a significant decrease in adhesion to epithelial cells in the absence of AgI/II for the serotype 9 ( $p < 0.05$ ), equivalent to 30% of wild-type strain adhesion, with complementation restoring adhesion (**Figure 8**). On the other hand, no differences were observed between the *S. suis* serotype 2 wild-type strain and its AgI/II-deficient mutant (**Figure 8**). Low levels of epithelial cell invasion were observed for both serotypes, with no role of AgI/II being evident (data not shown). Taken together, these results reveal that AgI/II is implicated in adhesion to host proteins and epithelial cells for serotype 9 and, to a lesser extent, for serotype 2.

### **Role of AgI/II in colonization of the oral and nasal cavities of pigs**

Given that *in vitro* results demonstrated an important role of AgI/II for *S. suis* serotype 9, we next evaluated the contribution of this protein in colonization using a porcine infection model. Animals were divided into two groups and infected with either the serotype 9 wild-type strain or the AgI/II-deficient mutant by intranasal inoculation. Evaluation of serotype 9 colonization revealed that the number of wild-type strain recovered from the nasal cavities significantly increased over time until day 12 post-infection (pi) ( $p < 0.05$ ), whereas the number of S9 $\Delta$ agl/II remained stable throughout the experiment (**Figure 9A**). Moreover, AgI/II-deficient mutants were recovered in significantly lower numbers from the nasal cavities of pigs on days 5, 8, and 12 pi ( $p < 0.05$ ) (**Figure 9A**). Although the number of serotype 9 wild-type strain and AgI/II-deficient mutant in the nasal cavities of pigs was similar 21 days pi (**Figure 9A**), AgI/II-deficiency resulted in significantly reduced colonization of tonsils ( $p < 0.05$ ) (**Figure 9B**). Together, these results strongly suggest that the serotype 9 AgI/II contributes to colonization of the porcine respiratory tract.

## Discussion

AgI/II proteins have been extensively described in oral pathogenic streptococci as multimodal adhesion proteins and immunostimulatory components implicated in host upper respiratory tract and oral cavity persistence and dissemination [11]. In addition, it has been shown that AgI/II proteins potentially play multiple roles in *Streptococcus* adherence, colonization, and microbial community development [11]. These proteins have also been described in pyogenic streptococci, such as *S. pyogenes* and *S. agalactiae*, but they have never been identified in *Streptococcus pneumoniae* [11]. An initial goal of this study was to determine whether *S. suis* possesses these putative virulence factors. We showed that most of the *S. suis* serotype 2 available genomes, including from different STs, possess genes encoding AgI/II. Interestingly, the gene was absent from the ST1 strain P1/7, which is commonly used as a reference for investigation of virulence [6]. We also identified AgI/II-encoding genes in the genome of the Chinese serotype 9 strain D12, in the serotype 9 reference strain 22083, as well as in a collection of 25 serotype 9 field strains (added herein given the limited number of serotype 9 genomes available), alongside a human isolate, tested by PCR.

It is widely recognized that mobile genetic elements such as insertion sequences, transposons, bacteriophages, plasmids, and genomic islands are key drivers of genomic evolution and bacterial adaptation. Among them, ICEs are chromosomal genetic elements that play an important role in horizontal gene transfer [48]. In both *S. pyogenes* and *S. agalactiae*, AgI/II are encoded by genes carried by ICEs, which can spread not only to other *S. pyogenes* and *S. agalactiae* strains, but also to other streptococci [49,50]. Meanwhile, different ICEs have been described in *S. suis* [51], of which the 89 K ICE carried by the *S. suis* serotype 2 strain SC84 has been suggested to be responsible, at least in part, for the higher virulence of this strain [52]. Interestingly, results obtained in this study showed that the *S. suis agI/II* genes are mainly carried by ICEs. As such, it may be suggested that acquisition of AgI/II by *S. suis* occurred via horizontal transfer following acquisition of ICEs.

Persistence of *S. suis* in the oral cavity may contribute to the pathogenesis of the infection. Our data showed that AgI/II plays an important role in self-aggregation for *S. suis* serotype 9. This role was even more important in the presence of salivary glycoproteins, such

as gp340. It has been previously shown that human salivary gp340 was able to aggregate an untypeable, a serotype 1, and a serotype 2 *S. suis* strain [15]. However, these strains were negative for the expression of AgI/II as evaluated by immunoblot using a polyclonal antibody raised against the *S. mutans* proteins [15]. In the present study, we showed that purified soluble pSAGs increase the ability of *S. suis* to aggregate and that AgI/II played an important role in such interactions for serotype 9 and, to a lesser extent, serotype 2. Fluid-phase and surface-immobilized gp340 expose different binding properties and, consequently, differentially recognize adhesive phenotypes of diverse bacterial species. Herein, we showed that AgI/II also played a role in the *S. suis* serotype 9 adhesion to the surface-immobilized gp340-derived peptide SRCRP2. Similarly, the AgI/II from *S. suis* serotype 9 also played an important role in biofilm formation.

The relationship between the saliva-dependent aggregation, attachment to salivary glycoproteins, and biofilm formation in the oral cavity and pathogenesis of the infection caused by pathogenic streptococci is not very clear. On the one hand, aggregation (clumping) may presumably allow “bacterial clearance” from the oral cavity via swallowing [53]. It is usually accepted that the main route of infection for pigs is through the respiratory tract. However, more recently, the oral route (as clearly described in humans) has also been suggested as a portal of entry in pigs [54]. Although a recent report showed that disease could not be induced in an experimental infection by the oral route in post-weaned animals [55], a role of early colonization of the intestine of pre-weaned piglets followed by direct invasion through intestinal epithelial cells in animals under post-weaned stress could not be completely ruled out [1]. In the present study, an increased susceptibility to low pH (usually found in the stomach) was observed for *S. suis* serotype 9 in the absence of the *agl/II* gene. As such, it may be hypothesized that AgI/II induces bacterial self-mediated and salivary agglutinin-mediated aggregation and biofilm formation for serotype 9, which would increase, at certain moments, the swallowing of large amounts of bacteria. AgI/II would subsequently increase bacterial protection against the low pH of the stomach, thus allowing colonization of the intestine. However, this hypothesis remains to be confirmed.

It has been proposed that adhesion to epithelial cells is one of the most important initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *S. suis* [1]. Similarly to other pathogens,

*S. suis* is also able to bind ECM components, which have been suggested to be implicated as cell receptors [1]. At least 28 different *S. suis* components have been described to be involved in such interactions so far [1,6]. In the present study, it was clearly shown that the AgI/II plays an important role in the adhesion of *S. suis* serotype 9 to collagen I, fibrinogen, and fibronectin. In the case of serotype 2, this protein plays a minimal role in adhesion to fibronectin and none to collagen I. As previously described, the serotype 2 strain was unable to bind fibrinogen [38]. The lack of binding to the latter may also explain differences observed in biofilm formation (in the presence of this protein) between serotype 2 and serotype 9 strains and the important role played by the serotype 9 AgI/II.

The implication of AgI/II in the adhesion to epithelial cells was further evaluated using porcine tracheal epithelial cells as a model [40]. Firstly, it was interesting to note that the serotype 9 wild-type strain presented higher adhesion levels than the serotype 2 strain, a fact that has been previously reported with other porcine cells [54]. A role was attributed to AgI/II in the adhesion of serotype 9 since a significant reduction of adhesion to these cells was observed using the *S9ΔagI/II* mutant. This reduction of adhesion could be explained by a reduction in the interactions with ECM components (as described above) or through a direct effect of the AgI/II as an adhesin. In fact, this protein has been described to be directly involved in epithelial cell adhesion and invasion by *S. gordonii* through  $\beta 1$  integrin recognition [56]. Using a different mechanism, this protein was also involved in adhesion/invasion of *S. pyogenes* to these cells [56].

Previous studies showed that the *S. pyogenes* AgI/II is implicated in upper respiratory tract colonization [57]. Since results showed that AgI/II plays important roles in vitro for serotype 9, its implication in colonization of the upper respiratory tract was investigated in pigs. As previously described, pigs infected by the serotype 9 wild-type strain and its isogenic *S9ΔagI/II* mutant via the intranasal route did not develop clinical signs of infection [43]. However, a slight, yet significantly lower colonization of the upper respiratory tract by the mutant strain, and, subsequently at the tonsillar level, was observed, suggesting that this protein may collaborate in bacterial colonization during the first steps of the infection. However, additional studies should be carried out to confirm this hypothesis.



In conclusion, the presence of AgI/II is herein reported for the first time in *S. suis*. This protein appears to play important or limited roles during the first steps of the pathogenesis of the infection caused by serotypes 9 and 2, respectively. Since the gene and protein sequences are highly similar between both serotypes, the observed differences are more difficult to explain than anticipated, and several hypotheses may be proposed. Firstly, a particular motif specific to the gene coding for the serotype 9 AgI/II might be responsible for the phenotypic differences highlighted in this study. Secondly, the *S. suis* serotype 2 and 9 *agI/II* genes are both carried by ICEs, which vary, creating differing genetic contexts and, consequently, differential gene regulation. Thirdly, critical *S. suis* virulence factors still remain poorly known [6]; the lack of a dominant role of the serotype 2 AgI/II observed herein might also be due to compensation by other virulence factors that result in bacterial redundancy [6]. Further studies are presently underway to explore these avenues. Overall, AgI/II may contribute to the colonization of the upper respiratory tract of pigs and could represent important surface bacterial components implicated in the first steps of the pathogenesis of the infection caused by *S. suis*.

## **Declarations**

### **List of abbreviations**

AgI/II: antigen I/II; BCA: bicinchoninic acid; CDS: coding DNA sequence; ECM: extracellular matrix protein; gp340: glycoprotein 340; ICE: integrative and conjugative element; NPTr: newborn porcine tracheal epithelial cell; OD: optical density; PBS: phosphate-buffered saline; pi: post-infection; pSAG: porcine salivary agglutinin; SEM: standard error of the mean; ST: sequence type; THB: Todd Hewitt broth.

### **Ethics approval**

All experiments involving animals were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals by the Animal Welfare Committee of the University of Montreal, which approved the protocols and procedures used herein (permit number RECH-1570). A total of 10 pigs were used in this study.

### **Consent for publication**

Not applicable.

### **Availability of data and materials**

The data and materials not presented in this manuscript are available from the corresponding author upon request.

### **Competing interest**

No competing interests to declare.

### **Funding**

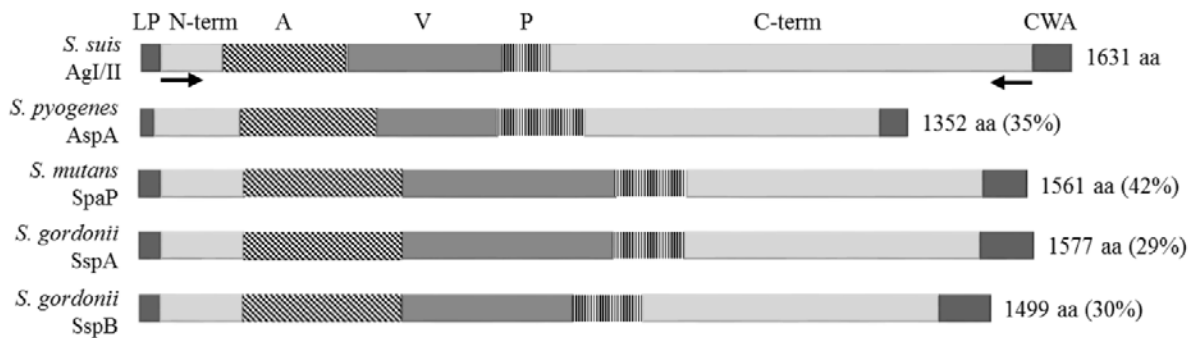
This study was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to MG (grant #154280).

### **Authors' contribution**

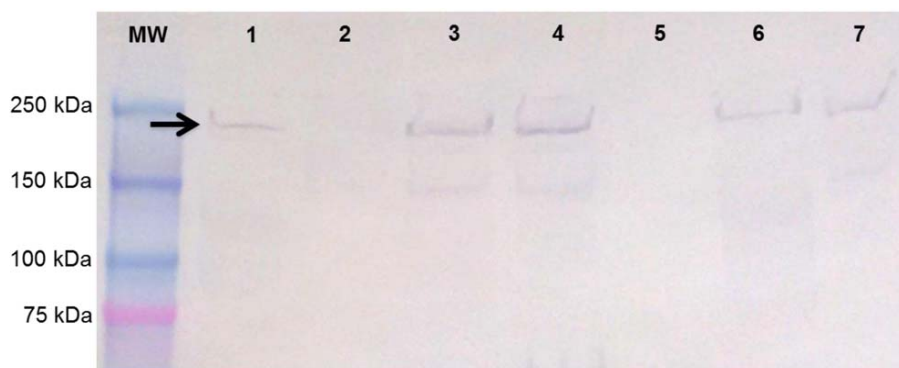
Conception of the work: SC, JPA, NF, DG, MG; laboratory techniques: SC, JPA, AD, DR, SL; acquisition, analysis and interpretation of data: SC, JPA, AD, NF, DG, MG; preparation of the manuscript: SC, JPA, MG. All authors have read and approved this manuscript.

### **Acknowledgements**

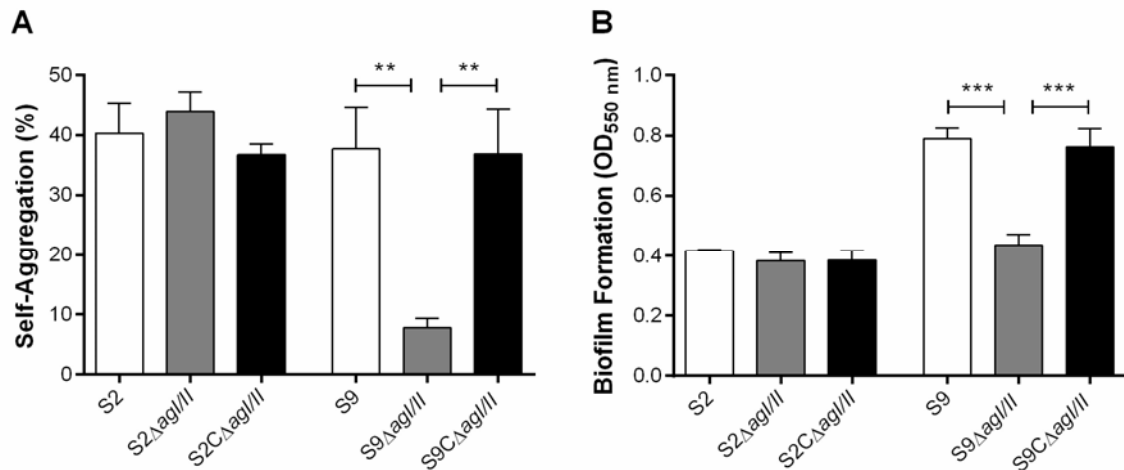
The authors would like to thank Prof. Jianguo Xu (Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China), Prof. Christoph Baums (Leipzig University, Germany), and Dr. Anusak Kerdsin (Lampang Province, Thailand) for providing certain of the *S. suis* strains used in this study. The authors would also like to thank Dr. Paula J. Crowley (University of Florida, USA) for providing the human gp340 used herein as a control for pSAG, as well as Dr. Marisa Haenni and Dr. Pierre Châtre (Anses, France) for providing the pOri23 plasmid. The authors would also like to thank Annabelle Mathieu-Denoncourt, Léa Martelet, and Corinne Letendre for technical support.



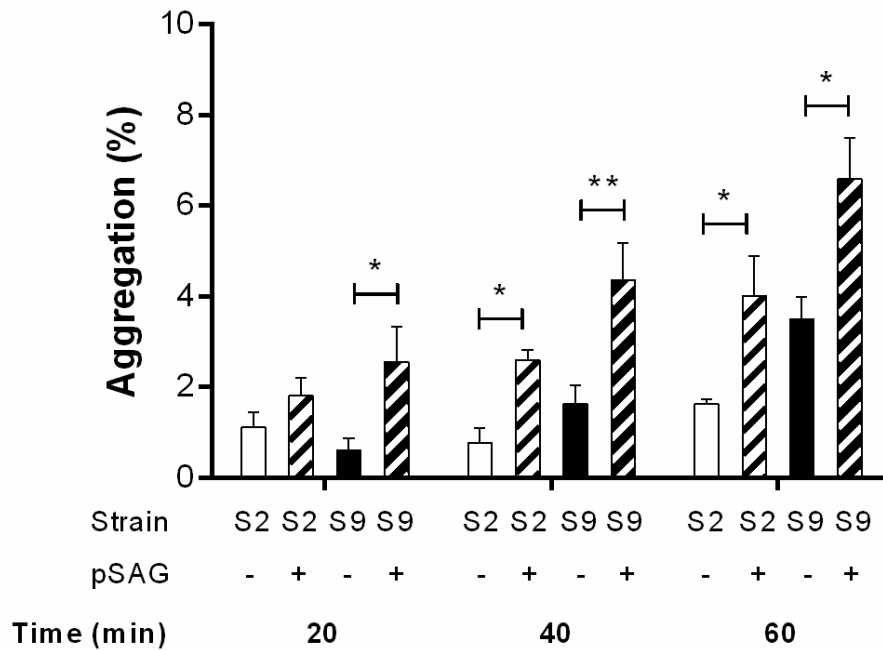
**Figure 1. Characteristics of AgI/II proteins present in different streptococci.** The leader peptide signal (LP), N-terminal domain (N-term), alanine-rich region (A), variable region (V), proline-rich region (P), and C-terminal domain, and the cell wall anchorage domain (CWA) containing the LPXTG domain are illustrated for the *S. suis* AgI/II, *S. pyogenes* AspA, *S. mutans* SpaP, and *S. gordonii* SspA and SspB. Amino acid (aa) size and percentage of *S. suis* AgI/II protein identity are also indicated. Black arrows indicate the location of primers pET151\_S2agl/IIΔCWA\_F and pET151\_S2agl/II\_ΔLPXTG\_R, which were used to produce the His-tagged recombinant AgI/II protein, rAgI/II.



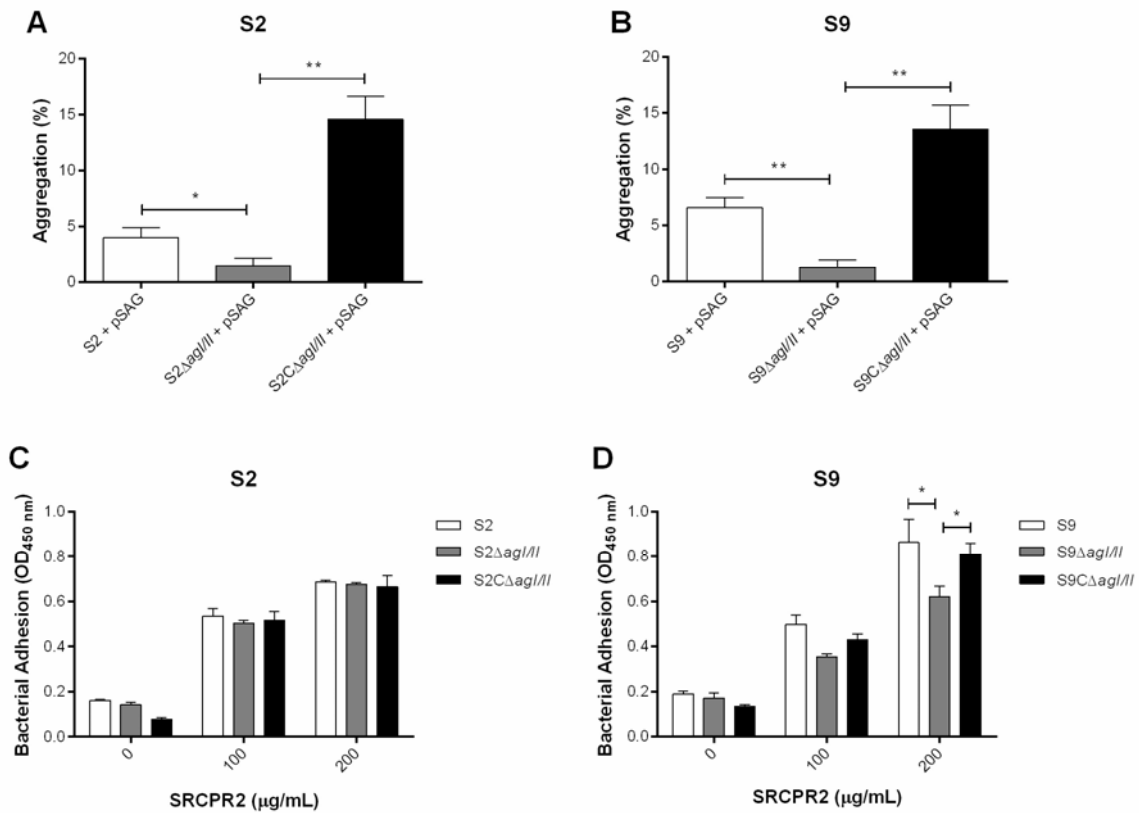
**Figure 2. The AgI/II protein is expressed in the *S. suis* serotype 2 and 9 wild-type strains but is absent in S2Δ*agl/II* and S9Δ*agl/II* mutant strains.** Western blot using cell wall extracts from *S. suis* serotype 2 (wells 1 to 3) and serotype 9 (wells 4 to 6): serotype 2 wild-type strain SC84 (well 1) and serotype 9 wild-type strain 1135776 (well 4); mutant strains S2Δ*agl/II* (well 2) and S9Δ*agl/II* (well 5); and complemented strains S2CΔ*agl/II* (well 3) and S9CΔ*agl/II* (well 6). Expected bands at approximately 180 kDa, shown by the black arrow, were observed for the serotype 2 and 9 wild-type and complemented strains, similar to that obtained with the purified AgI/II protein, rAgI/II (well 7), used as a positive control. MW: molecular weight marker.



**Figure 3. The *S. suis* serotype 9 (S9) AgI/II, but not that of the serotype 2 (S2), is implicated in bacterial self-aggregation and biofilm formation.** The role of the *S. suis* AgI/II was evaluated with regards to cell-to-cell aggregation in fluid phase (A) and biofilm formation capacity in the presence of porcine fibrinogen (B) after 24 h of incubation at 37 °C. Data represent the mean  $\pm$  SEM from at least three independent experiments. \*\* ( $p < 0.01$ ) and \*\*\* ( $p < 0.001$ ) indicate a significant difference between the *S. suis* S9 wild-type or complemented strain (S9C $\Delta$ agl/II) and agl/II-deficient mutant (S9 $\Delta$ agl/II).

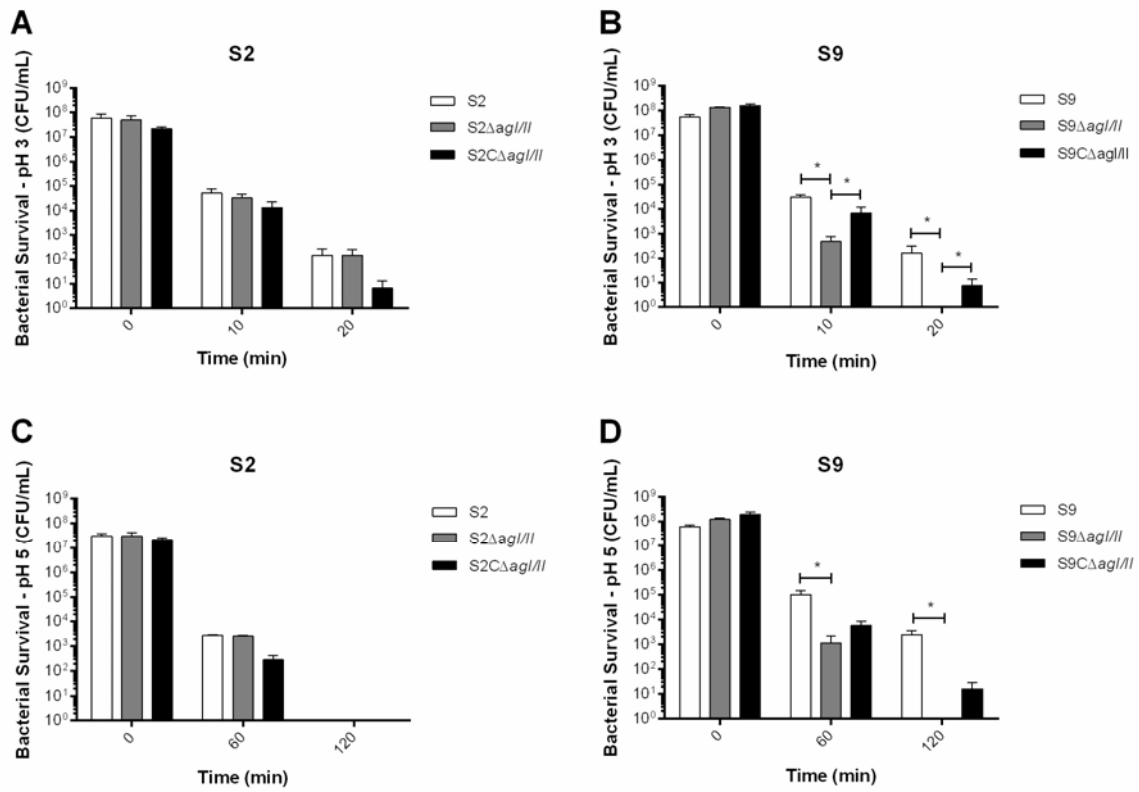


**Figure 4. Porcine salivary agglutinins (pSAGs) aggregate *S. suis* serotype 2 (S2) and serotype 9 (S9).** Evaluation of the fluid phase aggregation of the wild-type *S. suis* S2 and S9 strains in the absence (-) or presence (+) of pSAGs. Aggregation in the absence of pSAGs reflects self-aggregation only. Data represent the mean  $\pm$  SEM from at least three independent experiments. \* ( $p < 0.05$ ) and \*\* ( $p < 0.01$ ) indicate a significant difference of *S. suis* S2 or S9 aggregation in the absence and presence of pSAGs.

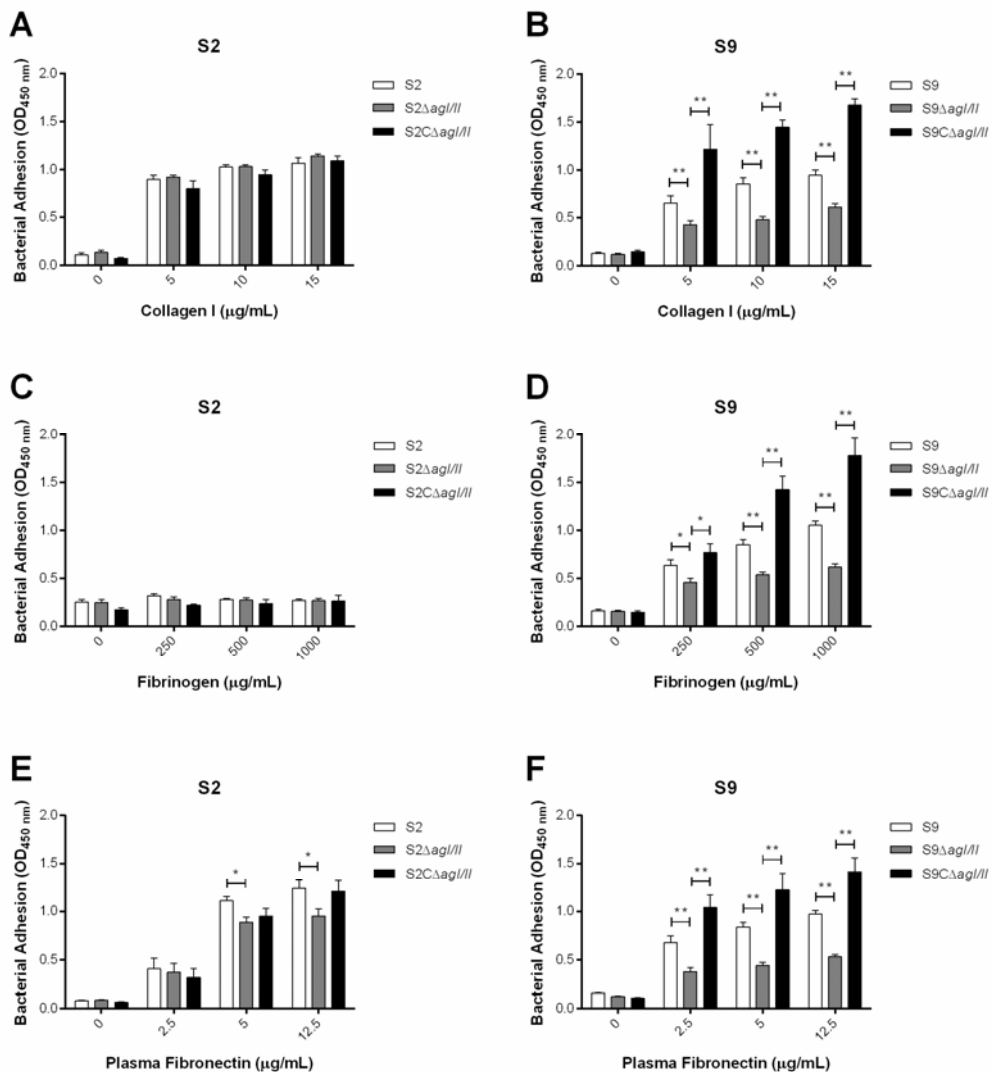


**Figure 5. The *S. suis* serotype 2 (S2) and serotype 9 (S9) AgI/II are involved in adhesion to fluid phase porcine salivary agglutinins (pSAGs), but only for S9 with surface-immobilized pSAGs.** Evaluation of the fluid phase aggregation of S2 (A) and S9 (B) strains to pSAGs or to surface-immobilized gp340-derived peptide SRCR2 by S2 (C) and S9 (D), the latter being measured by ELISA. Data represent the mean  $\pm$  SEM from at least three independent experiments. \* ( $p < 0.05$ ) and \*\* ( $p < 0.01$ ) indicate a significant difference between the *S. suis* S2 or S9 wild-type or complemented strain (S2CΔ*agl/II* or S9CΔ*agl/II*) and the *agl/II*-deficient mutants (S2Δ*agl/II* or S9Δ*agl/II*).

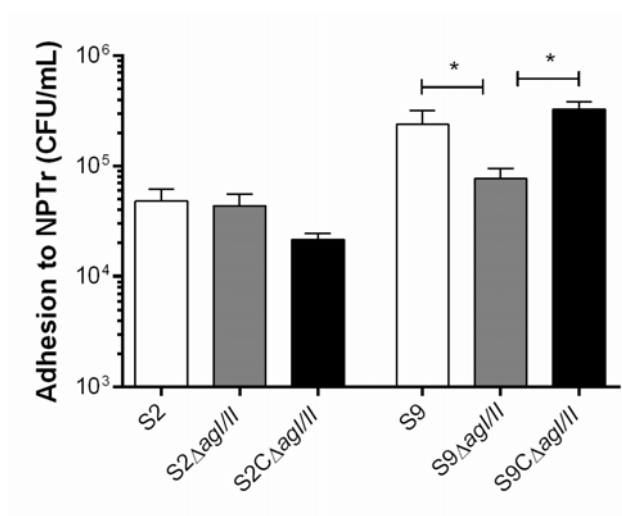




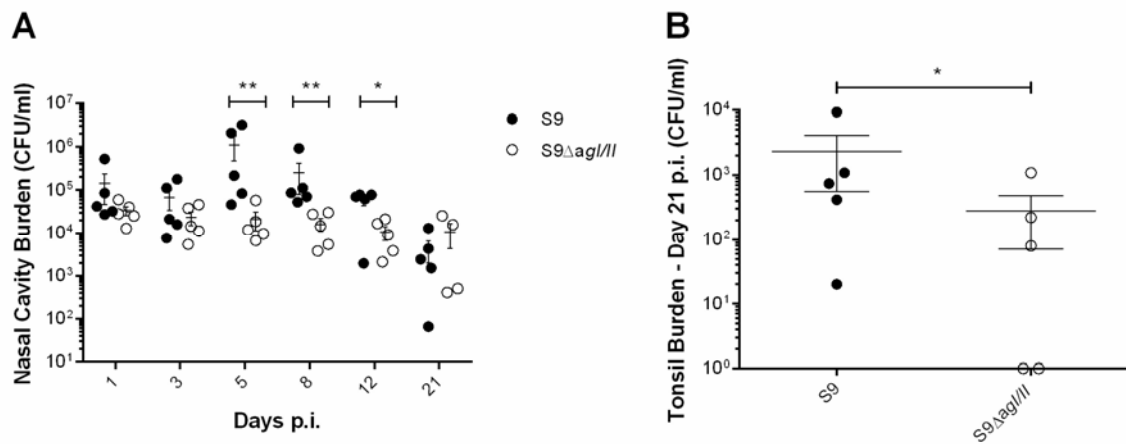
**Figure 6. The *S. suis* serotype 9 (S9) AgI/II, but not that of serotype 2 (S2), is involved in protection against acid stress.** Effect of acid stress on *S. suis* S2 and S9 viability, determined at pH 3 (A and B) and pH 5 (C and D). Data represent the mean  $\pm$  SEM from at least three independent experiments. \* ( $p < 0.05$ ) indicates a significant difference between the *S. suis* S9 wild-type or complemented strain (S9CΔ*agl/II*) and *agl/II*-deficient mutant (S9Δ*agl/II*).



**Figure 7. The *S. suis* serotype 9 (S9) AgI/II and, to a lesser extent, that of serotype 2 (S2), are bacterial adhesins for extracellular matrix proteins.** Adhesion of the *S. suis* S2 and S9 strains to different concentrations of collagen I (A and B), fibrinogen (C and D), and plasma fibronectin (E and F) as evaluated by ELISA. Data represent the mean  $\pm$  SEM from at least three independent experiments. \* ( $p < 0.05$ ) and \*\* ( $p < 0.01$ ) indicate a significant difference between the wild-type or complemented strain ( $C\Delta agI/II$ ) and the  $agl/II$ -deficient mutant ( $\Delta agI/II$ ).



**Figure 8. The *S. suis* serotype 9 (S9) AgI/II, but not that of the serotype 2 (S2), is involved in adhesion to porcine tracheal epithelial cells.** Adhesion of the *S. suis* S2 and S9 strains to NPTr cells after 2 h of incubation with a multiplicity of infection of 10. Data represent the mean  $\pm$  SEM from at least three independent experiments. \* ( $p < 0.05$ ) indicates a significant difference between the *S. suis* S9 wild-type or complemented strain (S9CΔagI/II) and the agI/II-deficient mutant (S9ΔagI/II).



**Figure 9. The *S. suis* serotype 9 (S9) AgI/II is implicated in colonization of the porcine respiratory tract.** An intranasal porcine model of infection was used to determine the implication of the *S. suis* S9 AgI/II in colonization of the nasal cavity (A) and tonsils 21 days post-infection (B). Data represent the mean  $\pm$  SEM from at least three independent experiments. \* ( $p < 0.05$ ) and \*\* ( $p < 0.01$ ) indicate a significant difference between presence of the *S. suis* S9 wild-type strain and the *agI/II*-deficient mutant (S9 $\Delta$ agI/II).

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

Strain or plasmid	Characteristics	Reference
<u>Streptococcus suis</u>		
SC84	Serotype 2 strain isolated from a patient with streptococcal toxic shock-like syndrome in China	[47]
1135776	Serotype 9 strain isolated from pig following sudden death in Canada	This study
S2Δ <i>agI/II</i>	SC84-derived strain carrying an in-frame deletion of the <i>agI/II</i> gene	This study
S9Δ <i>agI/II</i>	1135776-derived strain carrying an in-frame deletion of the <i>agI/II</i> gene	This study
S2CΔ <i>agI/II</i>	SC84-derived strain carrying pOri23-S2 <i>agI/II</i>	This study
S9CΔ <i>agI/II</i>	1135776-derived strain carrying pOri23-S9 <i>agI/II</i>	This study
<u>Escherichia coli</u>		
TOP10	Host for pCR2.1 and pSET4s derivatives	Invitrogen
MC1061	Host for pOri23 derivatives	[16]
BL21(DE3)	Host for pET151 derivatives	Invitrogen
<u>Plasmids</u>		
pET151	Ap <sup>r</sup> , pBR322 <i>ori</i> , T7 promotor	Invitrogen
pCR2.1	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , pUC <i>ori</i> , <i>lacZ</i> ΔM15	Invitrogen
pSET4s	Spc <sup>r</sup> , pUC <i>ori</i> , thermosensitive pG <sup>+</sup> host3 <i>ori</i> , <i>lacZ</i> ΔM15	[37]
pOri23	Erm <sup>r</sup> , ColE1 <i>ori</i> , P23	[28]
pET151-S2 <i>agI/II</i>	pET151 carrying the S2 <i>agI/II</i> gene	This study
pSET4s-S2 <i>agI/II</i>	pSET4s carrying regions upstream and downstream of the S2 <i>agI/II</i> gene	This study
pSET4s-S9 <i>agI/II</i>	pSET4s carrying regions upstream and downstream of the S9 <i>agI/II</i> gene	This study
pOri23 <sub>spc</sub> -S2 <i>agI/II</i>	pOri23 carrying the S2 <i>agI/II</i> gene as well as its promotor and terminator	This study
pOri23 <sub>spc</sub> -S9 <i>agI/II</i>	pOri23 carrying the S9 <i>agI/II</i> gene as well as its promotor and terminator	This study

**Supporting informations** (Disponibles sur le site web de Veterinary Research)

Additional file 1. List of *S. suis* serotype 9 strains used in this study and their characteristics.

Additional file 2. List of primers used in this study.

Additional file 3. *S. suis* serotype 2 (S2) and serotype 9 (S9) AgI/ II amino acid sequence alignment.

Additional file 4. Percent hydrophobicity of the *S. suis* serotype 2 (S2) and serotype 9 (S9) wild-type and *agI/II*-deficient mutant strains.

Additional file 5. Biofilm formation by the *S. suis* serotype 2 (S2) and serotype 9 (S9) wild-type and *agI/II*-deficient mutant strains in the absence of porcine fibrinogen.

## References

1. Segura M, Calzas C, Grenier D, Gottschalk M (2016) Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: fighting against nonspecific defenses. *FEBS Lett* 590:3772–3799
2. Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M (2010) *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol* 5:371–391
3. Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultsz C (2009) *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clin Infect Dis* 48:617–625
4. Goyette-Desjardins G, Auger JP, Xu J, Segura M, Gottschalk M (2014) *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg Microbes Infect* 3:e45
5. Ye C, Zhu X, Jing H, Du H, Segura M, Zheng H, Kan B, Wang L, Bai X, Zhou Y, Cui Z, Zhang S, Jin D, Sun N, Luo X, Zhang J, Gong Z, Wang X, Wang L, Sun H, Li Z, Sun Q, Liu H, Dong B, Ke C, Yuan H, Wang H, Tian K, Wang Y, Gottschalk M, Xu J (2006) *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis* 12:1203–1208
6. Segura M, Fittipaldi N, Calzas C, Gottschalk M (2017) Critical *Streptococcus suis* virulence factors: are they all really critical? *Trends Microbiol* doi: 10.1016/j.tim.2017.02.005
7. Kerdsin A, Hatrongjit R, Gottschalk M, Takeuchi D, Hamada S, Akeda Y, Oishi K (2015) Emergence of *Streptococcus suis* serotype 9 infection in humans. *J Microbiol Immunol Infect* doi: 10.1016/j.jmii.2015.06.011
8. Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M (2012) Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol* 7:259–279
9. Tharavichitkul P, Wongsawan K, Takenami N, Pruksakorn S, Fongcom A, Gottschalk M, Khanthawa B, Supajatura V, Takai S (2014) Correlation between PFGE groups and *mrp/epf/sly* genotypes of human *Streptococcus suis* serotype 2 in Northern Thailand. *J Pathog* 2014:350416

10. Dekker N, Bouma A, Daemen I, Klinkenberg D, van Leengoed L, Wagenaar JA, Stegeman A (2013) Effect of spatial separation of pigs on spread of *Streptococcus suis* serotype 9. PLoS One 8:e61339
11. Brady LJ, Maddocks SE, Larson MR, Forsgren N, Persson K, Deivanayagam CC, Jenkinson HF (2010) The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins. Mol Microbiol 77:276–286
12. Jakubovics NS, Stromberg N, van Dolleweerd CJ, Kelly CG, Jenkinson HF (2005) Differential binding specificities of oral streptococcal antigen I/II family adhesins for human or bacterial ligands. Mol Microbiol 55:1591–1605
13. Madsen J, Mollenhauer J, Holmskov U (2010) Review: Gp-340/DMBT1 in mucosal innate immunity. Innate Immun 16:160–167
14. Kaemmerer E, Schneider U, Klaus C, Plum P, Reinartz A, Adolf M, Renner M, Wolfs TG, Kramer BW, Wagner N, Mollenhauer J, Gassler N (2012) Increased levels of deleted in malignant brain tumours 1 (DMBT1) in active bacteria-related appendicitis. Histopathology 60:561–569
15. Loimaranta V, Jakubovics NS, Hytönen J, Finne J, Jenkinson HF, Strömberg N (2005) Fluid- or surface-phase human salivary scavenger protein gp340 exposes different bacterial recognition properties. Infect Immun 73:2245–2252
16. Casadaban MJ, Cohen SN (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. J Mol Biol 138:179–207
17. Chuzeville S, Dramsi S, Madec JY, Haenni M, Payot S (2015) Antigen I/II encoded by integrative and conjugative elements of *Streptococcus agalactiae* and role in biofilm formation. Microb Pathog 88:1–9
18. Athey TB, Auger JP, Teatero S, Dumesnil A, Takamatsu D, Wasserscheid J, Dewar K, Gottschalk M, Fittipaldi N (2015) Complex population structure and virulence differences among serotype 2 *Streptococcus suis* strains belonging to sequence type 28. PLoS One 10:e0137760



19. Athey TB, Teatero S, Takamatsu D, Wasserscheid J, Dewar K, Gottschalk M, Fittipaldi N (2016) Population structure and antimicrobial resistance profiles of *Streptococcus suis* serotype 2 sequence type 25 strains. PLoS One 11:e0150908
20. Bi D, Xu Z, Harrison EM, Tai C, Wei Y, He X, Jia S, Deng Z, Rajakumar K, Ou HY (2012) ICEberg: a web-based resource for integrative and conjugative elements found in bacteria. Nucleic Acids Res 40:D621–626
21. Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Bryant SH (2015) CDD: NCBI's conserved domain database. Nucleic Acids Res 43:D222–226
22. Fimereli DK, Tsirigos KD, Litou ZI, Liakopoulos TD, Bagos PG, Hamodrakas SJ (2012) CW-PRED: a HMM-based method for the classification of cell wall-anchored proteins of Gram-positive bacteria. Artificial intelligence: theories and applications 285–290
23. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol 305:567–580
24. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat Methods 8:785–786
25. Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, Stockinger H (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. Nucleic Acids Res 40:W597–603
26. Wilson K (2001) Preparation of genomic DNA from bacteria. Curr Protoc Mol Biol doi: 10.1002/0471142727.mb0204s56
27. Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T (2001) Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. Plasmid 46:140–148

28. Que YA, Haefliger JA, Francioli P, Moreillon P (2000) Expression of *Staphylococcus aureus* clumping factor A in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* using a new shuttle vector. *Infect Immun* 68:3516-3522
29. Chu YW, Cheung TK, Chu MY, Tsang VY, Fung JT, Kam KM, Lo JY (2009) Resistance to tetracycline, erythromycin and clindamycin in *Streptococcus suis* serotype 2 in Hong Kong. *Int J Antimicrob Agents* 34:181–182
30. Ngo TH, Tran TB, Tran TT, Nguyen VD, Campbell J, Pham HA, Huynh HT, Nguyen VV, Bryant JE, Tran TH, Farrar J, Schultsz C (2011) Slaughterhouse pigs are a major reservoir of *Streptococcus suis* serotype 2 capable of causing human infection in southern Vietnam. *PLoS One* 6:e17943
31. Li Y, Martinez G, Gottschalk M, Lacouture S, Willson P, Dubreuil JD, Jacques M, Harel J (2006) Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. *Infect Immun* 74:305–312
32. Maddocks SE, Wright CJ, Nobbs AH, Brittan JL, Franklin L, Stromberg N, Kadioglu A, Jepson MA, Jenkinson HF (2011) *Streptococcus pyogenes* antigen I/II-family polypeptide AspA shows differential ligand-binding properties and mediates biofilm formation. *Mol Microbiol* 81:1034–1049
33. Roy D, Grenier D, Segura M, Mathieu-Denoncourt A, Gottschalk M (2016) Recruitment of factor H to the *Streptococcus suis* cell surface is multifactorial. *Pathogens* 5:E47
34. Bordeleau E, Purcell EB, Lafontaine DA, Fortier LC, Tamayo R, Burrus V (2015) Cyclic di-GMP riboswitch-regulated type IV pili contribute to aggregation of *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 197:819–832
35. Bonifait L, Grignon L, Grenier D (2008) Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance. *Appl Environ Microbiol* 74:4969–4972
36. Cook NJ, Hayne SM, Rioja-Lang FC, Schaefer AL, Gonyou HW (2013) The collection of multiple saliva samples from pigs and the effect on adrenocortical activity. *Can J Anim Sci* 93:329–333

37. Brady LJ, Piacentini DA, Crowley PJ, Oyston PC, Bleiweis AS (1992) Differentiation of salivary agglutinin-mediated adherence and aggregation of mutans streptococci by use of monoclonal antibodies against the major surface adhesin P1. *Infect Immun* 60:1008-1017
38. Esgleas M, Lacouture S, Gottschalk M (2005) *Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol Lett* 244:33–40
39. Bikker FJ, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Veerman EC, van't Hof W, Bolscher JG, Poustka A, Nieuw Amerongen AV, Mollenhauer J (2002) Identification of the bacteria-binding peptide domain on salivary agglutinin (gp-340/DMBT1), a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *J Biol Chem* 277:32109–32115
40. Wang Y, Gagnon CA, Savard C, Music N, Srednik M, Segura M, Lachance C, Bellehumeur C, Gottschalk M (2013) Capsular sialic acid of *Streptococcus suis* serotype 2 binds to swine influenza virus and enhances bacterial interactions with virus-infected tracheal epithelial cells. *Infect Immun* 81:4498–4508
41. Roy D, Fittipaldi N, Dumesnil A, Lacouture S, Gottschalk M (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
42. Auger JP, Fittipaldi N, Benoit-Biancamano MO, Segura M, Gottschalk M (2016) Virulence studies of different sequence types and geographical origins of *Streptococcus suis* serotype 2 in a mouse model of infection. *Pathogens* 5:E48
43. Pallarés FJ, Halbur PG, Schmitt CS, Roth JA, Opriessnig T, Thomas PJ, Kinyon JM, Murphy D, Frank DE, Hoffman LJ (2003) Comparison of experimental models for *Streptococcus suis* infection of conventional pigs. *Can J Vet Res* 67:225–228
44. Gottschalk M, Higgins R, Boudreau M (1993) Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 31:2192–2194
45. Fittipaldi N, Broes A, Harel J, Kobisch M, Gottschalk M (2003) Evaluation and field validation of PCR tests for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in subclinically infected pigs. *J Clin Microbiol* 41:5085–5093

46. Hedberg PJ, Leonard BA, Ruhfel RE, Dunny GM (1996) Identification and characterization of the genes of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10 involved in replication and in negative control of pheromone-inducible conjugation. *Plasmid* 35:46–57
47. Chen C, Tang J, Dong W, Wang C, Feng Y, Wang J, Zheng F, Pan X, Liu D, Li M, Song Y, Zhu X, Sun H, Feng T, Guo Z, Ju A, Ge J, Dong Y, Sun W, Jiang Y, Wang J, Yan J, Yang H, Wang X, Gao GF, Yang R, Wang J, Yu J (2007) A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *Streptococcus suis* 2 Chinese isolates. *PLoS One* 2:e315
48. Wozniak RA, Waldor MK (2010) Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol* 8:552–563
49. Puymège A, Bertin S, Chuzeville S, Guédon G, Payot S (2013) Conjugative transfer and cis-mobilization of a genomic island by an integrative and conjugative element of *Streptococcus agalactiae*. *J Bacteriol* 195:1142–1151
50. Sitkiewicz I, Green NM, Guo N, Mereghetti L, Musser JM (2011) Lateral gene transfer of streptococcal ICE element RD2 (region of difference 2) encoding secreted proteins. *BMC Microbiol* 11:65
51. Palmieri C, Princivalli MS, Brenciani A, Varaldo PE, Facinelli B (2011) Different genetic elements carrying the *tet(W)* gene in two human clinical isolates of *Streptococcus suis*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:631–636
52. Zhang A, Yang M, Hu P, Wu J, Chen B, Hua Y, Yu J, Chen H, Xiao J, Jin M (2011) Comparative genomic analysis of *Streptococcus suis* reveals significant genomic diversity among different serotypes. *BMC Genomics* 12:523
53. Scannapieco FA (1994) Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med* 5:203–248
54. Ferrando ML, de Greeff A, van Rooijen WJ, Stockhofe-Zurwieden N, Nielsen J, Wichgers Schreur PJ, Pannekoek Y, Heuvelink A, van der Ende A, Smith H, Schultsz C (2015) Host-pathogen interaction at the intestinal mucosa correlates with zoonotic potential of *Streptococcus suis*. *J Infect Dis* 212:95–105

55. Warneboldt F, Sander SJ, Beineke A, Valentin-Weigand P, Kamphues J, Baums CG (2016) Clearance of *Streptococcus suis* in stomach contents of differently fed growing pigs. *Pathogens* 5:E56
56. Nobbs AH, Shearer BH, Drobni M, Jepson MA, Jenkinson HF (2007) Adherence and internalization of *Streptococcus gordonii* by epithelial cells involves beta1 integrin recognition by SspA and SspB (antigen I/II family) polypeptides. *Cell Microbiol* 9:65–83
57. Franklin L, Nobbs AH, Bricio-Moreno L, Wright CJ, Maddocks SE, Sahota JS, Ralph J, O'Connor M, Jenkinson HF, Kadioglu A (2013) The AgI/II family adhesin AspA is required for respiratory infection by *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One* 8:e62433

### Annexe III: Zmp is not a critical virulence factor as evaluated by a mouse model of intranasal infection

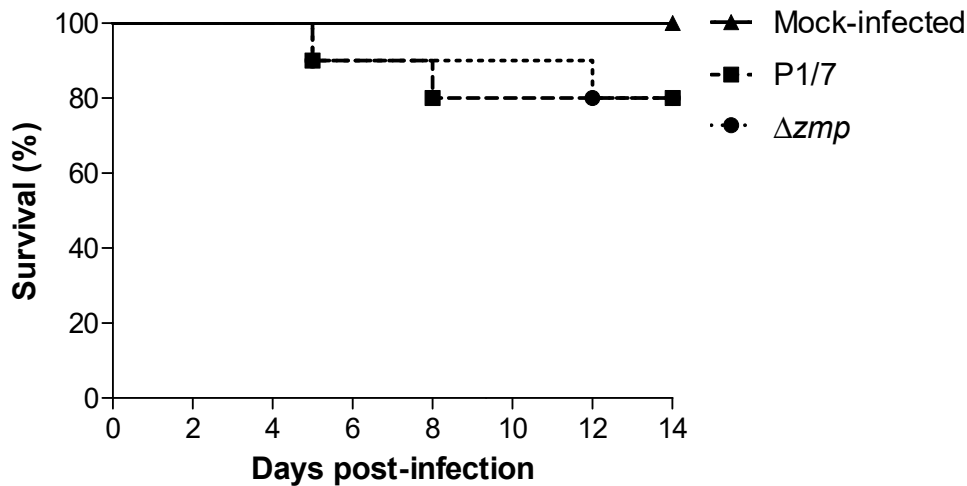


Figure 1. Zmp is not critically implicated in the virulence of *S. suis* serotype 2 in a murine intranasal model of infection. 30 six weeks-old CD-1 mice (Charles River, St-Constant, Qc, Canada) were randomly divided in 3 groups (n=10), before being infected via the intranasal route as previously described (156). Briefly, mice were inoculated with 12.5  $\mu$ l acetic acid 1% in each nostril 1h prior to the infection with 40  $\mu$ l of each either wild-type P1/7, the mutant strain  $\Delta zmp$  ( $8 \times 10^9$  CFU/mouse) or THB (mock-infected). Clinical signs were monitored 3 times a day for the first 72 h post-infection (p.i.) and twice after until the end of the experiment (14 days p.i.). No clinical signs were observed in mock-infected animals. No difference could be observed between mice infected with the wild-type strain and those infected with the mutant strain. Mice presenting severe clinical signs such as prostration, depression and weakness and where euthanized for ethical reasons (20 %).

## Annexe IV: Zmp is not a critical virulence factor as evaluated by a mouse model of systemic infection

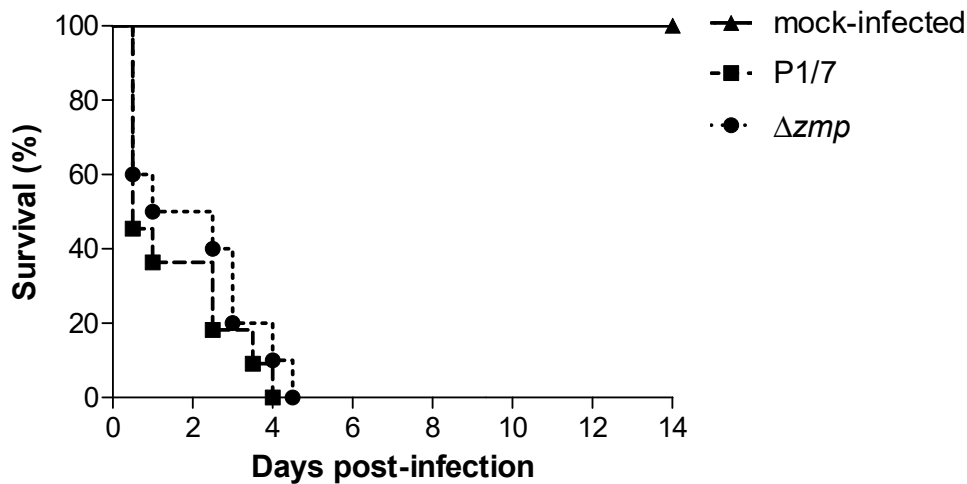


Figure 1. Zmp is not critically implicated in the systemic virulence of *S. suis* serotype 2 in a murine intraperitoneal model of infection. 30 six weeks-old CD-1 mice (Charles River) were randomly divided in 3 groups (n=10), before being infected via the intraperitoneal route as previously described (154). Mice were inoculated with 1 ml of either wild-type P1/7, the mutant strain  $\Delta zmp$  ( $3 \times 10^7$  CFU/mouse) or THB (mock-infected). Clinical signs were monitored 3 times a day for the first 72 h post-infection (p.i.) and twice after until the end of the experiment (14 days p.i.). No clinical signs were observed in mock-infected animals. All mice showed severe clinical signs such as depression, swollen eyes, rough hair coat, prostration and weakness, and all animals died or were euthanized for ethical reasons within 5 days p.i.

## Annexe V: Protection study using purified Zmp in a mouse model of infection

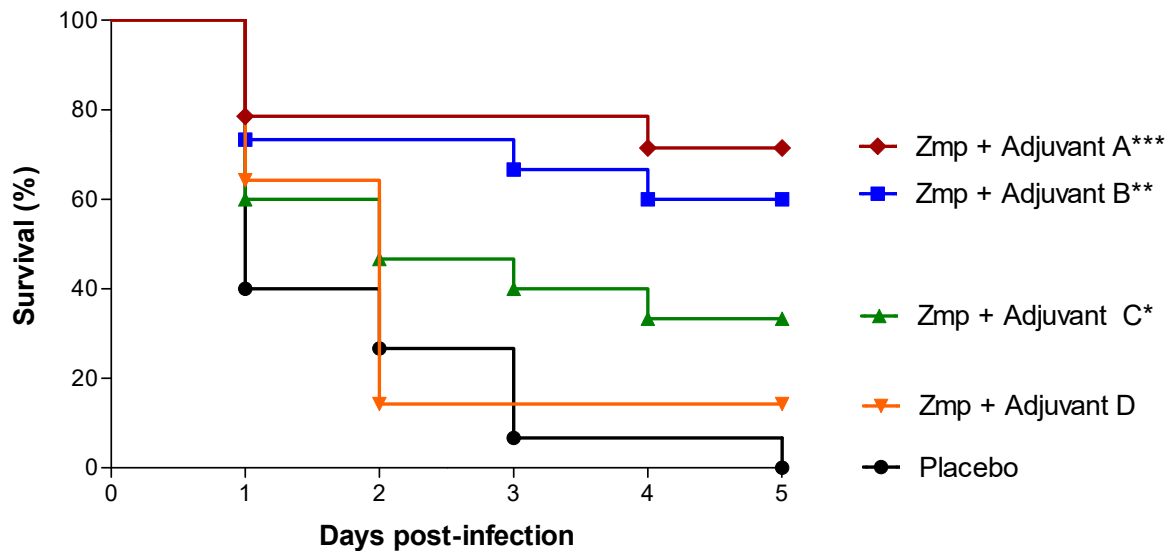


Figure 1. Combination of the recombinant Zmp protein with either adjuvant A or B is protective in CD1-mice against *S. suis* serotype 2 infection. 75 five weeks-old CD-1 mice (Charles River) were randomly divided in 5 groups (n=15) and were immunized at day 0 and 14 with 50 µg of recombinant Zmp protein mixed with 4 distinct adjuvants. At day 28, mice were challenge with a lethal dose of *S. suis* serotype 2 P1/7 ( $1 \times 10^8$  CFU/mouse) via the intraperitoneal route of infection. Clinical signs were monitored 3 times a day for the first 72 h post-infection (p.i.) and twice after until the end of the experiment (5 days p.i.). Placebo and Adjuvant D immunized mice showed severe clinical signs such as depression, swollen eyes, rough hair coat, prostration and weakness, and almost all animals died or were euthanized for ethical reasons within 5 days p.i. In adjuvant A, B and C some mice presented severe clinical signs such as prostration, depression and weakness and died or were euthanized for ethical reasons. \* p=0.29; \*\* p=0.0002; \*\*\* p<0.0001