INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

Bell & Howell Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600

UMI®

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI

Université de Montréal

Rôle de la capsule dans la virulence de *Streptococcus suis* sérotype 2

par
Nathalie Charland
Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en microbiologie et immunologie

Juin 1998

© Nathalie Charland, 1998

Faculté des Études Supérieures
Grade octroyé
à compter du
06 AOUT 1998
Université de Montréal

National Library of Canada
Acquisitions and Bibliographic Services
395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale du Canada
Acquisitions et services bibliographiques
395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-43477-X

Canada

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

Rôle de la capsule dans la virulence de *Streptococcus suis* sérotype 2

présentée par:
Nathalie Charland

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Daniel Dubreuil, Professeur titulaire, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Président-rapporteur
Dr Marcelo Gottschalk, Professeur agrégé, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Directeur de thèse
Dre Josée Hamel, Professeur adjoint, Département de biologie médicale, Faculté de médecine, Université Laval, Examinateur externe
Dr Daniel Grenier, Professeur agrégé, Groupe de recherche en écologie buccale, Faculté de médecine dentaire, Université Laval, Membre du jury

Thèse acceptée le 30.06.1998

SOMMAIRE

Streptococcus suis est une bactérie impliquée dans plusieurs maladies porcines à travers le monde, en plus d'être un agent de zoonose. Des 35 sérotypes, le sérotype 2 est le plus prévalent et le plus virulent. Cependant, aucun facteur de virulence n'est encore confirmé. *S. suis* sérotype 2 possède une capsule polysaccharidique contenant de l'acide sialique (acide *N*-acétyl neuraminique ou NANA). En général, les capsules bactériennes interfèrent avec le système immunitaire de l'hôte, alors que NANA est un agent anti-phagocytaire impliqué dans l'inactivation de la voie alterne du complément. Le rôle exact de la capsule, de même que celui de NANA, dans la virulence et la protection contre une infection à *S. suis* sérotype 2 n'est pas connu. Quelques études indiquent que des souches virulentes et non-virulentes capsulées sont phagocytées similairement par des macrophages mais que seules les souches virulentes survivent à l'intérieur des phagocytes.

Une étude d'agglutination effectuée à l'aide de lectines spécifiques à NANA chez l'espèce *S. suis* a permis de démontrer la présence de NANA chez les sérotypes 1, 2, 1/2, 14, 15 et 16 ainsi que chez tous les isolats de sérotype 2 testés. L'agglutination obtenue avec la lectine du surreau *Sambucus nigra* (SNA I) est spécifique à NANA, un traitement à la sialidase des souches inhibant la réaction. Le rôle de NANA dans la virulence, la résistance à la phagocytose et la survie intracellulaire a ensuite été étudié. La même faible concentration de NANA est retrouvée chez toutes les souches testées, indépendamment de leur virulence. Aucune différence n'a été observée dans la phagocytose entre les souches non-virulente, virulente non-traitée, traitée à la sialidase ou avec la lectine SNA I. De même, aucune différence de virulence n'a été observée avec un modèle murin entre la souche virulente et les souches traitées. L'acide sialique ne semble pas être un facteur de virulence critique pour *S. suis* sérotype 2.

Le rôle de la capsule entière dans la virulence a ensuite été étudié. Deux mutants non-capsulés, obtenus par transposition à partir de la souche de référence, ne réagissant pas avec un anticorps monoclonal anti-capsule et possédant une (mutant 2A) et deux (mutant 79) insertions du transposon Tn*916* ont été sélectionnés. L'absence de capsule, confirmée par différents tests de sérotypie et par microscopie électronique, confère une plus grande hydrophobicité aux mutants et augmente leur phagocytose, comparé à la souche sauvage. De plus, les deux mutants se sont montrés non-virulents pour la souris et le porc. Cette perte de virulence a été associée à une élimination rapide des mutants de la circulation sanguine de la souris, alors que la souche sauvage y persiste au moins 48 h. La capsule est donc un facteur de virulence important pour *S. suis* sérotype 2.

L'implication de la capsule comme facteur de protection a été étudié à l'aide d'un anticorps monoclonal (AcMo Z3) produit contre la souche de référence. Cet anticorps reconnaît uniquement les sérotypes 1, 2 et 1/2. L'épitope est capsulaire et inclut NANA, tel que démontré par la capacité de AcMo Z3 à immunostabiliser la capsule pour la microscopie électronique, par sa sensibilité à l'oxydation par le périodate, par l'absence de réaction entre AcMo Z3 et les bactéries traitées à la sialidase, et par la compétition entre SNA I et AcMo Z3 pour la reconnaissance de la capsule en ELISA. Bien que AcMo Z3 augmente significativement la phagocytose et aide à éliminer de la circulation une dose sous-létale de bactéries, il ne confère qu'une protection partielle contre une dose létale. L'épitope reconnu par AcMo Z3 ne protège pas totalement contre une infection à *S. suis* sérotype 2.

Ces études ont démontré que, bien que NANA ne soit pas impliqué dans la virulence, la capsule est un facteur de virulence important. Cependant, la capsule n'est pas un facteur de virulence unique puisque des souches non-virulentes sont tout de même capsulées. La virulence multi-factorielle de *S. suis* a été démontrée par le fait qu'un anticorps monoclonal anti-capsule ne protège

pas complètement contre une dose létale et que des anticorps contre d'autres épitopes capsulaires ou, plus probablement, protéiques sont requis pour une protection totale.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY ii
SOMMAIRE iii
TABLE DES MATIÈRES vi
LISTE DES TABLEAUX ix
LISTE DES FIGURES x
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS xiii
DÉDICACE xiv
REMERCIEMENTS xv
I. INTRODUCTION 1
II. REVUE DE LA LITTÉRATURE 5
1. *Streptococcus suis* 6
1.1. La bactérie 6
1.2. Les sérotypes 7
1.3. Les infections 8
1.3.1. La pathogenèse de l'infection 10
1.3.2. Le contrôle de l'infection 12
1.4. Facteurs de virulence proposés pour *Streptococcus suis* sérotype 2 ... 13
1.4.1. Protéines 14
1.4.1.1. Hémagglutinines et adhésines 14
1.4.1.2. Fimbriae 15
1.4.1.3. Protéines MRP et EF 15
1.4.1.4. Hémolysine (suilysine) 17
1.4.1.5. Protéine liant les IgG 19
1.4.1.6. Protéine liant l'albumine 19
1.4.1.7. Protéine de stress 20
1.4.1.8. Facteur cytotoxique 20
1.4.2. Polysaccharides capsulaires 21
2. Les capsules bactériennes 21
2.1. Rôles dans la pathogénie 23

2.1.1. Adhérence 23
2.1.2. Immunité non-spécifique 24
2.1.2.1. Résistance à la phagocytose 24
2.1.2.2. Phagocytose et survie intracellulaire 27
2.1.3. Immunité spécifique 28
2.1.4. Composition de la capsule: acide sialique 30
2.1.4.1. Acide sialique d'origine bactérienne 32
2.1.4.2. Implication de l'acide sialique dans la pathogénie bactérienne 33
2.2. Les opérons capsulaires 37
2.2.1. Mutations et virulence 39
2.2.2. Contrôle d'expression de la capsule 39
3. La capsule de *Streptococcus suis* sérotype 2 42
3.1. Capsule de *Streptococcus suis* sérotype 2 et adhérence 43
3.2. Capsule de *Streptococcus suis* sérotype 2 et immunité non-spécifique 43
3.3. Capsule de *Streptococcus suis* sérotype 2 et immunité spécifique 45
III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS 48
Article I: Agglutination of *Streptococcus suis* by sialic acid-binding lectins (1995). J. Clin. Microbiol. **33:** 2220-2221 49
Article II: Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. (1996). FEMS Immunol. Med. Microbiol. **14:** 195-203 52
Article III: *Streptococcus suis* serotype 2 mutants defective in capsular expression. (1998). Microbiology, **144:** 328-332 62
Article IV: Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* types 1, 2 and 1/2. (1997). Microbiology, **143:** 3607-3614 71
IV. DISCUSSION 80
1. Acide sialique et *Streptococcus suis* 81
2. Premier facteur de virulence confirmé pour *Streptococcus suis* sérotype 2 ... 84

3. La capsule, facteur de protection partielle 88
V. CONCLUSIONS 91
VI. BIBLIOGRAPHIE 93
VII. ANNEXE xvii
Article V: *Streptococcus pneumoniae* types 19A and 19F and *Streptococcus suis* capsular type 8 share common capsular epitopes. (1995). J. Clin. Microbiol. **33:** 2492-2495 xviii

LISTE DES TABLEAUX

MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article I:

Table 1. Lectins used in the agglutination assays and their carbohydrate specificities 51

Table 2. Agglutination results for the reference strains of *S. suis* with sialic acid-binding lectins before and after sialidase treatment 51

Article II:

Table 1. Sialic acid concentrations of *Streptococcus suis* capsular type 2 strains grown under *in vitro* and *in vivo* conditions 57

Table 2. Percentages of phagocytosis and intracellular survival of *Streptococcus suis* capsular type 2 strains 90-1330, 89-1591, sialidase-treated 89-1591 and lectin-treated 89-1591 after *in vitro* and *in vivo* growth and left in presence of porcine monocytes for three hours 57

Table 3. Evaluation of the virulence of strain 89-1591 untreated, sialidase-treated and lectin-treated with a murine model of infection 57

Article III:

Table 1. Characterization of two *Streptococcus suis* serotype 2 mutants produced by transposition from reference strain S735-SM 66

Table 2. Experimental infection of specific pathogen free piglets with *Streptococcus suis* serotype 2 reference strain S735-SM and two serotype 2 mutants produced by transposition from strain S735-SM 67

Article IV:

Table 1. Evaluation of the protective activity of a *Streptococcus suis* serotype 2 specific monoclonal antibody Z3, rabbit polyclonal anti-type 2 antibodies and isotype-matched, non-specific monoclonal antibody 5.1 G8 F10 using a standardized murine model of infection 77

LISTE DES FIGURES

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Figure 1. Activation et inactivation de la voie alterne du complément 26

Figure 2. Structure de base de l'acide sialique 30

Figure 3. Organisation génétique des opérons capsulaires d'*Escherichia coli* K1 et des streptocoques du groupe B 38

MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article II:

Figure 1. Transmission electron micrographs of thin sections of *Streptococcus suis* capsular type 2 labeled with polycationic ferritin. (A) Virulent strain 89-1591 and (B) non-virulent strain 90-1330 grown overnight in THB. (C) Strain 89-1591 and (D) strain 90-1330 grown overnight in pig intraperitoneal chambers. Bars = 200 nm 58

Article III:

Figure 1. Transmission electron micrographs of thin sections of *Streptococcus suis* serotype 2 (a) strain S735-SM stabilized with specific type 2 rabbit polyclonal antiserum, (b) strain S735-SM stabilized with normal rabbit serum (negative control) and (c) mutant 2A stabilized with type 2 rabbit polyclonal antiserum. Results similar to (c) were obtained with mutant 79 and similar to (b) with both mutants. Bar, 200 nm ... 66

Figure 2. Southern blot with digoxigenin-labeled Tn*916* of total cellular DNA of strain S735-SM digested with *Eco*RI (A), DNA of mutant 2A digested with (B) *Eco*RI, (C) *Sca*I, and DNA of mutant 79 digested with (D) *Eco*RI, (E) *Sca*I. Numbers on the left indicate the molecular weights of standards in kb. Image generated using a HP ScanJet IIc with PhotoFinish 2.0 software on a PC 486 DX 67

Figure 3. Bacterial clearance in mice injected with *Streptococcus suis* serotype 2 strain S735-SM (O) and acapsular mutant 2A (●) (*n*=3) 68

Article IV:

Figure 1. Immunoblot using the monoclonal antibody Z3, purified capsular material (CPS; 50 µg per well) and whole cells (WC adjusted to an OD_{540} of 6; 20 µl per well) of *Streptococcus suis* serotype 2 reference strain S735 with different treatments. Lane A: untreated CPS; Lane B: periodate-treated CPS; Lane C: untreated WC; Lane D: sialidase-treated WC; Lane E: immunoblot of untreated CPS with isotype-matched, non-specific monoclonal antibody 5.1 F8 G10 as a negative control. Numbers on the left indicate the molecular weights of standards in kDa. Image generated on a PC 486DX with a HP ScanJet IIc scanner using PhotoFinish 2.0 (Zsoft Corporation) 74

Figure 2. ELISA-competition test between monoclonal antibody Z3 and *Sambucus nigra* lectin (SNA I) with *Streptococcus suis* serotype 2 purified capsular material as antigen (*n*=4) 75

Figure 3. Inhibition of monoclonal antibody Z3 by whole cells (WC) of *Streptococcus suis* serotype 2 (◆), proteinase K (▲), sialidase (■), and periodate (●) -treated WC of type 2, WC of type 1 (×), WC of type 1/2 (✱), and type 2 purified capsular material as an antigen in an ELISA-inhibition test (*n*=4) 75

Figure 4. Transmission electron micrograph of thin sections of cells of *Streptococcus suis* serotypes 1 (a), 1 / 2 (b), 2 (c) and 3 (d; negative control) incubated with monoclonal antibody Z3 and stained with ruthenium red. Bar, 200 nm 76

Figure 5. Clearance of circulating *Streptococcus suis* serotype 2 in BALB/c mice injected with (■), or without (◆) monoclonal antibody Z3, or with isotype-matched, non-specific monoclonal antibody 5.1 F8 G10 (▲) as a negative control (*n*=2) 77

ANNEXE

Article V:

Figure 1. Transmission electron micrographs of bacterial cells of *S. suis* capsular type 8 (strain 14636/74) (A) and *S. pneumoniae* type 19F (strain 4117) (B) incubated with Mab 182, A-1 and colloidal gold-labeled goat anti-mouse immunoglobulin. Bars, 200 nm xx

Figure 2. Transmission electron micrographs of thin sections of cells of *S. suis* 14636/74 incubated with Mab 182, A-1 and stained with ruthenium red (A) or stained with ruthenium red without antibody stabilization (B). (C) Ruthenium red-stained, immunostabilized cells incubated with Mab 182, A-1 and colloidal gold labeled with goat anti-mouse immunoglobulin. Bars, 200 nm xxi

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

AcMo	Anticorps monoclonal
CMP-NANA:	Cytidine 5'-monophosphate-*N*-acetylneuraminic acid
DEAE:	Diethylaminoethyl
EF:	Extracellular factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
G+C:	Guanidine et Cytosine
Gal:	Galactose
GalNAc	*N*-acétylgalactosamine
GbO_3	Céramide trihexosyl
hsp:	Heat shock protein
IgG:	Immunoglobuline de type G
IgY:	Immunoglobuline de type Y (IgG chez le poulet)
IL	Interleukine
kDa:	Kilodaltons
LCR:	Liquide céphalorachidien
LOS:	Lipooligosaccharides
LPS:	Lipopolysaccharides
MBP:	Mannose binding protein
MGB:	Méningocoques du groupe B
MRP:	Muramidase released protein
NANA:	*N*-acetylneuraminic acid (acide sialique)
N-CAM	Neural cell adhesion molecule
NK	Natural killer
PMN:	Polymorphonucléaires
SGB:	Streptocoques du groupe B
SNA	*Sambucus nigra* agglutinine
SPF	Specific pathogen free
VAC:	Voie alterne du complément
VP:	Voges-Proskauer

DÉDICACE

À ma mère, pour son amour et son soutien autant terrestre que céleste et pour son dévouement à l'éducation.

À mon père, pour son amour, sa présence et son enthousiasme pour ses enfants,

À mon frère, pour son affection et son soutien dans ma "folie universitaire".

Et à toi, mon Amour et Ami, pour la lumière de tes yeux et la chaleur de ton sourire...

L'humour est le condiment le plus épicé du festin de l'existence...

Il faut rire de ses erreurs mais apprendre à partir d'elles,

Se moquer de nos problèmes mais en retirer de la force,

Faire de nos difficultés un sujet de plaisanterie mais les surmonter...

Lucy Maud Montgomery

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier toutes les personnes ayant participées de près ou de loin à ce projet de doctorat et plus particulièrement:

- Le docteur Marcelo Gottschalk, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire d'abord comme agente de recherche, ensuite comme étudiante. Je le remercie pour sa présence, pour ses conseils judicieux et pour son enthousiasme contagieux
- La docteure Marylène Kobisch et toute son équipe, spécialement les docteurs Béatrice Blanchard et Bruno Chevallier, de l'Unité de Recherche en Mycoplasmologie Bactériologie du CNEVA-Ploufragan en France, pour m'avoir donné la possibilité d'effectuer deux stages dans leur laboratoire de Bretagne et pour leur aide lors des essais expérimentaux sur les porcelets
- Le docteur Mario Jacques, ainsi que sa technicienne Mme Bernadette Foiry, pour leur expertise en microscopie électronique
- La docteure Josée Harel, ainsi que sa technicienne Mme Céline Forget, pour leur expertise en biologie moléculaire et pour leur patience lors de nos discussions
- La docteure Béatrice Doizé, pour son implication lors de mon premier stage en France
- Les docteurs Craig E. Rubens, Victor Nizet et Harry Yim du Children's Hospital and Medical Center de l'Université de Washington à Seattle, pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire et pour leurs conseils
- Dominique Dugourd, Serge Harpin et Stéphane Rioux, pour les interminables et intéressantes discussions sur la biologie moléculaire
- Tous mes collègues du laboratoire, passés ou présents, qui m'ont apporté leur soutien technique et moral tout au long de ce projet, spécialement Sonia Lacouture et Mariela Segura. Merci pour les folies et les rires!
- Tous les membres et étudiants du Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, pour leur implication ou leurs encouragements

❀ Le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada, le Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec, le Conseil de Recherche en Pêche et en Agro-alimentaire du Québec, l'Université de Montréal et le Centre de Coopération Inter-Universitaire Franco-Québécoise pour le financement de ce projet

❀ Ma famille, Sébastien, mes amis et *amigos* (Laura!), pour leur soutien constant, pour leur présence dans les bons et moins bons moments et pour leur affection

Merci...!

I- INTRODUCTION

Streptococcus suis, un coque de Gram positif α-hémolytique, cause plusieurs maladies et syndromes porcins. D'abord identifiée comme appartenant à de nouveaux groupes de Lancefield (R, S, RS et T), il est finalement démontré que la bactérie possède l'antigène du groupe D. Les groupes R, S, RS et T deviennent les types capsulaires (sérotypes) 2, 1, 1/2 et 15 respectivement. L'espèce *S. suis*, génétiquement homogène et différente des autres groupes de Lancefield, est officialisée en 1987. Jusqu'à ce jour, on dénombre 35 sérotypes de *S. suis*. Les sérotypes sont établis sur la base des antigènes capsulaires polysaccharidiques de la bactérie. *S. suis* est considéré comme un habitant normal du tractus respiratoire supérieur des porcs, dont les amygdales qui seraient le réservoir chez les animaux porteurs. Cependant, les streptocoques deviennent parfois invasifs et peuvent causer des méningites, des endocardites, des pneumonies, des septicémies, des arthrites et des avortements chez l'espèce porcine. La transmission se ferait par le déplacement d'animaux porteurs entre les troupeaux. La bactérie a aussi été isolée de plusieurs autres espèces animales (bovins, équins, oiseaux, etc.) dont l'espèce humaine. *S. suis* est un agent de zoonose, surtout pour les personnes en contact fréquent avec les porcs, causant des méningites, des endocardites et des septicémies. Quelquefois fatales, les infections à *S. suis* chez l'espèce humaine laissent souvent des séquelles telles l'arthrite et la surdité chez les convalescents.

De tous les sérotypes de *S. suis* décrits jusqu'à maintenant, le sérotype 2 est le plus prévalent et le plus virulent à travers le monde. La pathogenèse des infections causées par le sérotype 2 est peu connue. L'hypothèse proposée pour expliquer la méningite à *S. suis* implique les macrophages. Ces derniers phagocyteraient les bactéries présentes dans le sang, les souches virulentes survivraient à l'intérieur des phagocytes et, ainsi protégées, traverseraient la barrière hémato-méningée jusqu'au liquide céphalorachidien. Par contre, lors d'une infection à *S. suis*, peu de monocytes sanguins de porcs contiennent des bactéries.

La pathogenèse des infections à *S. suis* est peu connue d'abord parce que les facteurs de virulence de la bactérie sont très peu connus. Une meilleure connaissance de ces facteurs permettrait un meilleur contrôle des infections. À l'intérieur même du sérotype 2, la virulence des souches varie de non-virulente à très virulente. Plusieurs composantes bactériennes ont été proposées comme facteurs de virulence potentiels du sérotype 2. La majorité de ces déterminants bactériens sont de nature protéique, mais la bactérie possède aussi des polysaccharides capsulaires pouvant être impliqués dans la virulence. La capsule de *S. suis* sérotype 2 se compose de 5 sucres dont l'acide sialique, le troisième sucre en importance. Cependant, aucun de ces facteurs de virulence proposés n'a pu être directement impliqué dans la virulence de *S. suis* jusqu'à maintenant.

Les capsules bactériennes sont des structures complexes de polymères fortement hydratés souvent arrangés en oligosaccharides répétitifs. Plusieurs bactéries capsulées sont responsables d'infections graves autant chez l'espèce humaine que chez les espèces animales. Ces capsules sont impliquées dans la pathogénie par leur rôle dans l'adhérence des bactéries et/ou la protection contre le système immunitaire, non-spécifique ou spécifique. Les effets sur le système immunitaire peuvent être causés par la présence de la capsule et/ou sa composition, si la capsule possède de l'acide sialique. La capsule peut inhiber l'opsonisation et bloquer la phagocytose d'une bactérie par empêchement stérique ou par la présence de l'acide sialique. L'acide sialique est un agent anti-phagocytaire dû à l'affinité du facteur H (protéine impliquée dans l'inactivation de la voie alterne du complément) pour ce sucre. D'un autre côté, l'acide sialique étant un sucre retrouvé dans plusieurs cellules animales, il peut mimer ces sucres des cellules de l'hôte et, de ce fait, empêcher la production d'anticorps. L'importance de la capsule ou de l'acide sialique dans la virulence de plusieurs pathogènes a été établie, entre autres, à l'aide de mutants isogéniques sans capsule ou sans acide sialique. Ces mutants sont généralement non-virulents.

Bien que proposée comme facteur de virulence, la capsule de *S. suis* sérotype 2 a peu été étudiée à ce niveau. Selon l'hypothèse suggérée, la capsule serait peu importante pour la virulence, puisque des souches virulentes et non-virulentes capsulées sont phagocytées de la même façon par de macrophages péritonéaux de souris. Seules les souches virulentes survivraient à l'intérieur des phagocytes et traverseraient la barrière hémato-méningée.

D'un autre côté, les bactéries phagocytées ne représentant qu'un faible pourcentage de l'inoculum, la majorité des bactéries demeureraient à l'extérieur des phagocytes. Cette constatation suggère que les bactéries traverseraient la barrière hémato-méningée librement plutôt qu'à l'intérieur des cellules phagocytaires.

Le but de ce projet de doctorat est de démontrer que la capsule de *S. suis* sérotype 2 est un facteur de virulence. L'hypothèse proposée est que la capsule et/ou sa composante acide sialique confèrent une capacité anti-phagocytaire à la bactérie, favorisant sa dissémination à travers l'hôte.

II- REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. *Streptococcus suis*

Depuis sa découverte au milieu du siècle jusqu'à ce jour, *S. suis* représente une des bactéries du porc les plus importantes dans tous les pays où l'industrie porcine est intensive [1]. Au Québec seulement, les pertes économiques dans les systèmes d'engraissement commerciaux s'élèvent à environ 8.5 millions de dollars par année (Dr Camille Moore, communication personnelle).

1.1. La bactérie

Durant les années 50, des cas de septicémies causant des méningites et des arthrites chez des porcs d'âges divers ont été reliés à la présence de streptocoques α–hémolytiques [2-4]. Cette bactérie, de Gram positif et de forme ovoïde, se présente seule ou en paires et forme parfois de courtes chaînes [4, 5]. Anaérobie facultative, la bactérie forme des colonies grises et minuscules produisant une hémolyse α sur la plupart des milieux contenant du sang de diverses espèces animales, mais peuvent être entourées d'une hémolyse β sur milieu avec sang de cheval [4, 6].

C'est en 1966 que le terme *Streptococcus suis* est proposé pour décrire ces streptocoques impliqués dans diverses infections chez le porc [7]. L'espèce est officialisée en 1987 [5]. L'identification préliminaire de la bactérie requiert une absence de croissance sur milieu contenant 6.5% NaCl, un test Voges-Proskauer (VP) négatif et la production d'acide à partir de bouillons tréhalose et salicine [6]. D'autre part, Devriese et coll. [8] suggèrent que les test VP négatif et amylase positif seraient suffisants pour l'identification. Cependant, certains résultats sont variables et d'autres tests biochimiques doivent parfois être réalisés [6].

La bactérie est considérée comme un membre de la flore normale du tractus respiratoire supérieur des porcs, dont les amygdales et les cavités

nasales, bien qu'elle soit aussi retrouvée au niveau des tractus gastro-intestinal et génital [8, 9].

1.2. Les sérotypes

L'attrait des cas décrits au début des années 50 était dû au fait que les streptocoques n'appartenaient à aucun des groupes de Lancefield alors connus (A à Q) [4]. de Moor propose donc que ces souches soient incluses dans les groupes R, S, RS et T [4]. Cependant, Elliott et coll. [10] démontrent finalement que *S. suis* possède l'antigène de paroi du groupe D de Lancefield, soit l'acide lipoteichoïque. Cet antigène est masqué par une capsule [11], ce que de Moor avait interprété comme un nouveau type d'antigène de groupe. En 1975, les sérotypes 1, 2 et 1/2 remplacent les groupes S, R et RS respectivement [12]. Le sérotype 1/2 (RS) possède les antigènes des sérotypes 1 et 2, bien que sa partie correspondant au sérotype 1 soit quelque peu différente [13]. Le groupe T est remplacé par le sérotype 15 [14].

Les sérotypes sont établis sur la base d'antigènes capsulaires polysaccharidiques et leur identification se fait à l'aide de 3 tests principaux: la coagglutination (méthode de choix), la réaction capsulaire et la précipitation en capillaire [6]. Trente-cinq sérotypes capsulaires ont pu être identifiés jusqu'à maintenant [12, 14-17]. Cependant, plusieurs isolats sont encore non-typables, dû à l'absence de capsule [6] ou dû à la présence de sérotypes additionnels non-caractérisés [18]. Les souches de référence proviennent principalement de porcs malades. Cependant, les souches de référence des sérotypes 17, 18, 19 et 21 ont été isolés de porcs sains, alors que celle du sérotype 14 provient d'un cas humain, celles des sérotypes 20 et 31 de cas bovins, et celle du sérotype 33 d'un cas ovin [14, 17]. De tous les sérotypes, le sérotype 2 est le plus prévalent chez les porcs malades à travers le monde [1]. Il est à noter que plusieurs sérotypes peuvent être retrouvés chez un même animal [19, 20].

Les sérotypes ont aussi été caractérisés au niveau moléculaire. Tout d'abord, Kilpper-Balz et Schleifer [5] démontrent que l'espèce *S. suis* est génétiquement différente des autres espèces de streptocoques, ce qui a été confirmé par Kawamura et coll. [21], et qu'elle présente une composition G+C variant de 34 à 46%. D'autre techniques moléculaires montrent que *S. suis* présente une grande diversité génétique entre les différents sérotypes et à l'intérieur d'un même sérotype [22-28]. Par contre, l'analyse des séquences des gènes d'ARN ribosomal 16S a permis de montrer une forte similarité (94-100%) entre les souches de référence de *S. suis* [29]. De plus, cette étude confime que la bactérie est différente des autres espèces du genre *Streptococcus* [29]. Une certaine controverse existe sur le lien entre les profils génétiques et la virulence des souches. D'une part, Okwumabua et coll. [27] et Staats et coll. [30] se disent capables de différencier les souches virulentes des non-virulentes, alors que Beaudoin et coll. [23], Hampson et coll. [24] et Chatellier et coll. [29] n'ont pu établir de différences. Ceci serait probablement dû à la définition de la virulence d'une souche, celle-ci étant souvent basée sur des résultats obtenus à partir de modèles expérimentaux chez la souris [31-34]. Par contre, il semblerait que la virulence des souches serait spécifique à l'hôte naturel [30, 35].

1.3. Les infections

Tous les sérotypes ne sont pas impliqués dans des infections et des souches d'un même sérotype peuvent causer des infections diverses ou ne pas causer d'infection du tout [36]. Le sérotype 1 est généralement associé aux infections chez de très jeunes porcelets (2 à 6 semaines) [37] alors que le sérotype 2 affecte des porcs de tous âges [1]. Il est à noter que 75% des porcs affectés sont âgés de 16 semaines ou moins [20]. Généralement, les isolats de cas cliniques se retrouvent dans les 8 premiers sérotypes [38-41]. Comme mentionné à la section 1.2, le sérotype 2 est le plus prévalent à travers le monde et le plus virulent. Cependant, à l'intérieur même de ce sérotype, la virulence des souches varie [9, 31, 42, 43].

Les infections à *S. suis* sont remarquables d'abord par les signes cliniques, signes qu'on ne peut associer à aucun sérotype [20]. Il est à noter que la mort peut survenir rapidement et sans signes cliniques préalables [1]. Une forte hausse de température accompagne généralement la bactériémie. Ensuite, le porc peut présenter de l'anorexie, de la toux, des pertes de coordination, du pédalage, de l'opisthotonos, des convulsions et des rougeurs aux muqueuses [36]. Les lésions et maladies observées, toujours non-associables à un sérotype particulier, sont limitées en général aux poumons (pneumonie, bronchopneumonie), au cerveau (méningite), au coeur (endocardite, péricardite) et aux articulations (arthrite); des avortements et septicémies ont aussi été rapportés [4, 38, 44-47]. Malgré le fait que les infections respiratoires impliquant *S. suis* soient très répandues, le rôle de la bactérie comme pathogène pulmonaire primaire est controversé, dû à la difficulté à reproduire la maladie expérimentalement et à l'isolement d'autres pathogènes en plus de *S. suis* pouvant aider au développement de la pneumonie [20, 48]. *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* et *Bordetella bronchiseptica* ont entres autres été retrouvés en association avec *S. suis* dans des poumons de porcs, suggérant que des infections déjà présentes lors de l'apparition des streptocoques favoriseraient la pneumonie [20, 48, 49]. D'ailleurs, une pré-infection avec *B. bronchiseptica* est souvent nécessaire pour induire une pneumonie à *S. suis* [42]. Le diagnostic d'une infection à *S. suis* se base sur la présence de signes cliniques (surtout ceux de la méningite), les lésions observées et l'isolement de la bactérie [1]. Plusieurs tests sérologiques ont été développés mais leur spécificité est réduite dû à la présence de réactions croisées avec d'autres bactéries ou sérotypes, à l'absence des antigènes utilisés dans le test chez les souches recherchées ou à la faible production d'anticorps contre les antigènes utilisés [9, 50-53].

La transmission des infections se ferait par le déplacement de porteurs sains entre les troupeaux [1]. Un porc peut être porteur sans signes cliniques ou le devenir après avoir présenté des signes [54]. La bactérie colonise les

amygdales et survit même en présence d'anticorps ou d'antibiotiques en circulation [55, 56]. Le taux d'animaux porteurs de *S. suis* peut atteindre 100% chez les porcs vivants [57] ou échantillonés à l'abattoir [9]. L'infection s'effectuerait via les voies respiratoires lors de l'introduction d'animaux porteurs, pendant la mise-bas et l'allaitement (entre une truie-porteuse et les porcelets) ou à l'engraissement (par la contamination de la nourriture avec la salive des animaux porteurs) [9, 58, 59]. La transmission serait aussi possible par les mouches et les personnes en contact avec les animaux [60, 61]. Cependant, même si la bactérie peut survivre pendant un certain temps dans l'environnement, elle est détruite rapidement par des désinfectants [54].

En plus du porc, la bactérie a été isolée de diverses espèces animales dont des ruminants, des chevaux, des chats, des chiens, des animaux sauvages et même des oiseaux [62-67].

La bactérie est aussi un agent de zoonose puisqu'elle a été retrouvée chez l'homme [68]. Les sérotypes 2, 4 et 14 ont été retrouvés chez l'espèce humaine [14, 68-71]. Certaines de ces souches présentaient le même profil génétique que des souches infectant les porcs [24]. Les personnes affectées sont généralement en contact étroit avec les porcs (éleveurs, travailleurs d'abattoir, bouchers, etc.) [68, 72]. Chez l'homme, la bactérie cause des méningites, des septicémies et des endocardites [68, 73-75]. Les infections sont parfois mortelles mais lorsque la personne survit, elle demeure souvent avec des séquelles temporaires (arthrite) ou permanentes (surdité) [68, 72]. Il est à noter que la bactérie, tout comme chez les porcs, a pu être isolée à partir d'amygdales de travailleurs d'abattoir ne présentant aucun signe clinique [61].

1.3.1. La pathogenèse de l'infection

La pathogenèse de l'infection à *S. suis* a surtout été étudiée avec le sérotype 2 au niveau de la méningite. La pathogenèse est peu connue mais quelques hypothèses ont été suggérées selon les observations faites lors

d'infections. L'une des hypothèses est que la bactérie, après avoir colonisée les amygdales, pourrait se répandre de façon systémique via le système lymphatique ou sanguin à partir du nasopharynx, causant une septicémie et la mort [76, 77]. L'hypothèse la plus récente suggère que les monocytes phagocyteraient les bactéries présentes dans le sang et les porteraient jusqu'au système nerveux central. Les monocytes, avec les bactéries phagocytées mais toujours vivantes à l'intérieur, traverseraient la barrière hémato-méningée jusqu'au liquide céphalorachidien (LCR) via le plexus choroïde [78].

Plusieurs observations ont donné lieu à cette hypothèse. L'importance du rôle des macrophages dans les infections à *S. suis* est démontrée par le fait que l'inoculation d'une souche non-virulente directement à la *cisterna magnum* cause une méningite, alors que cette même souche injectée par voie intraveineuse ne produit aucun signe clinique [79]. Il est à noter que lorsque *S. suis* est injecté à un porc par voie intraveineuse, la bactérie cause les mêmes lésions que lorsque le porc est infecté naturellement [80]. C'est l'étude de ces lésions qui amène Williams et Blakemore à émettre l'hypothèse que *S. suis* utilise le principe du "cheval de Troie" pour se rendre jusqu'au système nerveux central [81]. Les chercheurs remarquent qu'aucun endommagement n'est visible au niveau des cellules endothéliales et que seule la bordure en brosse des cellules épithéliales est affectée [78]. De plus, des macrophages ayant phagocytés des billes de latex de la grosseur de la bactérie en circulation sont retrouvés au niveau du système nerveux central, indiquant qu'ils ont traversé la barrière hémato-méningée avec les billes [78]. Finalement, des monocytes avec des bactéries associées, possiblement intracellulaires, sont retrouvés dans la circulation. Les auteurs suggèrent que les bactéries entrent dans le LCR, via le plexus choroïde, en association avec les macrophages en migration qui viennent remplacer les macrophages du système nerveux central qui sont à la fin de leur vie [81]. Par contre, lors d'une infection, moins de 2% des monocytes de porcs présentant une bactériémie contiennent des bactéries [78]. Les monocytes pourraient aussi produire des cytokines, ce qui causerait une réaction inflammatoire au niveau du

LCR [46]. Une augmentation de la pression intracrânienne, due au blocage du drainage du LCR par l'infiltration de cellules inflammatoires et la présence des bactéries, serait associée aux lésions et signes cliniques observés lors d'une méningite [46, 82].

La pathogenèse de l'infection est influencée par le statut immunitaire de l'animal (sa susceptibilité à l'infection diminuant avec l'âge après le sevrage [83]), les facteurs environnementaux et la virulence de la bactérie [9]. Des modèles murins ont été développés qui permettent de reproduire la virulence ou la non-virulence des souches de porc chez la souris et d'étudier les divers facteurs de virulence proposés pour *S. suis* [31-34]. Cependant, certains groupes soutiennent que seul un modèle d'infection chez le porc, qui diffère de celui murin, peut reproduire l'infection naturelle [30, 35, 84].

1.3.2. Le contrôle de l'infection

Des traitements par antibiotiques peuvent être efficaces s'ils sont administrés assez tôt [1]. Une des méthodes souvent utilisées est l'ajout de pénicilline à la nourriture des animaux [85]. Cependant, la pénicilline ne devrait pas être ajoutée à la nourriture mais plutôt à l'eau, et sous forme de type V plutôt que de type G pour atteindre la concentration bactéricide nécessaire au niveau du sérum des animaux [86]. Avant 1989, aucune résistance à cet antibiotique n'avait été retrouvée chez *S. suis* [87]. Par contre, dès 1993, des souches résistantes à la pénicilline sont isolées [40, 88-90]. Ces résistances seraient associées à des modifications de la structure des protéines de la paroi bactérienne ciblées par la pénicilline (penicillin-binding proteins) [89]. Ces altérations diminueraient leur affinité pour l'antibiotique donc l'efficacité de ce dernier [89]. Des résistances à d'autres antibiotiques souvent utilisés sont aussi identifiées. Cantin et coll. [91] démontrent que des souches canadiennes sont résistantes à la clindamycine, à l'érythomycine et à la tétracycline. Les mêmes résultats sont obtenus avec des souches américaines [92] et norvégiennes [93]. Le groupe canadien a identifié des plasmides dans 60% des isolats testés mais

n'ont pu relier la présence de plasmides aux résistances [91]. D'un autre côté, Stuart et coll. [92] démontrent que *S. suis* peut transférer des résistances à la tétracycline et à l'érythromycine via un transposon similaire à Tn*916*, résultats corroborés par Wasteson et coll. [93]. Les antibiotiques suggérés comme les plus efficaces contre *S. suis* sont l'amoxicilline, l'ampicilline [88, 94], la gentamicine [90], le ceftiofur et l'enrofloxacine [88, 95]. Cependant, les antibiotiques ne peuvent éliminer les bactéries chez les sujets porteurs [55, 96].

La vaccination contre *S. suis* se fait surtout à l'aide de bactérines autogènes. Cependant, ce genre de vaccins donne souvent des résultats inconsistents [1]. Ceci peut être dû à plusieurs raisons dont le grand nombre de types capsulaires, la faible immunogénicité de ces capsules, la variation des facteurs de virulence proposés selon les régions, la dégradation des antigènes protecteurs lors de la préparation d'un vaccin tué et la production d'anticorps contre des antigènes non-reliés à la virulence. Tous ces aspects seront traités dans les sections suivantes. Il est à noter que la présence d'anticorps n'élimine pas les bactéries chez les animaux porteurs [56].

Une meilleure gestion de la production, du déplacement des animaux et du contrôle d'autres maladies porcines jouerait un rôle primordial dans le contrôle des infections à *S. suis* [9, 36, 88].

1.4. Facteurs de virulence proposés pour *Streptococcus suis* sérotype 2

Comme vu à la section 1.3.1, la pathogenèse de *S. suis* est peu connue. Plusieurs facteurs de virulence potentiels ont été proposés, en se basant sur des facteurs connus pour d'autres bactéries pathogènes ou suite à des études impliquant des souches virulentes ou non-virulentes. Cependant, aucun de ces facteurs n'a pu être directement impliqué dans la virulence jusqu'à ce jour.

1.4.1. Protéines

Plusieurs déterminants de virulence proposés sont de nature protéique et leur présence peut varier selon l'origine géographique des souches.

1.4.1.1. Hémagglutinines et adhésines

L'un des premiers facteurs décrits pour *S. suis* est impliqué dans l'hémagglutination. Cette dernière requiert la présence d'adhésines sur la bactérie. Il a été démontré pour plusieurs pathogènes que l'adhérence est souvent la première étape menant à une infection, et que cette adhérence est médiée par des interactions entre un récepteur saccharidique sur la cellule-hôte et une adhésine [97]. Kurl et coll. [98] sont les premiers à décrire des hémagglutinations spécifiques à certains sucres chez *S. suis*. Trois types de spécificité sont retrouvés avec des globules rouges de sang humain de groupe B. Certaines souches de différents sérotypes, dont quelques-unes de sérotype 2, possèdent des adhésines sensibles à la trypsine reconnaissant du galactose et/ou du *N*-acétylgalactosamine, ou de l'acide sialique. Cependant, ces réactions sont restreintes à peu de souches. L'année suivante, Gottschalk et coll. [99] confirment les hémagglutinations en plus de démontrer des réactions avec des globules rouges de différentes espèces. Ces réactions, indépendantes d'interactions hydrophobes, sont variables selon le sérotype et à l'intérieur d'un même sérotype. Par exemple, certaines souches de sérotype 2 réagissent avec des cellules de cheval alors que d'autres sont limitées aux cellules de sang humain de groupe B et O. Cependant, aucune corrélation n'a pu être établie entre l'hémagglutination, les tissus d'où les souches ont été isolées ou la virulence. Haataja et coll. ont caractérisé plus en détail l'une des adhésines, nommée adhésine P, d'une souche de sérotype 2 liant le galactose ou le *N*-acétylgalactosamine [100]. Ils ont démontré la reconnaissance d'un lien Galα1-4Gal chez des antigènes des groupes sanguins P^k et P_1. Cette liaison serait impliquée dans l'adhérence. Les souches mises en présence de céramide trihexosyl (GbO_3), glycolipide présent chez le groupe P et exprimé dans plusieurs tissus porcins, n'adhèrent plus à des coupes congelées de pharynx de porc. Le

GbO_3 contient une séquence qui est reconnue par l'adhésine et qui inhibe l'adhérence des souches aux tissus. Cette adhésine a été identifiée chez plusieurs sérotypes (surtout ceux impliqués dans les infections) et souches non-typables de *S. suis* [101]. Sa présence semble être variable, ce qui suggère une variation de phase dans l'expression de l'adhésine. Cette expression serait inversement proportionnelle à la quantité de capsule présente à la surface bactérienne. Les auteurs amènent l'hypothèse d'une forte expression d'adhésine en début d'infection pour permettre l'adhérence et la colonisation. L'expression serait plus tard diminuée pour permettre une plus grande production de capsule et une meilleure survie à l'intérieur de l'hôte [101]. Cependant, Gottschalk et coll. [102] démontrent que l'absence de capsule n'augmentait pas nécessairement l'adhérence des bactéries à des coupes de poumon porcin. Des anticorps produits contre l'adhésine purifiée ont montré une action bactéricide chez la souris et suggèrent l'utilisation de l'adhésine comme antigène d'un vaccin potentiel [101].

1.4.1.2. Fimbriae

En 1990, Jacques et coll. [103] indiquaient, par coloration négative en microscopie électronique, la présence de fimbriae répartis sur toute la surface de la bactérie. Ces structures péritriches, surtout visibles après croissance en bouillon, sont flexibles, peuvent mesurer jusqu'à 250 nm de long par 2 de large et sont présentes en densité variable (de dense à éparse). Leur fonction demeure cependant inconnue mais ils pourraient être impliqués dans l'adhérence, comme démontré avec ce même genre de structures chez d'autres streptocoques [104].

1.4.1.3. Protéines MRP et EF

En comparant des souches isolées de cas humains et porcins traitées avec du lysozyme, Arends et Zanen [105] remarquent que la majorité des souches provenant de méningite humaine ont des protéines membranaires de haut poids moléculaire, lesquelles sont absentes chez les souches porcines. Un test de virulence chez des porcelets axéniques démontre par la suite qu'une

souche possédant la MRP ("Muramidase-Released Protein"; MPR$^+$) est plus virulente qu'une souche ne possédant pas cette protéine [106]. Des études de profils protéiques plus poussées entre des souches virulentes et non-virulentes permettent l'identification d'une autre protéine, EF ("Extracellular Factor"), dont la présence semble intimement liée à celle de MRP chez les souches pathogènes [107].

La MRP est une protéine de 136 kDa qui se retrouve dans le surnageant de culture après traitement des bactéries à la muramidase. Cette réaction à l'enzyme glycosidique indique que la protéine est probablement liée à la paroi cellulaire [107]. Sa séquence montre par ailleurs qu'elle aurait un domaine en C-terminal qui lui permettrait de s'intégrer à la membrane [108]. La protéine EF présente un poids moléculaire de 110 kDa et se retrouve dans le surnageant de culture bactérienne sans traitement préalable requis comme pour la MRP [107]. Au départ, trois profils MRP/EF ont pu être établis soient MRP$^+$ EF$^+$, MRP$^+$ EF$^-$, MRP$^-$ EF$^-$. La majorité des souches isolées de porcs malades en Europe présentent un profil MRP$^+$ EF$^+$, alors que celles isolées de porcs sains sont de type MRP$^-$ EF$^-$. D'autre part, les souches humaines montrent un profil MRP$^+$ EF$^-$, alors que seulement 12% des souches porcines ont ce type de profil [107]. Les protéines MRP et EF sont alors impliquées comme étant des marqueurs de virulence chez *S. suis*. De nouveaux types de MRP et de EF sont subséquemment découverts chez de nouvelles souches. Un type de EF à plus haut poids moléculaire (EF*) est retrouvé, celui-ci étant présent surtout chez des souches humaines et des souches porcines non-virulentes [109]. Cette protéine a la particularité de posséder des répétitions d'acides aminés en position C-terminale, ce qui amène l'hypothèse qu'une recombinaison à ce niveau, en éliminant les répétitions, produirait des souches virulentes à profil EF$^+$ [109]. Galina et coll. [110] trouvent, de leur côté, une MRP présentant un plus haut poids moléculaire (MRP*) et qui se retrouverait chez les souches isolées de pneumonie, alors qu'un nouveau profil MRP$^-$ EF$^+$ se voit chez quelques souches américaines de méningite. Plus de 50% des souches virulentes américaines ont

un profil MRP^+ EF^+ [110]. Fait intéressant, malgré la proximité des États-Unis, les souches canadiennes possèdent des profils très différents. En 1995, Quessy et coll. [43] démontrent des différences entre certaines souches virulentes canadiennes et européennes, les premières ne possédant pas la MRP. Cependant, une protéine de poids moléculaire similaire à EF se retrouve chez les souches virulentes. Cette dernière est utilisée pour produire des anticorps et ceux-ci se montrent efficaces à protéger des souris contre des souches homologues et hétérologues [43]. Cependant, Gottschalk et coll. démontrent que la souche utilisée par ces chercheurs pour produire les anticorps ne produirait pas le facteur EF, ce qui laisse supposer que la protéine protectrice était d'une autre nature [51]. Au Canada, 72% des souches isolées de porcs malades ont un profil MRP^- EF^-, alors que seulement 1% possèdent les deux marqueurs de virulence des souches européennes [51]. De plus, une protéine MRP^s, de plus faible poids que la MRP originale, est retrouvée chez 8% des souches canadiennes de sérotype 2 alors qu'elle n'avait été retrouvée jusqu'ici que chez les sérotypes 1 et 4 [111].

Le rôle ambigü de MRP et de EF dans la virulence a été éclairci récemment à l'aide de mutants isogéniques. Il a été démontré que ces mutants sont toujours virulents chez le porc, suggérant que ces protéines ne sont pas reliées à la virulence ou que d'autres facteurs compensent leur absence [112].

1.4.1.4. Hémolysine (suilysine)

Les hémolysines ont été impliquées dans la virulence de plusieurs agents infectieux comme *Escherichia coli* [113], certains streptocoques [114], *Pasteurella haemolytica* et *A. pleuropneumoniae* [115]. *S. suis* est une bactérie α-hémolytique mais certaines souches produisent une hémolyse β sur gélose au sang de cheval [116]. Une hémolysine, nommée suilysine, a été identifiée chez ces souches [117-119]. De poids moléculaire variant de 54 kDa [117] à 65 kDa [118] selon les méthodes de purification, la suilysine cause la lyse d'érythrocytes de plusieurs espèces animales. C'est une protéine labile à la chaleur et sensible

au cholestérol et à l'oxydation [117, 118]. Cependant, son activité hémolytique est restaurée lorsqu'elle est mise en présence d'agents réducteurs [117, 118]. La suilysine présente des similarités à la streptolysine puisqu'un anticorps contre la streptolysine O inhibe son activité hémolytique [118]. Sa partie N-terminale serait, de plus, semblable à d'autres types d'hémolysine [117]. Son activité hémolytique est comparable à celle de la pneumolysine de *S. pneumoniae* [117]. Son mode d'action est de former des pores dans la membrane des érythrocytes, puisque des agents augmentant l'osmolarité du milieu protègent les globules rouges contre la lyse. De plus, un nombre minimal de molécules d'hémolysine serait requis pour une lyse efficace ("multi-hit"), puisqu'une quantité accrue d'érythrocytes diminue l'efficacité de la lyse [118]. Ces différentes caractéristiques en font un membre de la famille des toxines activées au thiol, aussi connue sous le nom de toxines cytolytiques liant le cholestérol [120]. Ces toxines sont reliées antigéniquement [120]. La production de suilysine *in vivo* n'est pas connue mais les porcs infectés avec une souche hémolytique ne présentent que peu ou pas d'anticorps anti-hémolysine [118].

La majorité des souches européennes de sérotype 2 et plusieurs souches européennes et américaines d'autres sérotypes produisent la suilysine [119, 121]. À cause de cette prévalence, Jacobs et coll. [122] émettent l'hypothèse que l'hémolysine est un facteur de virulence et que sa neutralisation pourrait induire la protection chez les porcs. Pour ce faire, ils développent un vaccin contenant la suilysine purifiée et démontrent que ce vaccin protège les souris et les porcs contre une infection à *S. suis* [117, 122], ce qui en fait un vaccin prometteur. Cependant, la majorité des souches virulentes canadiennes ne produisent pas l'hémolysine [51]. De plus, Odierno et coll. [123] ont récemment démontré que des mutants faiblement hémolytiques sont toujours virulents chez la souris.

1.4.1.5. Protéine liant les IgG

Une protéine interagissant avec les IgG de façon non-immune a été retrouvée chez *S. suis* [124]. Présente entre autres chez plusieurs streptocoques et staphylocoques, cette protéine interfèrerait avec l'opsonisation des bactéries en réagissant avec la partie Fc des anticorps au lieu des Fab [125, 126]. La protéine liant les IgG de *S. suis* a un poids moléculaire de 60 kDa, est retrouvée sur la paroi en plus d'être excrétée et est présente chez tous les sérotypes [124, 127]. Cette protéine interagit avec la partie Fc des IgG d'une grande variété d'espèces animales en plus de reconnaître les IgA humains [128]. Contrairement aux autres protéines liant les IgG, elle possède la caractéristique unique de lier des IgY de poulet [128]. Cependant, le site de liaison des IgY serait différent de celui des autres IgG [127]. De plus, la protéine réagissant avec des anticorps anti-protéine de stress, elle serait membre de la famille des protéines de stress de 60 kDa [127] (voir section 1.4.1.7). Le rôle de cette protéine dans la pathogenèse de *S. suis* n'a pas encore été étudié.

1.4.1.6. Protéine liant l'albumine

La liaison de protéines de l'hôte a été impliquée dans la virulence de plusieurs bactéries de Gram positif [129]. Lors de tests de croissance bactérienne *in vivo* dans des chambres intrapéritonéales chez le rat, Quessy et coll. [130] retrouvent une protéine de plasma de 67 kDa liée aux bactéries. Cette protéine a récemment été identifiée comme étant de l'albumine [131]. Grâce à cette propriété de liaison, ces mêmes auteurs ont mis en évidence chez *S. suis* une protéine de 39 kDa liant l'albumine [131]. Cette protéine est présente chez toutes les souches virulentes et non-virulentes de sérotype 2 testées. Elle possède une homologie avec l'enzyme glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase des streptocoques du groupe A, qui est aussi impliquée dans diverses liaisons avec des protéines de l'hôte (ex.: fibronectine) [132]. L'addition d'albumine au milieu de croissance augmente la virulence des souches chez la

souris. Cependant, son rôle dans la virulence est incertain puisque la protéine est aussi présente chez les souches non-virulentes [131].

1.4.1.7. Protéine de stress

Les protéines de stress ou "heat-shock proteins (hsp)" sont une famille de protéines essentielles requises pour diverses fonctions physiologiques autant eucaryotiques que procaryotiques [133]. Ces protéines sont exprimées constitutivement mais leur synthèse est augmentée suite à un stress. La présence de ces protéines chez certaines bactéries semblent être reliée à leur pathogénie [133]. Une protéine de 60 kDa se retrouve chez les sérotypes 1 à 8, 10 et 1/2 de *S. suis* [134]. Cette protéine voit sa production augmenter suite à une augmentation de la température de croissance. De plus, elle réagit avec plusieurs anticorps anti-hsp d'espèces non-reliées; elle ferait donc partie de la famille des hsp de 58-65 kDa. Elle possède une fraction soluble et une autre associée à la membrane cellulaire. Fait intéressant, cette protéine de stress lie les IgG [127]. La protéine liant les IgG et cette protéine de stress serait donc une seule et même protéine [127]. Cette protéine immunogène et commune à plusieurs sérotypes devient un candidat intéressant pour un vaccin sous-unitaire [134].

1.4.1.8. Facteur cytotoxique

En 1994, un groupe japonais démontre que le surnageant de culture d'une souche de *S. suis* de sérotype inconnu, isolée d'un cas de choc septique humain, possède une activité cytotoxique sur des cellules RSa/UV^r [135]. Une fraction du surnageant isolée par précipitation au sulfate d'ammonium suivi d'une purification sur colonne DEAE-Sephacel démontre toujours une cytotoxicité en plus d'une activité protéolytique sur la caséine. Cependant, cette fraction n'est pas hémolytique. Les auteurs suggèrent que ces activités toxique et protéolytique pourraient expliquer le développement du choc toxique du patient d'où la souche a été isolée. Cependant, le rôle de ce possible facteur de virulence dans la pathogenèse de la souche n'a jamais été étudié.

1.4.2. Polysaccharides capsulaires

Les polysaccharides capsulaires sont impliqués dans la virulence de plusieurs bactéries, autant de Gram positif que négatif [136]. D'abord identifiés comme polysaccharides de paroi (ex.: groupe R de Lancefield [4]), les polysaccharides retrouvés dans les différents sérotypes de *S. suis* ont ensuite été associés à la présence d'une capsule [7]. La capsule de *S.suis* sérotype 2 est composée de cinq sucres différents: galactose, glucose, acide sialique, *N*-acétylglucosamine et rhamnose [11, 137] en proportions respectives de 3.30: 2.04: 1.31: 1.16: 1.00 [137]. La distinction des polysaccharides capsulaires d'avec ceux liés à la paroi se fait premièrement au niveau de leur haut poids moléculaire. D'abord calculé à plus de 100 000 par Elliot et Tai [11], leur poids a récemment été établi plus précisément à 310 000 [137]. Deuxièmement, ces polysaccharides sont plus labiles à l'acide chaud que ceux de la paroi [11]. L'implication de la capsule dans la virulence de *S. suis* sérotype 2 jusqu'à ce jour sera discutée plus en détails à la section 3.

2. Les capsules bactériennes

Plusieurs espèces bactériennes produisent des polysaccharides extracellulaires. Nommées glycocalices, ces structures ont été définies par Costerton et coll. [138] comme des composantes contenant des polysaccharides, reposant au-delà des éléments intégraux de la membrane externe des bactéries de Gram négatif et du peptidoglycane des bactéries de Gram positif. Il est cependant à noter que certaines capsules se composent de glycoprotéines ou de protéines [139, 140]. Les glycocalices sont divisés en deux groupes:

-glycoprotéines excrétées en couche visqueuse bidimensionnelle (couche S, de l'anglais "surface layer");

-polysaccharides organisés en structures distinctes formant une matrice fibreuse émergeant de la surface cellulaire de façon plus ou moins verticale [141].

Les capsules bactériennes se retrouvent dans le second groupe. Composées de polymères fortement hydratés (plus de 95 % d'eau), souvent arrangés en

oligosaccharides polyanioniques répétitifs, les capsules présentent des structures complexes. De nombreux groupes hydroxyl permettent la formation de différents liens glycosidiques amenant des embranchements à même les différents sucres [142]. Ces divers arrangements apportent des propriétés physiques et chimiques uniques à chaque espèce, formant la base de la sérotypie capsulaire. Cette complexité est souvent visible au sein d'une même espèce: par exemple, *S. pneumoniae* possède 90 sérotypes capsulaires [143], *E. coli* en possède plus de 80 [144] et même *S. suis* en possède au moins 35 types différents [145]. Cependant, il est intéressant de constater que, malgré la diversité des types capsulaires, certaines bactéries d'intérêt médical mais d'espèces différentes produisent des polysaccharides capsulaires chimiquement identiques. De tels cas sont vus chez *Neisseria meningitidis* groupe B et *E. coli* K1 [146], chez *Haemophilus influenzae* type b et *E. coli* K18, K22 et K100 [147], et chez *S. suis* sérotype 8 et *S. pneumoniae* type 19 (voir Annexe) [148]. Les raisons probables de ces similitudes seront discutées plus loin.

La capsule se présente sous différentes formes, non exclusives:

1. rigide, permettant l'exclusion de particules telles l'encre de Chine;
2. flexible, ne permettant pas l'exclusion de certaines particules;
3. intégrale, étant intimement associée à la surface de la cellule;
4. périphérique, étant quelques fois associée à la cellule, d'autres fois excrétée.

De par leur localisation à l'extrême limite de la surface cellulaire, les capsules bactériennes possèdent plusieurs fonctions. Leur épaisseur ainsi que leur charge polyanionique limitent l'accès aux molécules et aux ions. Leur côté hydrophile aiderait à surmonter les répulsions électrostatiques entre la bactérie et une autre surface [149], permettant l'adhérence et la formation de biofilms [138]. Par ailleurs, Ophir et Gutnick [150] ont démontré l'importance des polysaccharides dans la prévention de la déshydratation des bactéries. Tous ces

aspects peuvent être impliqués dans la pathogénie de l'infection de certaines espèces bactériennes.

2.1. Rôles dans la pathogénie

Les organismes capsulés, incluant les bactéries et même certaines levures [151], sont responsables d'infections sérieuses autant chez l'homme que chez l'animal [136]. L'absence de capsule chez certains de ces mêmes organismes a démontré son rôle important dans la pathogénie (voir section 2.2.1). La capsule peut avoir un rôle direct ou indirect dans les étapes menant à une infection.

2.1.1. Adhérence

L'un des rôles indirects les plus marquants de la capsule est son implication dans l'adhérence de certaines bactéries aux cathéters utilisés dans les hôpitaux. La présence de la capsule permet la colonisation de ces surfaces causant ainsi de graves infections nosocomiales [152]. Plusieurs recherches sont présentement en cours afin de trouver des métaux et/ou plastiques empêchant l'adhérence ou des traitements bactéricides, à même les cathéters, efficaces contre les bactéries adhérentes [153, 154].

Un autre exemple d'adhérence impliquant les polysaccharides capsulaires est la colonisation de la cavité buccale. La capsule de certaines bactéries déjà adhérentes peut être utilisée pour l'adhérence d'autres genres bactériens via des interactions lectine-ligand. Les lectines sont des protéines ou glycoprotéines d'origine non-immune qui reconnaissent, agglutinent et/ou précipitent des sucres complexes [155]. Ce biofilm "multi-bactérien" peut éventuellement mener aux problèmes liés à la plaque dentaire [156, 157].

La plupart des pathogènes capsulés doivent éventuellement entrer en contact avec des cellules de l'hôte (épithéliales, endothéliales ou phagocytaires) et la colonisation de l'hôte par la bactérie dépend de son interaction avec ces

cellules. Cette interaction implique l'adhérence des bactéries, qui est éventuellement suivie par l'invasion ou l'endommagement des cellules. Le rôle de la capsule à ce niveau dépend du type de microorganismes. En général, une capsule réduit l'adhérence, et par conséquent l'invasion, de cellules. La présence des polysaccharides chargés confère une surface hydrophile à la bactérie, ce qui contribue à réduire l'adhérence et la phagocytose [158]. De tels cas ont été observés avec des bactéries entériques [159], les streptocoques du groupe B (SGB) [160-162], *Rhodococcus equi* [163], *H. influenzae* type b [164, 165], *N. meningitidis* [166] et *Cryptococcus neoformans* [167]. Contrairement à ce qui a été démontré par St. Geme et Falkow [164] et par Virji et coll. [165], LiPuma et coll. [168] montrent que la capsule de *H. influenzae* type b n'influence pas l'adhérence de la bactérie à des cellules épithéliales buccales. Les mêmes résultats sont observés chez *S. pneumoniae*, un mutant non-capsulé adhérant autant que la souche sauvage à des cellules endothéliales [169]. Chez *P. multocida*, la présence de capsule augmente l'adhérence aux macrophages sans promouvoir sa phagocytose [170] alors que chez *Klebsiella pneumoniae*, la capsule augmente l'adhérence à des cellules intestinales et entre bactéries [171].

2.1.2. Immunité non-spécifique

2.1.2.1. Résistance à la phagocytose

Lorsqu'une bactérie réussit à pénétrer à l'intérieur d'un hôte, ce dernier réagit contre l'envahisseur. L'organisme mobilise sa ligne de défense constitutive et non-spécifique composée des protéines de la phase aigüe (protéine liant le mannose, transferrine, etc.), du complément et des cellules phagocytaires [140]. La capsule sera le premier constituant bactérien à entrer en contact avec le système immunitaire.

La présence seule d'une capsule peut sauver une bactérie de la destruction, en s'interposant entre le système immunitaire non-spécifique et la cellule bactérienne (empêchement stérique). Lors d'une infection, un ajustement rapide de la composition des protéines sanguines en réponse à ce stimulus

étranger constitue la phase aigüe de la réponse immunitaire non-spécifique. Durant cette phase, la quantité de certaines protéines augmente alors que pour d'autres, elle diminue [172]. Si l'infection stimule la production d'interleukine-6 (via les macrophages), cette cytokine agira sur le foie qui produira une protéine liant le mannose (MBP, de l'anglais Mannose Binding Protein) [140]. MBP est une lectine de type C (dépendante du calcium), faisant partie des protéines dont la concentration sanguine augmente. MBP présente des affinités, comme son nom l'indique, pour le mannose mais aussi pour le *N*-acétylglucosamine [173]. En se liant à certains polysaccharides de surface des bactéries, la MBP active la voie classique du complément de par sa ressemblance au facteur C1q [174], mais peut aussi activer la voie alterne [175]. MBP fait partie de la famille des collectines impliquées dans la phagocytose et/ou l'opsonophagocytose [176]. Récemment, il a été démontré que la capsule de certains pathogènes causant la méningite pouvait réduire considérablement la liaison de la MBP à la bactérie, limitant ainsi la phagocytose [173].

La capsule d'une bactérie peut nuire à l'activation du complément. Pour que la voie alterne (VAC) soit activée, la composante C3b du complément (C3 formant le fragment C3b de façon spontanée mais en faible taux dans la circulation [140]) doit se lier de façon non-spécifique à la paroi cellulaire bactérienne (voir Fig. 1, page suivante). L'attachement du C3b permet la liaison du facteur B. Ce dernier est subséquemment clivé par le facteur D et stabilisé par la properdine pour former la C3 convertase (C3bBb), initiant du même coup la cascade du complément dont un des buts ultimes est la formation du complexe d'attaque membranaire menant à la lyse et à la mort bactériennes [140, 177]. D'autre part, chez les Gram positifs, l'opsonophagocytose joue un rôle plus important que la lyse, ceux-ci y étant résistants grâce à l'épaisseur de leur paroi [178]. La déposition accrue du C3b à leur surface permet cette opsonisation menant à la phagocytose.

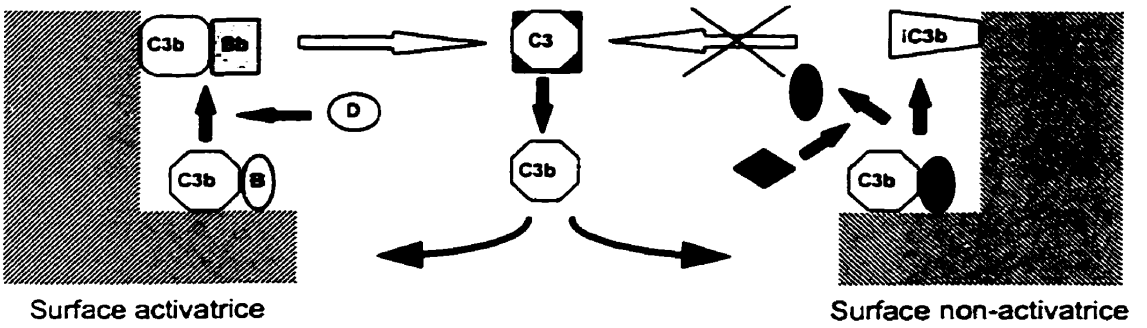


Fig. 1. Activation et inactivation de la voie alterne du complément. Pour que la voie alterne soit activée, la composante C3b du complément doit se lier de façon non-spécifique à la paroi cellulaire bactérienne. L'attachement du C3b permet la liaison du facteur B. Ce dernier est ensuite clivé par le facteur D pour former la C3 convertase (C3bBb), initiant du même coup la cascade du complément. Pour inactiver la voie alterne, le facteur H se lie au C3b et le facteur I (I pour inactivateur) peut dégrader le C3b, l'empêchant ainsi de former la C3 convertase avec le facteur B et bloquant l'opsonisation ou la formation du complexe d'attaque membranaire.

Cependant, une capsule peut bloquer la déposition non-spécifique du C3b donc empêcher l'activation du complément [179], comme chez *Campylobacter fetus* [180].

Si le facteur C3 du complément réussit à être clivé de façon significative et que la voie alterne du complément est activé, même une bactérie capsulée peut se voir opsonisée. À cette étape, un phagocyte (macrophage ou polymorphonucléaire) possédant des récepteurs pour le C3b pourrait facilement ingérer la bactérie (opsonophagocytose). Cependant, la présence de la capsule peut interférer entre la reconnaissance du C3b et son récepteur; malgré l'opsonisation, la bactérie ne sera pas phagocytée car les polysaccharides capsulaires bloquent l'accès des récepteurs au C3b [181]. Une telle situation a été démontrée pour les SGB [182], *S. pneumoniae* [178] et *Staphylococcus aureus* [183]. Chez ces bactéries, seule la présence d'anticorps anti-capsulaires favorise le dépôt de C3b sur la capsule et une phagocytose efficace.

Le rôle important de la capsule dans la résistance à la phagocytose par des monocytes et macrophages a été démontré avec des mutants non-capsulés.

Ces cellules phagocytaires du foie et de la rate sont généralement celles impliquées dans l'élimination des agents infectieux [184, 185]. Des mutants non-capsulés d'*H. influenzae* type b [186], de *N. meningitidis* [187], de *S. aureus* type 5 [188] et d'*Erysipelothrix rhusiopathiae* [189] sont beaucoup plus phagocytés que les souches sauvages. Cependant, alors que la capsule des SGB a souvent été présentée comme un facteur anti-phagocytaire [190, 191], Segura et coll. [192] ont récemment démontré qu'un mutant non-capsulé était autant phagocyté que la souche sauvage en absence d'opsonisation. La capsule protègerait plutôt les bactéries contre la destruction après opsonisation [182].

2.1.2.2. Phagocytose et survie intracellulaire

Comme vu à la section précédente, les capsules confèrent en général une capacité antiphagocytaire aux bactéries. Cependant, il semble que certaines bactéries pourraient tirer avantage de la phagocytose et que leur capsule jouerait un rôle important à ce niveau. Plusieurs bactéries possèdent la capacité à envahir certaines cellules-hôtes, dont les cellules phagocytaires. De tels cas ont été démontrés entre autres avec *Yersinia* [193], *Legionella pneumophila* [194], les mycobactéries [195], *C. jejuni* [196] et *Streptococcus bovis* [197]. Cet envahissement les protègerait contre le système immunitaire en plus de leur fournir des nutriments pour leur croissance [193]. D'autre part, lorsque ces bactéries utilisent les phagocytes comme niche de survie, elles doivent être capables d'éviter ou de bloquer la production de radicaux et enzymes toxiques chez ces cellules en inhibant la fusion lysosome-phagosome, en s'échappant des phagosomes [193], ou en évitant l'activation de la flambée respiratoire par une phagocytose via des récepteurs non-activateurs [198].

La capsule de certaines bactéries les protègerait contre les effets toxiques des macrophages. Williams et coll. [186] démontrent que la présence d'une capsule sur *H. influenzae* type b aide à la survie intracellulaire de la bactérie et lui permettrait même de se diviser; la même chose se produirait pour SGB [190], *S. aureus* type 5 [188] et *E. rhusiopathiae* [189]. D'un autre côté, Anderson et

Williams [199] démontrent que la capsule de *S. aureus* souche M ne contribuerait pas à la survie intracellulaire de la bactérie.

Valentin-Weigand et coll. [200] montrent que des macrophages contenant des SGB opsonisés possèdent plus de lysosomes que ceux contenant des SGB non-opsonisés. La survie des bactéries est plus grande en absence d'opsonisation, ce qui suggère que la voie d'entrée des bactéries dans le phagocyte influence la survie [201]. D'ailleurs, il a été démontré que lorsque *Mycobacterium tuberculosis* n'est pas opsonisé, il se lie aux récepteurs du C3b (CR3) à un site distinct du site de liaison de C3bi. La liaison se ferait par les polysaccharides capsulaires de la mycobactérie [202]. Cette voie d'entrée diminue l'exposition des bactéries aux radicaux d'oxygène toxiques, favorisant la survie [193].

2.1.3. Immunité spécifique

En général, les antigènes polysaccharidiques sont reconnus comme des antigènes indépendants des cellules T (T-indépendants) [172]. Ce sont des antigènes qui favorisent la production d'anticorps plutôt qu'une réponse cellulaire spécifique. Cependant, les anticorps produits sont souvent des IgM, anticorps à faible affinité, ou des IgG2. Les IgG2 dominent comme types d'anticorps produits contre les polysaccharides des streptocoques des groupes A et B et *S. pneumoniae*, alors que pour *H. influenzae*, les méningocoques et *K. pneumoniae*, les IgG1 et les IgG2 sont tous deux produits [203]. Il est à noter que tous les types d'IgG peuvent se lier à des phagocytes mais que seuls IgG3 et IgG1, par ordre d'importance, activent efficacement la voie classique du complément [172].

D'un autre côté, il a été démontré qu'il serait possible d'avoir une réponse T-dépendante avec des polysaccharides. D'abord Pier et Markham [204] avec *Pseudomonas aeruginosa*, et ensuite Onderdonk et coll. [205] avec *Bacteroides fragilis*, ont réussi à obtenir une réponse à médiation cellulaire contre ces

microorganismes. L'immunité n'était transférable qu'avec les cellules T et non pas avec les anticorps [206].

Malgré le fait que les polysaccharides soient reconnus comme des stimulateurs de la réponse humorale, il existe des variations dans la capacité de certaines sucres à induire la production d'anticorps. Un exemple frappant de cette variation est la réponse aux polysaccharides des méningocoques du groupe A [207] et l'absence de réponse à ceux du groupe B [208]. Cette absence de réponse est due au mimétisme d'antigènes de l'hôte par les antigènes du groupe B. Le mimétisme sera discuté plus en détails à la section 2.1.4.2. Malgré tout, quelques vaccins efficaces contre des polysaccharides capsulaires peu immunogènes ont été créés. Les polysaccharides sont couplés à une protéine "porteuse" afin d'augmenter l'immunogénicité des sucres (ex.: vaccin contre *H. influenzae* de type b [209]). Les anticorps ainsi produits sont protecteurs si la bactérie ne sécrète pas de toxines [115].

Même si l'hôte réussit à produire des anticorps anti-capsulaires, certaines bactéries ont réussi à contourner ce problème. Premièrement, elles peuvent relâcher une certaine quantité de capsule dans l'environnement. Les anticorps reconnaissent ces capsules libres et sont éventuellement saturés; ils ne peuvent plus agir sur les bactéries comme *K. pneumoniae* [210]. Deuxièmement, les microorganismes peuvent modifier leur capsule i. e. changer leur sérotype capsulaire. Chez *N. meningitidis*, Swartley et coll. [211] ont montré que des méningocoques du groupe B peuvent produire une capsule du groupe C en substituant le gène de la polysialyltransférase de type B par celui de type C. Un tel mécanisme de modification capsulaire a aussi été proposé pour *H. influenzae* type b [212] et *S. pneumoniae* [213].

Lorsque les anticorps sont dirigés contre des antigènes différents de la capsule, cette dernière a quand même un rôle à jouer. Par empêchement stérique, elle peut interférer entre la reconnaissance d'un anticorps et d'un

antigène somatique [214]. Or, ce blocage est dépendant de l'épaisseur et de la perméabilité de la capsule. Il a été démontré que la capsule d'*E. coli* K5 empêche la réaction antigène-anticorps avec des anti-lipopolysaccharides (LPS), alors que celle d'*E. coli* K1 permet la réaction [215]. D'autre part, si la production de capsule de *K. pneumoniae* est réduite, des antigènes tels les LPS deviennent accessibles aux anticorps protecteurs [210].

2.1.4. Composition de la capsule: acide sialique

Si l'espace physique occupé par une capsule est impliqué directement dans la capacité d'une bactérie à échapper aux défenses non-spécifiques de l'hôte, sa composition chimique peut, elle aussi, avoir un rôle à jouer. Les polysaccharides capsulaires confèrent une charge négative nette à la cellule bactérienne. Les cellules phagocytaires présentant elles aussi une charge négative à leur surface, le contact entre les deux entités résulte en une répulsion mutuelle. Des exemples de l'effet de la charge sur la phagocytose ont été démontrés chez certaines bactéries et levures [216-218]. La charge de la capsule dépend de sa composition. Souvent, cette charge est fournie par l'acide sialique. Il est frappant de constater que plusieurs bactéries pathogènes possèdent de l'acide sialique [219].

Le terme "acide sialique", cité pour la première fois en 1952 [220], représente un sucre aminé acide. Ce sucre de 9 atomes de carbone est formé du phosphoénolpyruvate (3 carbones) et du *N*-acétylmannosamine (6 carbones) [219]. Plus de 40 acides sialiques différents ont été décrits jusqu'à présent [221]. Cette famille de dérivés ont tous à la position C_1 un groupe carboxyl (COO^-) ionisé à pH physiologique, leur donnant une charge négative nette, ainsi qu'un groupe acyl (C_2H_3O) sur l'azote [222]. La diversité de ce sucre est apportée par les substitutions additionnelles

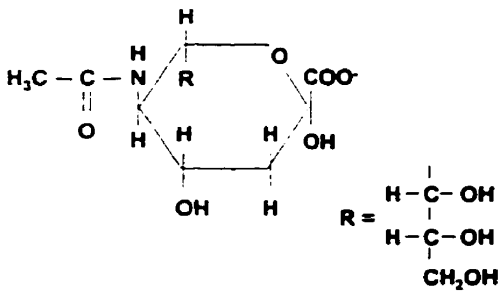


Fig. 2. Structure de base de l'acide sialique [222].

possibles aux autres carbones. Les acides sialiques les plus communs sont l'acide *N*-acétylneuraminique (NANA; Fig. 2) et l'acide *N*-glycolylneuraminique. À eux deux, ils forment les structures de base de la plupart des acides sialiques connus. Molécules rarement libres, elles sont habituellement rattachées à des chaînes saccharidiques par des liens α-glycosidiques en position terminale ou interne. L'arrangement spatial et les aspects chimiques de NANA en font un bon candidat au masquage de sites antigéniques ou comme marqueur de reconnaissance à la surface cellulaire [219].

Les acides sialiques sont répandus dans la plupart des espèces vivantes, allant du virus de la rage [223] en passant par les bactéries [224, 225] et les protozoaires [226, 227]. Cependant, c'est dans le règne animal qu'ils sont les plus prévalents alors qu'aucun n'a été retrouvé chez les mycètes, les algues, les plantes, les arthropodes ou les mollusques [219]. Chez les vertébrés, plusieurs types d'acides sialiques sont distribués selon les espèces et, à l'intérieur d'une même espèce, selon les tissus [228]. Les acides sialiques des mammifères sont les plus étudiés: on en retrouve dans la plupart des liquides corporels (lait, urine, sérum, mucus, bile) et sur plusieurs types cellulaires, dont les érythrocytes et certaines composantes du système immunitaire (plaquettes, leucocytes, cellules B). Aspect intéressant, le cerveau est un site riche en NANA au niveau des glycoprotéines, des gangliosides (glycolipides, retrouvés surtout dans les tissus nerveux, composés de sialyloligosaccharides et de céramides) et du liquide céphalorachidien [219].

Les acides sialiques ont plusieurs rôles biologiques lorsque liés aux cellules eucaryotes:

(1) La présence de NANA influence les liens cellule-cellule. Kanwar et Farquhar [229] ont démontré que NANA était important pour l'attachement de l'endothélium et l'épithélium à la membrane basale glomérulaire, alors que Kemp [230] implique la charge de NANA dans la formation de ponts calcium (Ca^{2+}) entre les cellules musculaires d'embryons de poulet.

(2) NANA est aussi impliqué dans le transfert d'information. Certains gangliosides du système nerveux sont situés à la base des nerfs d'où sont relâchés les ions Ca^{2+} qui mèneront ultimement à la transmission des influx nerveux [219].

(3) NANA détermine aussi la durée de vie de certaines cellules. Il a été démontré que lorsque les érythrocytes sont traités à la sialidase, un enzyme coupant NANA, leur demi-vie dans la circulation est drastiquement réduite, passant de 120 jours à quelques heures [231]. NANA serait le moyen de contrôler la circulation des érythrocytes. Les érythrocytes vieillissants, possédant moins de NANA, sont phagocytés par l'exposition de leurs résidus galactose reconnus par des récepteurs des cellules de Kupffer, alors que l'acide sialique protègerait les cellules immatures d'une reconnaissance et d'une dégradation prématurée [219].

2.1.4.1. Acide sialique d'origine bactérienne

NANA est un constituent de plusieurs bactéries extrêmement pathogènes. Ce sucre est retrouvé surtout chez des bactéries causant la méningite tels les méningocoques des groupe B et C [232], les streptocoques du groupe B [233] et *E. coli* K1 [146]. NANA est une composante des capsules de ces dernières. Il semblerait que la position de NANA, à l'intérieur des chaînes de polysaccharides répétitifs, est importante pour son implication dans la virulence. Certains sérotypes de méningocoques moins virulents possèdent aussi NANA dans leur capsule mais celui-ci n'est pas en position terminale comme chez la majorité des autres pathogènes [234].

L'acide sialique se retrouve aussi au niveau des lipopolysaccharides et lipooligosaccharides (LOS) de certains Gram négatifs d'importance médicale. Les LPS et les LOS sont des glycolipides toxiques présents dans la membrane externe [140]. Les LOS diffèrent des LPS par leurs propriétés antigéniques, leur partie polysaccharidique étant moins complexe que celles des LPS [235]. NANA a été retrouvé sur les LPS ou LOS de *H. influenzae* [236], *N. gonorrhoeae* et *N.*

meningitidis [237]. La caractéristique de ce NANA est qu'il peut être produit de façon endogène par la bactérie ou recruté de façon exogène [237]. *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis* varient leur phénotype en ajoutant NANA à leurs LOS de façon exogène [237]. Ceci s'effectue par le transfert covalent de NANA à partir de la molécule cytidine 5'-monophosphate-NANA (CMP-NANA; présente en grande quantité dans le sérum, les sécrétions ou l'intérieur des cellules de l'hôte) sur les résidus galactose des LOS. Ce transfert se fait grâce à l'enzyme 2,3-sialyltransférase, enzyme présent chez les *Neisseria* pathogènes mais absent chez les commensales [238]. Un mécanisme similaire de transfert de NANA de l'hôte jusqu'à la surface bactérienne a été démontré pour *H. influenzae* [236] et le parasite *Trypanosoma cruzi* [226]. En plus du transfert exogène, *N. meningitidis* peut ajouter NANA de façon endogène, puisque la bactérie synthétise du CMP-NANA pour la production de sa capsule [239].

2.1.4.2. Implication de l'acide sialique dans la pathogénie bactérienne

Tel que mentionné précédemment, NANA aurait un rôle protecteur contre la destruction de certaines cellules de l'hôte. La raison de cette protection est le "masquage" de sites antigéniques, moyen utilisé par plusieurs bactéries pathogènes pour éviter la destruction. Le masquage peut être direct i.e. NANA est situé directement **sur** un sucre antigénique, ou indirect i. e. NANA est situé **à coté** d'un antigène (sucre ou non) [219].

L'immunité non-spécifique est essentielle lorsque l'hôte n'a pas d'anticorps contre un envahisseur. La réponse doit être rapide mais aussi ciblée i.e. être capable de différencier les molécules étrangères des molécules du soi afin d'éviter les réactions autoimmunes. Pour ce faire, l'organisme a développé certaines stratégies lui permettant de faire la distinction. L'une d'elles est la présence d'acide sialique à la surface de certaines cellules. Fearon [177] a démontré que, lorsque l'acide sialique d'érythrocytes de mouton était enlevé ou modifié, les cellules, auparavant non-activatrices, deviennent activatrices de la voie alterne du complément. NANA a une fonction régulatrice sur VAC puisque

l'affinité du facteur B pour C3b est déterminée par la présence de NANA à la surface cellulaire. Afin d'éviter la destruction de ses propres cellules, l'organisme a établi un contrôle rigoureux de son immunité non-spécifique. Il existe deux protéines du complément impliquées dans l'inactivation de VAC: les facteurs H et I [140]. Lorsque le facteur H se lie au C3b, le facteur I (I pour Inactivateur) peut dégradé C3b, l'empêchant ainsi de former la C3 convertase avec le facteur B et bloquant l'opsonisation ou la formation du complexe d'attaque membranaire (voir Fig. 1, p. 26). Il a été démontré que l'activité du facteur H est hautement dépendante de la nature de la surface cellulaire: NANA augmente l'affinité de H pour C3b [177]. Un site de liaison de NANA a même été identifié, non pas sur C3b, mais sur le facteur H [240]. Ce site serait distinct du site de liaison du facteur B mais les deux seraient compétitifs pour l'attachement de C3b [241].

Les bactéries pathogènes utiliseraient donc cette affinité accrue du facteur H pour NANA afin de contourner la réponse immunitaire de l'hôte. La présence de NANA dans leur capsule ou sur leur LPS camoufle les antigènes susceptibles d'activer VAC. En plus de prévenir la liaison du C3b, NANA empêche la reconnaissance des résidus galactose, auxquels il est souvent rattaché, par des récepteurs de macrophages spécifiques au galactose [242]. L'importance de NANA dans la protection des bactéries contre VAC a été étudiée chez les SGB et les *Neisseria*.

Le rôle de NANA sur l'activation de VAC et la virulence a d'abord été démontré chez SGB par la croissance de ces dernières en présence de sialidase. Premièrement, Edwards et coll. [234] montrent que la présence de NANA empêche l'activation de C3 ou de B par SGB. Ensuite, la virulence des bactéries traitées est testée chez le rat. Cette expérience démontre que le simple fait d'enlever la partie NANA de la capsule de SGB (NANA étant le sucre terminal d'une chaîne polysaccharidique répétitive [243]) diminue la virulence de ces souches de façon significative [244]. Quelques années plus tard, Wessels et coll. [245] confirment ces résultats à l'aide de mutants isogéniques non-capsulés

ou asialo i. e. capsulés mais sans la partie NANA terminale. Ils établissent que, tout comme le mutant non-capsulé, le mutant sans NANA est cent fois moins virulent que la souche capsulée. Une mutation affectant seulement NANA devient équivalente à l'absence totale de capsule. Le mutant asialo est plus hydrophobe et plus phagocyté que la souche-mère [246].

Du côté des *Neisseria*, le rôle de NANA est plus difficile à établir dû à la présence de NANA dans la capsule et sur les LOS. Pour *N. meningitidis* groupe B, dont la capsule est un homopolymère de NANA lié en α(2-8), il a été établi à l'aide de mutants isogéniques que NANA est requis dans la capsule en même temps que sur les LOS pour une bonne résistance au sérum (i. e. résistance au complexe d'attaque membranaire du complément) [247] et pour un maintien de la virulence [248]. La présence de la capsule en absence de sialylation des LOS augmente la phagocytose et diminue la résistance au sérum, alors que l'absence de capsule en présence de LOS sialylés permet encore plus de phagocytose mais ne diminue pas autant la résistance au sérum. Cependant, il semble que NANA exogène sur les LOS soit plus efficace à réduire l'association de C3 (donc augmenter la résistance au sérum) que NANA endogène, probablement à cause des types de liens formés entre NANA et les LOS [249]. Pour *N. gonorrhoeae* qui ne possède que du NANA exogène, l'absence de ce dernier augmente considérablement l'opsonophagocytose de la bactérie [250].

La plupart des polysaccharides capsulaires peuvent induire une réponse immunitaire spécifique [214]. Par exemple, des anticorps anti-capsulaires protecteurs sont produits contre *S. pneumoniae* [251]. Cependant, certains polysaccharides sont faiblement immunogènes. Des exemples de cette faible immunogénicité incluent les méningocoques du groupe B (MGB), et *E. coli* K1 et K5. Tel que mentionné à la section sur les acides sialiques d'origine bactérienne, les MGB et *E. coli* K1 possèdent NANA dans leur capsule. En fait, ces deux pathogènes ont des capsules immunochimiquement identiques formées d'homopolymères de NANA liés en α(2-8) [146]. La similarité des

capsules de deux pathogènes d'espèces différentes démontre l'importance des rôles de NANA dans la virulence de ces bactéries. Un de ces rôles serait que la présence de NANA, chargé négativement, amènerait la formation d'une carapace de molécules d'eau. Ceci a pour effet de réduire l'antigénicité d'une molécule, celle-ci étant inversement proportionnelle à sa capacité à lier l'eau [219].

Cependant, le rôle de NANA le plus probable serait que les pathogènes utilisent le mimétisme pour contourner la réponse immunitaire de l'hôte. Tout comme pour l'immunité non-spécifique, il existe des mécanismes de protection contre l'autoimmunité afin d'éviter la production d'anticorps contre les molécules du soi. Les bactéries ont su tirer avantage de cette protection, puisque plusieurs sucres des glycoprotéines de l'hôte sont imités par des polysaccharides présents chez des pathogènes [243]. Le mimétisme n'est pas limité à la présence de NANA. Par exemple, l'uropathogène *E. coli* K5 produit des polysaccharides capsulaires similaires à la désulfohéparine [252] et les streptocoques du groupe A ont une capsule d'acide hyaluronique, sucre présent dans tous les fluides et tissus animaux [253, 254]. Le résultat de ces ressemblances structurales est une faible réponse immunitaire causée par l'immunotolérance de molécules similaires à celles de l'hôte [146, 255]. Il est intéressant de noter que, contrairement aux méningocoques du groupe B, une réponse immunitaire peut être montée contre ceux du groupe C, alors que la capsule de ces derniers ne diffère que par le type de liens entre les NANA, soit α(2-9) [256].

Malgré tout, plusieurs efforts de vaccins contre les polysaccharides capsulaires peu immunogènes ont été faits suite aux succès obtenus avec les capsules des méningocoques des groupes A et C. Cependant en 1983, Finne et coll. [257] remarquent que des glycoprotéines de cerveaux humains et de rats réagissent avec des anticorps produits chez le cheval contre les méningocoques du groupe B. De plus, les réactions anticorps-glycoprotéines sont bloquées par les capsules purifiés des méningocoques du groupe B et de *E. coli* K1 alors que

celle du groupe C n'interfèrent pas, établissant la spécificité de la réaction au type de lien impliquant NANA. Plus tard, Bitter-Suermann et Roth [258] démontrent qu'un anticorps monoclonal contre les méningocoques du groupe B reconnaît spécifiquement les longues chaînes poly-NANA présentes sur la forme embryonnaire de la molécule d'adhésion cellulaire nerveuse (N-CAM, de l'anglais Neural Cell Adhesion Molecule). Ces résultats indiquent qu'un danger de réactions autoimmunes existe si des anticorps contre ces polysaccharides capsulaires sont produits chez l'hôte. Cependant, il semble que le système immunitaire puisse réussir à contourner ce risque. Des individus convalescents, suite à une infection à méningocoques ou à *E. coli* K1, n'ont pas de hauts titres d'anticorps contre les capsules [259, 260].

D'autre part, si des anticorps anti-capsulaires sont produits, ces anticorps sont généralement dirigés contre des antigènes conformationnels, i. e. contre la structure secondaire ou tertiaire, évitant ainsi l'autoimmunité par la reconnaissance d'un épitope plus large [208, 243]. Cet épitope doit être d'une longueur minimale pour permettre la formation de la structure conformationnelle. Donc, la reconnaissance par les anticorps dépend de la longueur de la chaîne polysaccharidique [261]. Ces anticorps sont généralement protecteurs [243, 262].

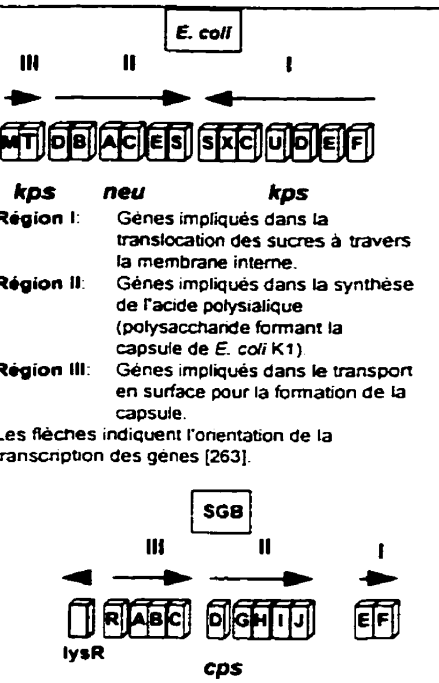
2.2. Les opérons capsulaires

Au niveau moléculaire, la synthèse des polysaccharides capsulaires est complexe. Plusieurs gènes sont impliqués dans la production de capsule, autant chez les bactéries de Gram positif que négatif [181]. La plupart de ces gènes se retrouvent à un même locus, souvent sous forme d'opéron. Cet arrangement permet une régulation coordonnée des gènes impliqués dans la synthèse et l'exportation des sucres [181, 263]. Plusieurs bactéries ont des opérons organisés de façon similaire. L'opéron est divisé en "régions" selon la fonction de chaque gène. L'analyse de ces régions a surtout été effectuée chez les Gram négatifs [264], bien que quelques études ont été faites chez les Gram positifs

[265, 266]. Trois régions sont souvent présentes, leur fonction variant entre les bactéries de Gram positif ou négatif. Chez les Gram négatifs, les régions se divisent arbitrairement comme suit:

1. Synthèse et polymérisation des polysaccharides
1. Translocation des polysaccharides à travers la membrane interne
2. Transport des polysaccharides matures à l'extérieur de la cellule pour la formation de la capsule [181].

L'organisation de ces régions est conservée entre les sérotypes d'une même espèce; les régions de transport (2 et 3) flanquent la région de synthèse (1) [267]. Cette dernière est unique à chaque type capsulaire et sa longueur varie en fonction de la complexité de la capsule [181]. Les régions de transport codent pour des fonctions similaires d'un sérotype à l'autre [267]. Des organisations semblables se retrouvent chez *E. coli* K1 [268], *N. meningitidis* [269] et *H. influenzae* type b [270].



Région I: Gènes impliqués dans la translocation des sucres à travers la membrane interne.
Région II: Gènes impliqués dans la synthèse de l'acide polysialique (polysaccharide formant la capsule de *E. coli* K1).
Région III: Gènes impliqués dans le transport en surface pour la formation de la capsule.
Les flèches indiquent l'orientation de la transcription des gènes [263].

Région I: Gènes impliqués dans la production et le recrutement des monosaccharides.
Région II: Gènes impliqués dans l'assemblage des oligosaccharides.
Région III: Gènes impliqués dans l'exportation des sucres à la surface bactérienne.
Les flèches indiquent l'orientation de la transcription des gènes.
Le gène représenté par la boîte grise lysR présente une homologie avec des régulateurs de la famille LysR [284].

Fig. 3. Organisation génétique des opérons capsulaires d'*Escherichia coli* K1 et des streptocoques du groupe B.

Du côté des Gram positifs, le même genre d'organisation est retrouvé mais avec des fonctions différentes. Cette organisation a pu être identifiée chez *S. pneumoniae* type 19F [271] et chez SGB [265]. Il a été démontré que, comme pour les Gram négatifs, certains gènes se retrouvent dans la plupart des sérotypes alors que d'autres semblent spécifiques au type capsulaire [266, 272]. Les streptocoques du groupe B ont été les plus étudiés au niveau moléculaire et fonctionnel. Les trois régions de l'opéron capsulaire des SGB se présente comme suit:

1. Production et recrutement des monosaccharides

2. Assemblage des oligosaccharides
3. Exportation des sucres à la surface bactérienne [265].

Fait intéressant, Haft et coll. [273] démontrent que le gène impliqué dans la formation de CMP-NANA chez SGB peut remplacer le gène impliqué dans la même fonction (*neuA*) chez *E. coli* K1. La capacité de remplacer des gènes entre espèces hétérologues appuie la similarité observée chez des gènes capsulaires entre Gram négatifs et positifs [273] (Fig. 3).

2.2.1. Mutations et virulence

Les gènes impliqués dans la synthèse de la capsule de diverses bactéries ont pu être identifiés suite à des mutations. Ces dernières ont permis d'établir que la capsule, ou une de ses composantes, est souvent requise pour la virulence.

Il a été démontré précédemment que l'absence de NANA seul, alors que la bactérie possède encore d'autres polysaccharides, peut affecter la virulence. Le simple fait d'introduire une mutation au niveau du gène impliqué dans la synthèse de NANA, soit *cpsF*, diminue la virulence de SGB [245, 273]. Lorsque la capsule est entièrement absente, la virulence est affectée autant chez les bactéries de Gram positif (les streptocoques des groupes A [274] et B [275], *S. aureus* [276]) que celles de Gram négatif (*E. coli* K1 [277] et *H. influenzae* type b [278]). La dose létale 50 des mutants est souvent de cent à mille fois plus élevée que celle des souches sauvages [190, 279].

2.2.2. Contrôle d'expression de la capsule

Plusieurs paramètres peuvent affecter la production et la régulation de facteurs de virulence. Ceux-ci incluent entre autres la température, la phase de croissance, les sources de carbone, le niveau d'oxygène, le pH, l'osmolarité du milieu et la disponibilité du fer [193]. Plusieurs pathogènes possèdent des senseurs pour ces variables.

Chez *E. coli* K1, la production de capsule semble régulée par la température. Malgré le fait que les sucres soient synthétisés à l'intérieur de la bactérie à basse température, la capsule n'est exprimée que lorsque la température atteint le degré permissif de 37°C [263]. Chez SGB, il a été démontré que des isolats provenant d'enfants atteints de méningite avaient une capsule plus épaisse que ceux provenant du col de la mère asymptômatique [280]. L'expression de la capsule est régulée par la vitesse de croissance. Lorsque SGB croît lentement, la capsule est plus mince que lorsque SGB croît rapidement [280]. Les auteurs suggèrent que cette régulation d'épaisseur permettrait aux bactéries avec une capsule plus mince d'adhérer et de coloniser, et que le changement pour une production accrue de capsule protègerait les bactéries invasives contre le système immunitaire de l'hôte [280]. Cette même hypothèse a été apportée suite aux expériences menées par St. Geme et Falkow sur *H. influenzae* type b [164]. Ils ont démontré que la bactérie se retrouvait non-capsulée à haute fréquence dû à l'arrangement de son opéron capsulaire. Comme décrit plus haut, l'opéron de *H. influenzae* est divisé en régions fonctionnellement distinctes, la région spécifique au type capsulaire étant flanquée de régions communes à tous les sérotypes [270]. Fait à noter, l'opéron capsulaire de type b est dupliqué dans le génome, les duplicatats n'étant séparés que par une copie unique du gène *bexA* (ce gène est impliqué dans l'exportation des polysaccharides) [281]. De plus, de chaque côté des duplicatats d'opérons, des séquences répétées sont présentes [282]. Si une recombinaison se produit au niveau des séquences répétées, une seule copie de l'opéron capsulaire est alors retrouvée et le gène *bexA* est perdu, empêchant l'exportation des sucres en surface et la formation de la capsule [281]. L'absence de capsule favoriserait l'adhérence et l'invasion des cellules épithéliales [164]. D'un autre côté, certaines souches les plus virulentes de *H. influenzae* type b possèdent plus de deux répétitions de l'opéron capsulaire, ce qui leur permet de surexprimer la capsule et d'augmenter leur survie dans l'hôte [282]. Il a été démontré que les bactéries en phase stationnaire sont moins capsulées et plus adhérentes que celles mieux capsulées [283]. Cet effet est réduit lorsque du magnésium est

ajouté au milieu, permettant une meilleure production de capsule par la bactérie et suggérant que la production de capsule peut être modulée par la phase de croissance et les signaux environnementaux [283]. L'hypothèse de diminution de capsule a aussi été suggérée pour expliquer l'adhérence et l'invasion accrues de *N. meningitidis* non-capsulée à des cellules humaines [166]. La bactérie devient non-capsulée suite à l'inactivation réversible du gène de synthèse de NANA (*siaA*), causée par l'excision d'une séquence d'insertion (IS1301) se retrouvant naturellement dans le génome de la bactérie [166]. Cependant, pour *N. meningitidis*, les signaux requis pour cette modulation d'expression capsulaire ne sont pas connus.

Pour les SGB, un cadre de lecture ouvert, présentant des homologies avec des gènes de la famille LysR [284], a récemment été mis en évidence en amont de l'opéron capsulaire (Fig. 3). Ces gènes codent pour des régulateurs transcriptionnels possédant un domaine liant l'ADN [193]. Ils provoquent leur autorégulation en plus de réguler la transcription d'autres gènes [285]. Bien que le rôle de ce gène n'ait pas encore été démontré chez SGB, ce genre de gène est connu pour réguler la production des exopolysaccharides de *Rhizobium meliloti* [286] et du phytopathogène *Pseudomonas solanacearum* [287].

Les streptocoques du groupe A ont leur production de capsule controlée selon la phase de croissance, la capsule étant présente jusqu'au début de la phase stationnaire [288]. Il a été établi que le contrôle d'expression de l'opéron *has* ("hyaluronic acid synthesis"; la capsule de ces streptocoques est formée de ce sucre) s'effectue au niveau transcriptionnel. Les souches capsulées synthétisent un ARN messager (mRNA) de cet opéron *has* alors que les souches non-capsulées, tout en possédant toujours l'opéron, ne synthétisent pas de mRNA. Cependant, aucun régulateur près de l'opéron n'a pu être mis en évidence jusqu'à maintenant [288]. D'autre part, des produits de gènes (*cpsM* et *plpA*) de l'opéron capsulaire de *S. pneumoniae* type 3 répondraient aux signaux environnementaux en augmentant l'expression de la capsule [181].

3. La capsule de *Streptococcus suis* sérotype 2

Selon la définition donné à la section 2, la capsule de *S. suis* serait une capsule rigide intégrale puisqu'elle exclut l'encre de Chine et se présente associée à la surface bactérienne [15, 103]. La capsule des souches de sérotype 2 a une épaisseur variant de 70 à 100 nm lorsqu'elle est observée en microscopie électronique suite à une immunostabilisation [103]. L'épaisseur de la capsule ne semble pas reliée à la virulence des souches, observation déjà faite par Clifton-Hadley et coll. [9], puisque c'est le sérotype 5 et non le sérotype 2 qui présente la capsule la plus épaisse (350-375 nm) [103]. D'un autre côté, l'épaisseur pourrait avoir un rôle à jouer si *S. suis* est capable de moduler l'expression de sa capsule comme chez d'autres bactéries selon les conditions environnementales, celles employées pour la microscopie électronique pouvant ne pas favoriser cette expression capsulaire. Des isolats de cas cliniques présentent une capsule plus épaisse que des isolats d'animaux sains [102]. Fait intéressant, des souches de sérotype 2 non-virulentes lors d'infections expérimentales chez la souris et le porc sont aussi capsulées [130, 289]. Il a été démontré que l'épaisseur de la capsule varie *in vitro* selon le milieu de croissance utilisé (la capsule étant plus épaisse après croissance en milieu liquide que solide) et le temps d'incubation (plus de capsule étant présente après 6 h de croissance que 18 h) [290]. Par ailleurs, après croissance *in vivo* dans des chambres intrapéritonéales chez le rat, la capsule d'une souche virulente est plus épaisse que celle d'une souche non-virulente, suggérant que la virulence dépend de la capacité de la souche à accroître sa production de capsule *in vivo* [130]. Par contre, la capacité invasive accrue des souches de sérotype 2 a été suggérée comme étant liée à la composition plutôt qu'à l'épaisseur de la capsule. Comme mentionné à la section 1.4.2, la capsule de *S. suis* sérotype 2 possède de l'acide sialique [11, 137]. L'acide sialique a été présenté comme facteur important dans la virulence de plusieurs pathogènes (Section 2.1.4.2). Le même rôle a été suggéré pour l'acide sialique dans la capsule de *S. suis* sérotype 2 [68].

3.1. Capsule de *Streptococcus suis* sérotype 2 et adhérence

En 1992, Gottschalk et coll. [291] produisent un mutant non-capsulé par passages successifs dans un milieu contenant des anticorps anti-capsule. Il manque cependant à ce mutant spontané non-capsulé une protéine de 44 kDa présente chez la souche sauvage (Section 1.4.1.9). L'absence de capsule chez le mutant augmente son hydrophobicité comparé à la souche sauvage [292]. Cette caractéristique n'influence pas l'adhérence du mutant et de la souche sauvage à des coupes congelés de poumons de porc [102]. Par contre, Salasia et coll. [292] montrent qu'elle affecterait l'adhérence à des cellules épithéliales buccales humaines et à des macrophages de poumons de lapin; le mutant présente plus d'adhérence que la souche sauvage. Gottschalk et coll. concluent qu'il n'y a pas de lien entre l'adhérence et l'hydrophobicité de la souche [102] alors que Salasia et coll. soutiennent que la capsule masque les structures de surface hydrophobes contribuant à l'adhérence [292].

3.2. Capsule de *Streptococcus suis* sérotype 2 et immunité non-spécifique

Tel que mentionné à la section 2.1.2, la liaison de MBP sur une bactérie serait impliquée dans l'activation du complément de part son effet opsonisant. *S. suis* possède une capacité de liaison de MBP "intermédiaire" (58.4 %), similaire à celle de *E. coli* K1 et *S. pneumoniae*, comparé à une faible capacité de liaison de 21.7% par les SGB. La liaison de MBP serait influencée par la présence de la capsule [173].

L'interaction entre *S. suis* et les cellules phagocytaires a surtout été étudiée avec les monocytes et les macrophages. Quelques études faites avec des polymorphonucléaires (PMN) ont démontré que les souches non-virulentes capsulées sont phagocytées en absence d'anticorps ou de complément, alors que les souches virulentes requièrent la présence d'anticorps et de complément pour être phagocytées [293, 294]. Par contre, Quessy et coll. [130] démontrent que des souches virulentes et non-virulentes sont tuées par les PMN en absence d'anticorps ou de complément après croissance *in vitro*, mais que les souches

virulentes résistent à l'élimination par les PMN après croissance *in vivo*. Cette résistance serait reliée à une augmentation de l'épaisseur de la capsule des souches virulentes [130].

Lorsque l'évolution d'une infection à bactéries causant la méningite est étudiée, les animaux infectées présentent souvent une forte bactériémie [295, 296]. Afin d'éviter cette bactériémie, les monocytes en circulation et les macrophages des organes filtrant le sang ont un rôle primordial à jouer dans l'élimination des bactéries. L'interaction *S. suis*-macrophages est donc importante, surtout qu'une multiplication bactérienne a été observée dans des macrophages de porcs infectés, suggérant une capacité de survie intracellulaire [79]. Williams remarque que des macrophages péritonéaux de souris phagocytent de façon similaire (8.67 % phagocytose) des souches de *S. suis* type 2 capsulées virulentes et non-virulentes et ce, en absence d'anticorps et de complément [297]. Cependant, comme le temps des bactéries en présence des macrophages s'allonge, les souches virulentes augmentent leur nombre de bactéries intracellulaires alors que les souches non-virulentes présentent toujours le même nombre, suggérant une meilleure survie pour les souches virulentes [297]. Les macrophages infectés avec les souches virulentes dégénèrent au fur et à mesure que le temps d'incubation augmente, laissant supposer que la division des bactéries pourrait éventuellement mener à la lyse des macrophages. L'ajout d'anticorps et de complément après la phagocytose des souches réduit la survie intracellulaire des souches virulentes au même niveau que celle des non-virulentes.

Toujours avec des macrophages péritonéaux de souris, Brazeau et coll. [298] retrouvent des pourcentages de phagocytose similaires à Williams avec des bactéries capsulées virulentes et non-virulentes. De son côté, Galina [299] obtient les mêmes pourcentages de phagocytose, cette fois avec des macrophages alvéolaires de porc. Brazeau et coll. remarquent que la présence de sérum, avec ou sans complément, augmente la phagocytose de toutes les

souches étudiées, suggérant qu'un facteur du sérum différent du complément affecte la phagocytose [298]. Galina obtient aussi une augmentation de phagocytose en présence de sérum hyperimmun mais avec un maximum de 27 % de phagocytose seulement [299]. Les deux groupes de recherche observent que les souches virulentes survivent mieux que les non-virulentes à l'intérieur des phagocytes. L'ajout de sérum diminue la survie [298, 299]. Cependant, la survie des souches virulentes ne serait pas due à une plus grande synthèse de l'enzyme superoxyde dismutase, impliqué dans la destruction des radicaux d'oxygène toxiques, comparée aux souches non-pathogènes [300]. D'autre part, Brazeau et coll. étudient l'effet de la capsule sur la phagocytose et la survie intracellulaire à l'aide de mutants non-capsulés spontanés [298]. Ils démontrent que la souche non-capsulée est beaucoup plus phagocytée que la souche sauvage et que sa survie intracellulaire est encore moins bonne que celles des souches non-virulentes capsulées [298]. Des résultats similaires sont obtenus avec ces mêmes mutants par d'autres chercheurs [292] ainsi qu'avec une souche de séroype 1 [301]. Ces résultats suggèrent que la capsule confère une capacité anti-phagocytaire à *S. suis* mais comme les mutants étudiés étaient des mutants spontanés, la possibilité que des facteurs autres que la capsule soient aussi impliqués ne peut être écartée [298]. Entre autres, Mogollon et coll. [302] ont recherché la présence de protéines semblables à la protéine M des streptocoques du groupe A chez *S. suis*. Cette protéine est impliquée dans la résistance à la phagocytose de ce groupe de streptocoques [303]. Aucun gène présentant des homologies avec cette protéine n'a pu être détecté chez *S. suis*.

3.3. Capsule de *S. suis* sérotype 2 et immunité spécifique

Des anticorps anti-capsule sont généralement protecteurs (Section 2.1.3). Concernant *S. suis*, Elliott et coll. [304] ont pu générer des anticorps anti-capsule de sérotype 2. Malgré le faible titre (< 1/6), ces anticorps étaient opsonisants dans un test bactéricide mais leur rôle dans la protection n'a pas été étudié. D'un autre côté, Holt et coll. [305] suggèrent que des anticorps autres qu'anti-capsule sont requis pour la protection. Des porcs, immunisés avec des bactéries

tuées à la chaleur mais étant toujours capsulées, n'étaient pas protégés contre une dose-défi, alors que des bactéries capsulées tuées au formol induisaient une protection [305]. Par contre, la vaccination contre *S. suis*, utilisant majoritairement des vaccins autogènes, est peu efficace [1]. Holt et coll. [306] proposent la production d'anticorps contre des antigènes non-associés à la virulence, et Quessy et coll. [130] suggèrent que la capsule pourrait masquer des épitopes protecteurs, ce qui expliquerait le faible taux de réussite de la vaccination. Cependant, ces derniers ont utilisé comme vaccin une souche non-virulente capsulée vivante qui, selon leur hypothèse déjà suggérée à la section 3, n'augmenterait pas sa production de capsule *in vivo* étant une souche non-virulente. Fait intéressant, les anticorps produits contre cette souche protègent contre une souche virulente qui elle, toujours selon leur hypothèse, augmenterait l'épaisseur de sa capsule *in vivo* [130, 307]. Ces derniers résultats indiquent que la capsule ne masquerait pas nécessairement les épitopes protecteurs.

En utilisant des mutants de sérotype 1/2 sensibles à la chaleur, Kebede et coll. [308] démontrent que des anticorps produits contre ces mutants protègent des souris contre une infection au sérotype 2. Comme les sérotypes 2 et 1/2 présentent des réactions croisées au niveau de la capsule, ces anticorps anti-capsule seraient protecteurs. D'un autre côté, Gottschalk et coll. [291] montrent que des anticorps produits contre un mutant, partiellement capsulé mais possédant la même concentration d'acide sialique que la souche sauvage, sont partiellement protecteurs. D'ailleurs, une réponse humorale serait requise pour une protection contre *S. suis* puisque Holt et coll. [306] démontrent que des anticorps, provenant de porcs immunisés, confèrent une protection passive à des porcs non-immunisés. Le titre d'anticorps du sérum utilisé pour la protection passive serait important. Blouin et coll. [53] démontrent que des anticorps provenant de porcs immunisés avec un vaccin commercial, contenant des bactéries mortes, ne sont pas protecteurs pour des souris infectées avec une souche virulente, alors que ceux provenant de porcs hyperimmunisés les protègent. Par contre, une réponse cellulaire pourrait aussi être nécessaire car

des injections d'interleukine-1β et d'interleukine-2, en plus de la bactérie, confèrent une protection accrue [309]. Cette protection est reliée à une augmentation du nombre de leucocytes et de cellules CD8+, en plus d'une augmentation de la production d'anticorps [309]. L'injection de bactéries vivantes stimulerait aussi l'immunité cellulaire en agissant comme antigènes endogènes, par leur survie à l'intérieur des phagocytes, pour les cellules cytotoxiques [307].

Finalement, à l'aide d'un ELISA utilisant la capsule purifiée de sérotype 2 comme antigène, del Campo Sepúlveda et coll. [52] remarquent que des porcs protégés contre une infection au sérotype 2 possèdent très peu d'anticorps anti-capsule. De plus, des porcs exempts d'organisme pathogène spécifique (SPF) et des porcs infectés au sérotype 2 présentent des titres d'anticorps anti-capsule similaires [52].

III- MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article I

Agglutination of *Streptococcus suis* by sialic acid-binding lectins

N. Charland[1], J. T. C. Kellens[2], F. Caya[1] et M. Gottschalk[1]

[1] Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

[2] Department of Medical Microbiology, University of Limburg, Maastricht, The Netherlands

Journal of Clinical Microbiology (1995) **33:** 2220-2221

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Aug. 1995, p. 2220–2221
0095-1137/95/$04.00+0
Copyright © 1995, American Society for Microbiology
Vol. 33, No. 8

Agglutination of *Streptococcus suis* by Sialic Acid-Binding Lectins

NATHALIE CHARLAND,[1] JAN T. C. KELLENS,[2] FRANÇOIS CAYA,[1] AND MARCELO GOTTSCHALK[1]*

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St.-Hyacinthe, Canada,[1] and Department of Medical Microbiology, University of Limburg, Maastricht, The Netherlands[2]

Received 21 February 1995/Returned for modification 7 April 1995/Accepted 8 May 1995

The 35 *Streptococcus suis* capsular-type reference strains as well as 45 field strains of type 2 were tested with sialic acid-binding lectins from *Sambucus nigra* (SNA I), *Triticum vulgaris*, *Maackia amurensis*, *Homarus americanus*, and *Limax flavus*. Only types 1, 1/2, 2, 14, 15, and 16 agglutinated with SNA I and/or the *T. vulgaris* lectin. All field strains agglutinated only with SNA I. Reaction with SNA I was probably due to the sialic acid moiety since it disappeared after sialidase treatment. These results confirm the presence of sialic acid in *S. suis* with the possible terminal sequence *N*-acetylneuraminic acid–α(2,6)GalNAc.

Streptococcus suis is a major problem in pig production and is associated with many types of infections in pigs such as meningitis and arthritis as well as with human cases of meningitis and endocarditis (1, 10). To date, 35 capsular types of *S. suis* have been described, with capsular type 2 being most frequently isolated from diseased animals (10). It is known that types 1, 1/2, and 2 possess capsules which are rich in *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) (sialic acid) (4). The type of linkage of sialic acid in glycoconjugates and whether sialic acid compounds are present in other capsular types of *S. suis* are not known. Sialic acid has been proposed as an inhibitor of the alternative complement pathway activation and, as a result, could protect a sialylated microorganism from phagocytosis (3).

Biochemical tests specific for the measurement of sialic acid require several chemicals and are time-consuming, relatively insensitive, and of low specificity (20). Lectins may be an easy and rapid alternative for identifying the presence of this sugar. In fact, lectins have already been described as useful tools in clinical microbiology by Slifkin and Doyle (19). Lectins are proteins or glycoproteins of nonimmune origin that agglutinate cells and/or precipitate complex carbohydrates (5). Some lectins have been found to bind sialic acids (6, 11, 18).

The aim of this work was to study the agglutination patterns of all 35 *S. suis* capsular-type reference strains as well as 45 field strains of type 2 with different sialic acid-binding lectins.

All *S. suis* strains were kindly provided by Robert Higgins (Université de Montréal). In addition, an unencapsulated capsular type 2 strain (M2) and its parent strain 89-1591 were also tested (7). Cells were grown overnight on bovine blood agar plates at 37°C, and single colonies were used as inocula for Todd-Hewitt broths (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) for agglutination tests.

The sialic acid-binding lectins used and their carbohydrate specificities are listed in Table 1. Lectins SNA I (*Sambucus nigra*) and WGA (*Triticum vulgaris*) and the *Maackia amurensis* lectin were extracted, isolated by affinity chromatography, and purified as described previously (12), whereas the *Limax flavus* and *Homarus americanus* lectins were purchased from Inter-Medico (Markham, Canada). Solutions of 1 mg/ml (wt/vol) were prepared in phosphate-buffered saline (PBS) (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4, 10 mM Na_2HPO_4, [pH 7.4]) (12). The *L. flavus* and *H. americanus* lectins were prepared in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)–100 mM NaCl (15) and 50 mM Tris-HCl (pH 7.7)–150 mM NaCl–10 mM $CaCl_2$ (9), respectively. All lectins were stored at −20°C until use and at 4°C once thawed.

The agglutination tests were performed as previously described with some modifications (12). Briefly, cells were grown in three sets of 20 ml of Todd-Hewitt broth for 6 h at 37°C. Cells were collected by centrifugation at 1,300 × *g* for 10 min, washed, and resuspended in PBS. The absorbances of the suspensions were measured at 620 nm in a spectrophotometer, and the suspensions were concentrated to an A_{620} eq of 5. One set of cells was left untreated, whereas different pretreatments were done to the other sets to increase discrimination between isolates after lectin agglutination (13). To partially hydrolyze proteoglycans and make more carbohydrate residues available for lectin binding (12), cells were incubated with 0.1 mg of trypsin per ml (wt/vol) for 1 h at 37°C, washed in PBS, and resuspended in the appropriate buffers required by the different lectins. To degrade surface structures and dissolve more glycoconjugates from the cell wall (12), the suspensions were centrifuged, resuspended in 1 ml of 0.25 M glycine-HCl (pH 2), and placed in a boiling bath for 15 min. Agglutination assays were performed in glass tubes (12 by 75 mm) containing 10 μl of lectin and 90 μl of a cell suspension. A negative control was included for each strain by adding 10 μl of buffer instead of lectin solution. Tubes were left at room temperature for 1 h, and agglutination was assessed visually.

Untreated cells presented autoagglutination or extremely fine aggregates which prevented visualization of lectin-mediated agglutination. Trypsin treatment resulted in aggregates too fine to be visualized. On the other hand, glycine treatment gave clearly different patterns, i.e., fine versus coarse aggregates. The classification presented in this study is based on such glycine treatment. Of the 35 capsular types, five strains reacted with the lectin SNA I (Table 2); among these strains, the capsular type 14 strain was originally isolated in a case of human meningitis (8). One strain (capsular type 15) agglutinated very weakly with this lectin. The reaction with SNA I indicates that the sialic acid linkage in these capsular types of *S. suis* is probably Neu5Ac-α(2,6)GalNAc (18). In addition, three capsular types also agglutinated with the lectin WGA. The other lectins did not agglutinate any of the strains of the other capsular types. Interestingly, SNA I reacted with the reference strain of capsular type 16 but not with that of capsular type 6. It is known that both capsular types share common epitopes in the capsule, and adsorbed sera should be used for

* Corresponding author. Phone: (514) 773-8521, ext. 8374. Fax: (514) 778-8108. Electronic mail address: gottschm@ere.umontreal.ca.

TABLE 1. Lectins used in the agglutination assays and their carbohydrate specificities

Lectin	Carbohydrate specificity	Reference(s)
SNA I	Neu5Ac-α(2,6)GalNAc	18
WGA	D-(GlcNAc)$_n$, Neu5Ac	16
M. amurensis	Neu5Ac-α(2,3)Gal	11, 14
H. americanus	Neu5Ac, GalNAc	9
L. flavus	Neu5Ac, Neu5Gc[a]	15

[a] Neu5Gc, *N*-glycolylneuraminic acid.

their identification (8). It seems that sialic acid epitopes are not involved in this cross-reaction, and the lectin agglutination test could therefore be utilized to rapidly distinguish the two types. In fact, Doyle et al. (2) have already described the use of lectins to discriminate between members of the family *Neisseriaceae*. However, more strains of the two types should be tested to gain more evidence.

To confirm that agglutination was due to the binding of the lectins to sialic acid, the test was repeated after treatment of bacteria with sialidase from *Clostridium perfringens* (Boehringer-Mannheim, Laval, Canada). After 6-h growth in Todd-Hewitt broth, cells were centrifuged, resuspended in a solution of 0.6 U of sialidase per ml of sodium acetate buffer (50 mM sodium acetate, 0.9% NaCl, 0.1% $CaCl_2$ [pH 5.5]), and incubated at 37°C for 3 h. Cells were washed twice in PBS and used for agglutination assays. The presence of the capsule after enzyme treatment was verified by previously described serotyping methods (10). After enzyme treatment, reaction between SNA I and strains of capsular types 2, 14, and 15 disappeared whereas it diminished with types 1/2, 1, and 16 (Table 2). The weak reaction observed with the latter capsular types after enzyme treatment was probably due to sugars different from sialic acid, since treatment with increasing concentrations of sialidase (up to 3 U/ml) did not eliminate the reaction (results not shown).

On the other hand, the reaction between WGA and capsular types 1/2 and 15 was slightly affected or not affected at all by the enzyme treatment (Table 2). Since WGA did not recognize capsular types 2, 14, and 16, the reaction with capsular types 1, 1/2, and 15 was probably due to another type of carbohydrate. Although WGA exhibits specificity towards sialic acids, it binds preferentially to GlcNAc and its β(1,4)-linked oligomers (6). The weak interaction of WGA with sialic acids and GalNAc is based on their structural similarities to GlcNAc (17). In addition, it is possible that sialidase treatment partially affected the carbohydrate moiety recognized by WGA and reduced its reaction with the enzyme-treated capsular type 1 reference strain.

TABLE 2. Agglutination results for the reference strains of *S. suis* with sialic acid-binding lectins before and after sialidase treatment

Capsular type[a]	Agglutination[b]			
	SNA I		WGA	
	Before	After	Before	After
1	+++	+	+++	+
1/2	++++	+	+++	++
2	++++	−	−	ND[c]
14	++++	−	−	ND
15	+	−	+++	+++
16	+++	+	−	ND

[a] All other capsular types were negative for all the lectins.
[b] Lectins other than SNA I and WGA were negative for all the capsular types. The number of pluses indicates the relative degree of agglutination reaction. −, no visible agglutination reaction.
[c] ND, not done.

Of the 45 field strains of capsular type 2, most agglutinated only and strongly with SNA I; only one strain gave fine aggregates. The unencapsulated strain M2 agglutinated very weakly with SNA I, whereas its capsulated parent strain showed a clear and strong agglutination. The weak reaction obtained with strain M2 could possibly be attributed to residual capsular material.

Overall, these experiments confirmed the presence of sialic acid in capsular types 1, 1/2, and 2, with a possible Neu5Ac-α(2,6)GalNAc sequence. In addition, they showed that sialic acid is also present in other capsular types. For capsular type 2 strains, we confirmed that the sialic acid moiety is present mainly in the capsule. Finally, agglutination studies with lectins are an easy and rapid way to identify the presence of sialic acid and could be a useful tool to further study the role of sialic acid in the virulence of *S. suis*.

We acknowledge the invaluable assistance of Annie Lebrun.

This work was supported by a grant from Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche, 96ER00214.

REFERENCES

1. **Arends, J. P., and H. C. Zanen.** 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. Rev. Infect. Dis. **10:**131–137.
2. **Doyle, R. J., F. Nedjat-Haiem, K. F. Keller, and C. E. Frasch.** 1984. Diagnostic value of interactions between members of the family *Neisseriaceae* and lectins. J. Clin. Microbiol. **19:**383–387.
3. **Edwards, M. S., D. L. Kasper, H. J. Jennings, C. J. Baker, and A. Nicholson-Weller.** 1982. Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. J. Immunol. **128:**1278–1283.
4. **Elliot, S. D., and J. Tai.** 1978. The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. J. Exp. Med. **148:**1699–1704.
5. **Goldstein, I. J., H. C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa, and N. Sharon.** 1980. What should be called a lectin? Nature (London) **285:**66.
6. **Goldstein, I. J., and R. D. Poretz.** 1986. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins, p. 35. *In* I. E. Liener, N. Sharon, I. J. Goldstein (ed.), The lectins. Properties, functions, and applications in biology and medicine. Academic Press, London.
7. **Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, and D. Dubreuil.** 1992. Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. Vet. Microbiol. **30:**59–71.
8. **Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, K. R. Mittal, and J. Henrichsen.** 1989. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol. **27:**2633–2636.
9. **Hall, J. L., and D. T. Rowlands, Jr.** 1974. Heterogeneity of lobster agglutinins. II. Specificity of agglutinin-erythrocyte binding. Biochemistry **13:**828–832.
10. **Higgins, R., M. Gottschalk, M. Beaudoin, and S. A. Rawluk.** 1992. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in Québec and western Canada. Can. Vet. J. **33:**27–30.
11. **Kawaguchi, T., I. Matsumoto, and T. Osawa.** 1974. Studies on hemagglutinins from *Maackia amurensis* seeds. J. Biol. Chem. **249:**2786–2792.
12. **Kellens, J. T. C., J. A. Jacobs, W. J. Peumans, and E. E. Stobberingh.** 1993. The agglutination of β-haemolytic streptococci by lectins. J. Med. Microbiol. **39:**440–445.
13. **Kellens, J. T. C., J. A. Jacobs, W. J. Peumans, and E. E. Stobberingh.** 1994. Agglutination of "Streptococcus milleri" by lectins. J. Med. Microbiol. **41:**14–19.
14. **Knibbs, R. N., I. J. Goldstein, R. M. Ratcliffe, and N. Shibuya.** 1991. Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leukoagglutinating lectin from *Maackia amurensis*. J. Biol. Chem. **266:**83–88.
15. **Miller, R. L.** 1987. Properties of a sialic acid-specific lectin from the slug *Limax flavus*. Methods Enzymol. **138:**527–536.
16. **Nagata, Y., and M. Burger.** 1974. Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. J. Biol. Chem. **249:**3116–3122.
17. **Peters, B. P., S. Ebisu, I. J. Goldstein, and M. Flashner.** 1979. Interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid. Biochemistry **18:**5505.
18. **Shibuya, N., I. J. Goldstein, W. F. Broekaert, M. Nsimba-Lubaki, B. Peeters, and W. J. Peumans.** 1987. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α2-6)Gal/GalNAc sequence. J. Biol. Chem. **262:**1596–1601.
19. **Sifkin, M., and R. J. Doyle.** 1990. Lectins and their applications to clinical microbiology. Clin. Microbiol. Rev. **3:**197–218.
20. **Wagner, M.** 1982. Agglutination of bacteria by sialic acid-specific lectin of the snail *Cepaea hortensis*. Acta Histochem. **71:**35–39.

Article II

Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2

N. Charland[1], M. Kobisch[2], B. Martineau-Doizé[1], M. Jacques[1] et M. Gottschalk[1]

[1] Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

[2] Unité de Pathologie Porcine, Centre National d'Études Vétérinaires et Alimentaires, Ploufragan, France

FEMS Immunology and Medical Microbiology (1996) **14:** 195-203

ELSEVIER

FEMS Immunology and Medical Microbiology 14 (1996) 195–203

FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY

Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2

Nathalie Charland [a], Marylène Kobisch [b], Béatrice Martineau-Doizé [a], Mario Jacques [a], Marcelo Gottschalk [a,*]

[a] *Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Qué. J2S 7C6, Canada*

[b] *Unité de Pathologie Porcine, Centre National d'Études Vétérinaires et Alimentaires, B.P. 53, 22440 Ploufragan, France*

Received 11 December 1995; revised 14 March 1996; accepted 15 March 1996

Abstract

Streptococcus suis capsular type 2 has a capsule rich in sialic acid (NANA). Sialic acid, known to be an antiphagocytic factor for many bacterial species, inhibits the activation of the alternative complement pathway. The role of capsular NANA in virulence, resistance to phagocytosis and intracellular survival of *S. suis* capsular type 2 was evaluated. In general, a low concentration of NANA was observed for all the *S. suis* strains tested. In addition, no difference could be found in NANA concentrations between strains of different virulence degrees. Sialic acid concentration increased in the virulent strain 89-1591 and the avirulent strain 90-1330 after in vivo growth with an increased capsular material thickness compared to growth in vitro. No significant difference could be found in the phagocytosis rate by porcine blood monocytes of either strain and strain 89-1591 treated with sialidase or the sialic acid-binding lectin from *Sambucus nigra* (SNA I). Intracellular survival of strain 89-1591 decreased after treatments with sialidase or lectin, becoming comparable to that of strain 90-1330. Finally, no difference could be seen in virulence using a murine model, even if strain 89-1591 was treated with the enzyme or the lectin. Thus, NANA does not seem to be a critical virulence factor for *S. suis* capsular type 2.

Keywords: *Streptococcus suis*; Sialic acid; Capsule; Virulence; Phagocytosis

1. Introduction

Streptococcus suis is a worldwide causative agent of many swine infections such as meningitis, arthritis, septicemia and endocarditis [1] as well as being a zoonotic agent for meningitis and endocarditis [2,3]. However, virulence factors of *S. suis* have not been well identified. Indeed, within capsular type 2 isolates, the capsular type mostly isolated from diseased animals, some are highly virulent whereas others are completely avirulent [4–6]. Different bacterial structures or products, such as the capsule, fimbriae, extracellular and cell-wall-associated proteins, and hemolysin, have been considered to be virulence factors [7–9]. Among them, the polysaccharidic capsule may play an important role since it has been

* Corresponding author. Tel: +1 (514) 773 8521 ext. 8374; Fax: +1 (514) 778 8108; E-mail: gottschm@ere.umontreal.ca

0928-8244/96/$15.00 Copyright © 1996 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V.
PII S0928-8244(96)00030-2

recognized as an important feature for successful invasion and disease production by many bacterial pathogens [10,11]. *S. suis* type 2 possesses a capsule composed of five sugars, the third most important being sialic acid (*N*-acetyl neuraminic acid, Neu5Ac or NANA) [12]. Little is known about the role of NANA in *S. suis* type 2. Recently, the type of linkage involving NANA in the capsule of *S. suis* type 2 has been identified as a possible Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc sequence [13]. Sialic acid is known to modulate the activation of the alternative complement pathway by increasing the affinity constant of C3b binding to factor H relative to factor B, thereby preventing bacterial phagocytosis by blocking the formation of C3 convertase C3bBb, and inhibiting further C3b deposition [14]. Sialic acid is involved in the virulence of many bacteria such as group B streptococci [15,16] and gonococci [17]. Arends and Zanen [2] have suggested that the presence of NANA in the capsule of *S. suis* type 2 could be involved in the virulence of the bacteria.

Although capsular NANA plays a well recognized role in the resistance to phagocytosis in other bacteria, similar functions in *S. suis* infections have not been studied. In fact, the pathogenesis of *S. suis* infections seems to be different from that reported for other streptococci also responsible for meningitis, such as group B streptococci and pneumococci [15,18]. For these pathogens, the capsule seems to play an important antiphagocytic role. In the case of *S. suis*, there are some reports which indicated that both well encapsulated virulent and avirulent isolates were easily phagocytosed by murine macrophages in absence of antibodies and/or complement but only virulent isolates survived within phagosomes [6,19].

The aim of this study was to evaluate the role of capsular sialic acid in virulence, resistance to phagocytosis and intracellular survival of *S. suis* capsular type 2.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Six different capsular type 2 isolates and the reference strain (R735, J. Henrichsen, Statens Seruminstitute, Copenhagen, Denmark) used in this study came from our collection. In addition, an unencapsulated avirulent strain, M2, derived from strain 89-1591, was also used [20]. The strains were chosen according to their different degree of virulence in both mice and pigs (R735, 89-1591, 89-999, JL 590, LM-90-559, highly virulent; 90-1330, 0891, TD 10, avirulent) [4]. Strain TD 10 was kindly provided by Dr. T. Alexander (University of Cambridge, UK). Cells were grown overnight on bovine blood agar plates at 37°C and single colonies were used as inocula for Todd-Hewitt broths (THB; Difco Laboratories, Detroit, MI).

2.2. Sialic acid concentration determination

Sialic acid concentration was determined using the thiobarbituric acid method of Warren-Aminoff [21]. Sialic acid extraction was done as follows. Cells were grown in THB for 6 h at 37°C and centrifuged at 1300 × *g* for 10 min. Absorbances of the suspensions were measured at 540 nm and suspensions concentrated to an A_{540}-equivalent of 5 in phosphate-buffered saline (PBS; 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4, 10 mM Na_2HPO_4, pH 7.4). Cells were lyophilized and hydrolysis in hot acid (0.4 M H_2SO_4, 80°C, 1 h) was performed on lyophilized cells (20 mg ml^{-1}) to release NANA. *N*-acetylneuraminic acid was used as a standard (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). Sialic acid concentrations were measured in at least three independent experiments.

2.3. Sialidase treatment

Sialidase from *Clostridium perfringens* (Boehringer-Mannheim, Laval, Québec, Canada) was used at a concentration of 0.6 U ml^{-1} sodium acetate buffer pH 5.5, where one unit liberates 1.0 μmol of NANA per min at pH 5.0 at 37°C. Treatment was performed as previously described [22]. Briefly, strain 89-1591 grown for 6 h (4×10^8 colony forming units (cfu) ml^{-1}) was centrifuged and suspended in the enzyme solution prewarmed to 37°C. Cells were incubated for 3 h at 37°C and washed twice in PBS to remove free NANA.

2.4. Treatment with lectin I from Sambucus nigra

Lectin SNA I from the elderberry *Sambucus nigra* recognizes *S. suis* type 2 NANA [13] and was kindly provided by Dr. Jan T.C. Kellens (University of Maastricht, the Netherlands). Strain 89-1591 from a 6-h broth was centrifuged, suspended in a 1 mg ml^{-1} solution of SNA I diluted 1/50 in PBS (final concentration of 20 μg ml^{-1}) such as to obtain minimal visual agglutination reactions, and left to incubate for 1 h at room temperature. Cells were then washed to remove unbound lectin and suspended in PBS.

2.5. In vivo growth conditions

Diffusion chambers were prepared using a modified methodology already described [23]. Ten-ml polypropylene syringe barrels were cut to have internal volumes of 6 ml. Filters of 0.22 μm, cut to the diameter of the syringes, were fixed to each end by melting the barrel on a hot knife. Syringes were punctured using a heated 20-G needle. Chambers were then autoclaved. A virulent (89-1591) and an avirulent (90-1330) strain was chosen for these experiments. Cells grown for 6 h in THB were centrifuged and suspended in sterile PBS to an A_{540} of 0.4, corresponding to $2–4 \times 10^8$ cfu ml^{-1}. Four milliliters of the bacterial suspension were injected in each chamber and the holes closed with a hot glass rod. A total of eight chambers per pig were prepared. Specific pathogen free piglets (born from hysterectomy-derived sows) aged between 5 and 10 weeks were used. These animals were kept in high-security barns until the sacrifices and were free of *S. suis*. Two pigs per strain were used each time. Pigs were anesthetized with Stresnil (2 mg kg^{-1}) by intramuscular route and with Hypnodil (10 mg kg^{-1}) (Janssen Laboratories, Belgium) by intraperitoneal route. A laparotomy was performed to install the chambers in the peritoneal cavity. The peritoneum and the skin were sewed independently with suture thread PDS II 36 mm-1/2 c. 70 cm (Ethicon, France). Chambers were left to incubate for 16–18 h. The pigs were then sacrificed by exsanguination and the peritoneal cavity opened to retrieve the chambers. Chambers were washed thoroughly with sterile saline and the suspension retrieved with a sterile needle and syringe. Cells were centrifuged and suspended in PBS until used.

2.6. Phagocytic assay

Monocytes from pig blood were used in this assay and isolated using modified methods previously described [24,25]. Fresh heparinized pig blood was diluted 1:1 with sterile Hank's Balanced Saline Solution (HBSS, Gibco, Burlington, Canada), mixed with 6% (w/v) dextran (in HBSS) in a 2:1 ratio and left to incubate for 1 h at 4°C. The supernatant was then removed, centrifuged at $400 \times g$, 15 min, 4°C and cells washed with HBSS. Monocytes were then isolated in a Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) gradient, prepared from isotonic and Percoll stock solutions as already described [25]. Cell purity was determined by a non-specific esterase staining and was more than 80%. Cell viability was more than 99% as determined by Trypan blue exclusion. The cell concentration was then adjusted to 1×10^6 monocytes ml^{-1} Iscove medium (Gibco, Burlington, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). Cells were distributed in 1-ml volumes in wells of a 24-well plate containing sterile microscope cover slips. Monocytes were left to incubate for 1 h at 37°C, 5% CO_2 to permit adhesion, washed three times with HBSS and reincubated in Iscove medium plus 10% FBS until use. Cells from the chambers or cells grown overnight in THB were used in this assay. To observe the effect on complement activation, cells grown in vivo were opsonized naturally in the peritoneal cavity of the pigs whereas cells grown in THB were opsonized with 5% fresh pig serum before the phagocytic assay. The assay was performed as already described [19] with some modifications. Opsonized bacteria were diluted in Iscove medium plus 10% FBS to a concentration of 5×10^6 cells ml^{-1} and added to the monocytes for a final ratio of five bacteria for one monocyte. Phagocytosis was left to proceed for 3 h at 37°C, 5% CO_2. After incubation, the medium was removed and phagocytic cells with engulfed bacteria were stained with acridine orange (Sigma Chemicals, St. Louis, MO; 0.0144%, w/v, in HBSS) for 45 s and counterstained with crystal violet (Sigma Chemicals, St. Louis, MO; 0.12 mM in 0.15 M NaCl) for

45 s to quench fluorescence of bacteria external to phagocytes. Viable bacteria fluoresced green whereas dead ones were red under ultraviolet light [26]. Calculations were made as follows:

$$\text{Percentage of phagocytosis} = \frac{\text{number of monocytes that phagocyted bacteria}}{\text{200 monocytes}} \times 100$$

$$\text{Percentage of survival} = \frac{\text{number of viable bacteria in 30 monocytes}}{\text{total number of bacteria in these 30 monocytes}} \times 100$$

2.7. Electron microscopy of S. suis grown in vivo and in vitro

Bacteria retrieved from diffusion chambers or from THB were prepared in order to stabilize the capsule [8]. Briefly, cells were fixed in 5% (w/v) glutaraldehyde in cacodylate buffer for 2 h at room temperature. All the following solutions until acetone washing contained 0.05% (w/v) ruthenium red without antibodies. Fixed bacteria were then suspended in cacodylate buffer containing 1 mg ml^{-1} of polycationic ferritin (Sigma Chemical) and incubated for 30 min at room temperature. The reaction was slowed by ten-fold dilution with buffer, cells centrifuged and washed three times in the same buffer. Bacteria were immobilized in 4% (w/v) agar, washed five times in buffer and postfixed with 2% (v/v) osmium tetroxide for 2 h. Cells were washed again as above and dehydrated in a graded series of acetone washes. Samples were washed twice in propylene oxide and embedded in Spurr low-viscosity resin. Thin sections were finally post-stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with an electron microscope (Phillips 201) at an accelerating voltage of 60 kV. A total of 20 to 25 capsular material thickness measurements were made on different cells of each strain grown under different conditions.

2.8. Evaluation of the virulence

Virulence of strain 89-1591 untreated, sialidase-treated and SNA I-treated was assessed using a murine model already described with some modifications [27]. Briefly, three sets of cells were grown in THB + 10% FBS to an A_{540} of 0.4. The dose of bacteria injected was increased from 10^7 cfu ml^{-1} to 10^8 cfu ml^{-1} to prevent false negative reactions i.e. too few bacteria. One set was left untreated, another set was treated with SNA I lectin and suspended in PBS supplemented with 10% FBS and the last set was treated with sialidase, concentrated ten times to compensate for the loss in viability and also suspended in PBS + 10% FBS. One milliliter of the suspensions was injected intraperitoneally to three groups of five 28-day-old BALB/c mice and mortality was monitored twice a day for 48 h. Mice were handled according to the 'Guide to the Care and Use of Experimental Animals' from the Canadian Council on Animal Care. Viable counts were done on each suspension.

2.9. Statistics

Data were analyzed by Student's unpaired t-test (two-tailed) [28].

3. Results

3.1. Sialic acid concentrations

Of the nine strains tested after in vitro growth, only the unencapsulated strain M2 possessed a remarkable difference in its NANA concentration (< 1 μg mg^{-1} of cells: $P < 0.05$) (Table 1). All other strains had similar NANA concentrations without significant differences between strains of different virulence degrees ($P > 0.05$). Strains 89-1591 and 90-1330 had the highest NANA concentration, even though their virulence differed. After in vivo growth in diffusion chambers, an increase in NANA concentration could be observed in both strains 89-1591 and 90-1330 ($P < 0.05$). No significant difference in NANA concentration between both strains grown in vivo could be seen ($P > 0.05$). On the other hand, strain 89-1591 treated with sialidase had little NANA left but NANA could be found in the supernatant after the treatment (results not shown).

Table 1
Sialic acid concentrations of *Streptococcus suis* capsular type 2 strains grown under in vitro and in vivo conditions

Strain	Sialic acid concentration ($\mu g\ mg^{-1}$ of cells) of *S. suis* after growth ($n = 3$)	
	In vitro, mean ± S.D.	In vivo, mean ± S.D.
R735(V)	2.58 ± 0.34	ND
89-1591(V)	3.36 ± 0.22	6.39 ± 0.45 [a]
89-999(V)	2.24 ± 0.67	ND
LM-90-559(V)	2.47 ± 0.45	ND
JL 590(V)	3.03 ± 0.11	ND
90-1330(A)	3.14 ± 0.90	6.61 ± 2.47 [a]
0891(A)	2.91 ± 0.90	ND
TD10(A)	2.69 ± 0.45	ND
M2 (A) [b]	0.34 ± 0.11 [c]	ND

S.D., standard deviations; ND, not done; V, virulent; A, avirulent.
[a] Significant difference compared to the same strain grown in vitro, $P < 0.05$.
[b] Unencapsulated strain.
[c] Only strain with a significant difference in NANA concentration compared to the other strains grown in vitro, $P < 0.05$.

Table 3
Evaluation of the virulence of strain 89-1591 untreated, sialidase-treated and lectin-treated with a murine model of infection

Treatment	No. of dead mice ($n = 15$)	Viable counts (cfu × 10^8 ml^{-1})
89-1591 untreated	12	3.3 ± 0.5
89-1591 Ase	13 [a]	2.2 ± 0.5
89-1591 SNA	13 [a]	4.4 ± 0.2

Ase, sialidase; SNA, SNA I lectin.
[a] No significant difference with 89-1591 untreated, $P > 0.05$.

3.2. Effect of absence or blocking of NANA on phagocytosis and survival

Table 2 presents results of 3 h of phagocytosis after in vivo and in vitro growth, with or without enzyme or lectin treatments. Phagocytosis was similar for both virulent and avirulent strains, regardless of growth conditions ($P > 0.05$). Enzyme or lectin treatments did not affect phagocytosis, except for lectin-treated 89-1591 after in vivo growth which showed a slight increase in phagocytosis although it was not significant ($P > 0.05$). Absence of capsule in strain M2 caused an increase in phagocytosis (63 ± 3%, $P < 0.05$; results not shown). After 3 h, survival was more affected for the avirulent strain 90-1330 in both growth conditions compared to the virulent strain 89-1591 ($P < 0.05$). On the other hand, after sialidase and lectin treatments, the degree of survival decreased for 89-1591, becoming comparable to the avirulent strain ($P > 0.05$).

3.3. Effect of in vivo growth on capsular material thickness

After in vitro growth, a similar capsular material thickness was observed for both the virulent 89-1591 and the avirulent 90-1330 strains (Fig. 1). However, after in vivo growth, both strains have a thicker capsule compared to growth in laboratory media. Thickness of capsular material for 89-1591 and 90-1330 after in vitro growth ranged between 70–75 nm, and 60–80 nm, respectively. On the other hand,

Table 2
Percentages of phagocytosis and intracellular survival of *Streptococcus suis* capsular type 2 strains 90-1330, 89-1591, sialidase-treated 89-1591 and lectin-treated 89-1591 after in vitro and in vivo growth and left in presence of porcine monocytes for 3 h

Strain	Phagocytosis (%) after growth		Survival (%) after growth	
	Mean ± S.D. ($n = 3$) [a]		Mean ± S.D. ($n = 3$)	
	In vitro	In vivo	In vitro	In vivo
90-1330	23 ± 3	29 ± 4	23 ± 4 [b]	30 ± 5 [b]
89-1591	29 ± 2	29 ± 1	42 ± 6	40 ± 5
89-1591Ase	40 ± 9	24 ± 4	20 ± 9 [c]	21 ± 6 [c]
89-1591SNA	37 ± 8	50 ± 19	31 ± 8 [c]	25 ± 9 [c]

S.D., standard deviations; Ase, sialidase; SNA, SNA I lectin.
[a] No significant difference between strains, regardless of growth conditions or treatments, $P > 0.05$.
[b] Significant difference with 89-1591 untreated, $P < 0.05$.
[c] No significant difference with 90-1330, $P > 0.05$.

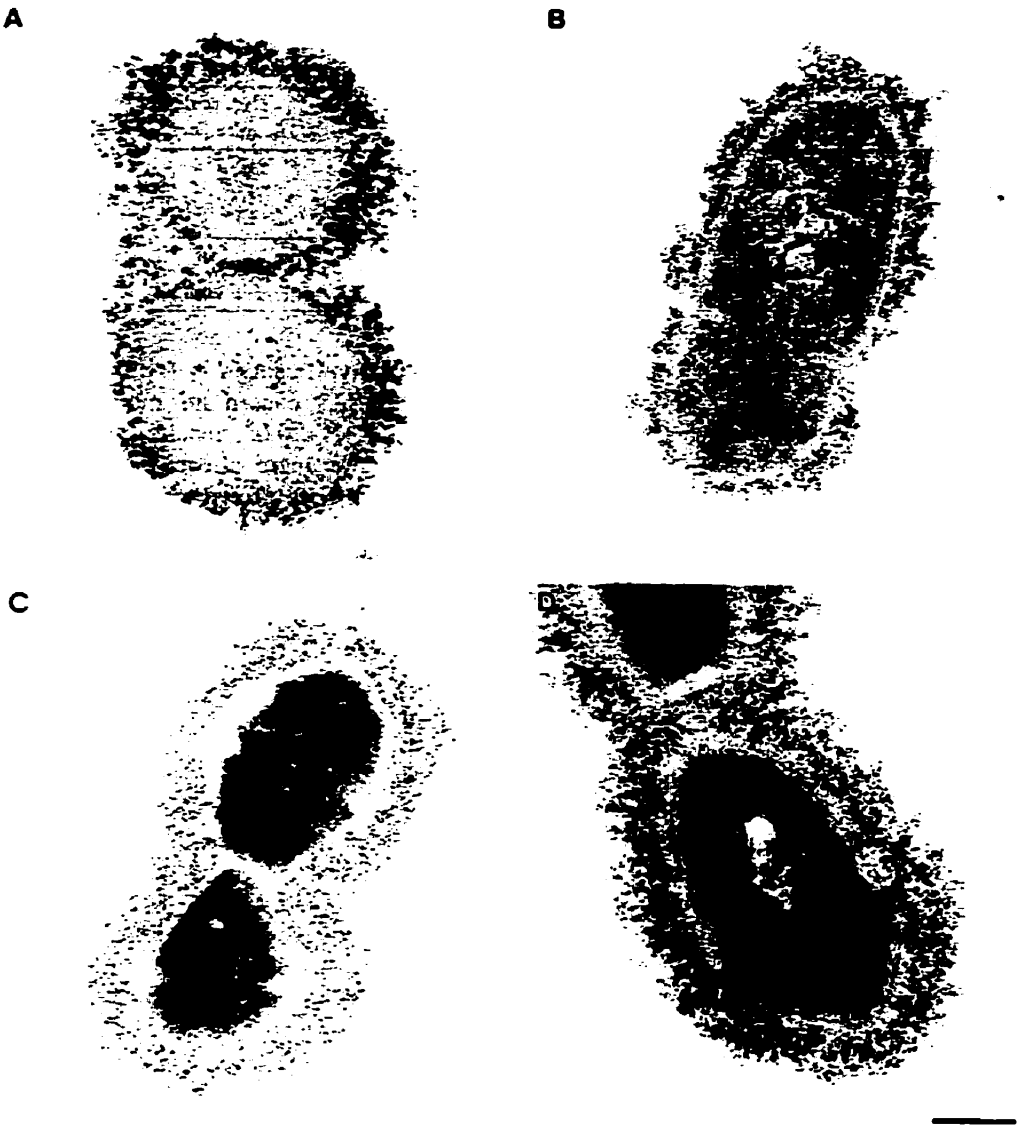


Fig. 1. Transmision electron micrographs of thin sections of *Streptococcus suis* capsular type 2 labeled with polycationic ferritin. (**A**) Virulent strain 89-1591 and (**B**) avirulent strain 90-1330 grown overnight in THB. (**C**) Strain 89-1591 and (**D**) strain 90-1330 grown overnight in pig intraperitoneal chambers. Bars represent 200 nm.

in vivo growth gave capsules of 80–135 nm and 95–150 nm for 89-1591 and 90-1330, respectively.

3.4. *Effect of absence or blocking of NANA on virulence*

Enzyme treatment decreased the viability by one log when colony counts were compared for treated and non-treated cells. Integrity of capsular material was not affected by the treatment as shown by serotyping and electron microscopy (results not shown). No difference was observed in the mortality of the three groups of mice regardless of the treatments. Untreated, sialidase-treated and lectin-treated bacteria all killed twelve to thirteen mice out of fifteen (Table 3). In addition, clinical signs appeared

simultaneously a few hours after infection in the three groups of animals. No mortality or clinical signs were observed with mice inoculated with the avirulent unencapsulated strain M2 or with the avirulent lectin-treated strain 90-1330 (results not shown).

4. Discussion

Sialic acid does not seem to be a critical virulence factor for *S. suis* capsular type 2 since all strains tested possess a similar concentration of NANA in their capsule, regardless of their virulence. The presence of NANA in the capsule of *S. suis* type 2 is confirmed by the fact that little NANA could be found in the unencapsulated strain M2, the weak reaction being probably due to residual capsular material. Compared to our results, NANA concentration in *S. suis* is one and a half time less than that found in the least virulent strains of group B streptococci (GBS) and four times less than that in the most virulent GBS strains [29]. This difference in NANA concentration between the two groups of streptococci, and the difference in the pathogenesis of the infections proposed for both bacterial species [15,16,35], may explain why NANA has a pathogenic role in GBS but not in *S. suis*.

Some virulence factors are not synthesized when bacteria are grown in laboratory media and are only expressed under in vivo conditions [30]. In addition, it was shown that capsular NANA concentration increased after growth of group B streptococci in human serum [31]. To examine such effects on *S. suis* type 2, intraperitoneal chambers were used to grow bacteria in vivo. Sialic acid concentration as well as capsular material thickness increased after in vivo growth for both virulent and avirulent strains. It is possible that the increase in NANA is only due to an increase of capsular material. Another possibility for the increase in NANA concentration could involve adhesion of sialated host proteins to bacterial cells. It is known that some strains of *S. suis* recognize NANA [32]. Thus, it is possible that this sugar-specific binding activity was involved during in vivo growth, causing the bacteria to adsorb NANA from the host. However, additional experiments need to be done to test this eventuality. In previous experiments, it was shown that only the virulent strain had an increase in capsular material thickness after in vivo growth in rat intraperitoneal diffusion chambers [33]. Our results indicated that growth in the natural host may have an effect on both strains regardless of the virulence degree. Moreover, it was reported that no correlation between capsule thickness and virulence can be made [34]. The capsule thickness after in vitro growth of the strains tested in this study are similar to that previously obtained with capsular type 2 reference strain [8].

Porcine monocytes instead of neutrophils were chosen since these phagocytes have the most important role in the pathogenesis of *S. suis* infection. Among others, Williams and Blakemore [35] proposed that *S. suis* enters the circulation from tonsils, is taken up by monocytes and transported to the cerebrospinal fluid via the choroid plexus. Our percentages of phagocytosis of virulent and avirulent *S. suis* strains, obtained with porcine monocytes, were similar to those previously obtained with murine macrophages [6,19], and this regardless of the growth conditions. Even though the concentration of NANA doubles after in vivo growth of 89-1591, no difference was found after 3 h in the phagocytosis of this strain after in vivo or in vitro growth, indicating that complement activation does not seem to be affected by the presence of NANA. This confirms data indicating that complement does not seem to play an important role in phagocytosis of *S. suis* [19]. The slight increase in phagocytosis rate for lectin-treated 89-1591 after in vivo growth could be due to micro-agglutinations produced by the lectin, causing bacteria to clump and facilitating ingestion by monocytes. On the other hand, a difference between the two strains differing in virulence was seen in intracellular survival which was greater for the untreated strain 89-1591 than that of the avirulent 90-1330. These results confirm those reporting that both virulent and avirulent strains are phagocytosed with the virulent strains surviving more easily inside macrophages [6,19]. Survival rate decreased for the virulent strain after sialidase or lectin treatments reaching the survival level of the avirulent 90-1330. It is possible that factors other than NANA are modified after enzyme or lectin treatments, which may affect the intracellular fate of *S. suis*. However, other experiments need to be done to confirm this possibility.

It was shown that treatment with sialidase did not

affect the virulence of *S. suis*. It could be thought that sialidase-treated bacteria had time to replicate inside mice and regain their NANA moiety causing bacteria to be more virulent. However, clinical signs appeared within a few hours after infection for all groups of mice. It was shown with group B streptococci that sialidase treatment of virulent strains rendered them less virulent to rats, indicating that NANA-free cells were destroyed more easily than cells with NANA [22].

Despite our results, a possible, indirect role for sialic acid in virulence cannot be ruled out. In fact, NANA could have a role in mimicry to evade host responses. It was demonstrated that no anti-capsular antibodies could be found in convalescent animals experimentally infected and extremely ill with *S. suis* type 2 [36]. These findings could enhance the possibility that the capsular NANA may be involved in the protection of the bacteria against the host's immune system. Some workers have suggested that NANA may mask epitopes of protective antibodies [22].

In conclusion, sialic acid does not seem to be critical in the virulence of *S. suis* type 2 since all strains tested had the same low sialic acid concentration regardless of their virulence. In addition, blocking or enzymatic removal of sialic acid does not seem to influence the virulence or phagocytosis of the strain used.

Acknowledgements

We thank Guillaume Chenut, Nathalie Bridoux, Roland Cariolet, Gérard Bénévent and Bernadette Foiry for their excellent technical assistance and Dean Cain for reviewing the manuscript. This work was supported by the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec (FCAR) grant #96-ER-0214, by le Ministère des Affaires Étrangères de France, by le Ministère des Affaires Internationales, de l'Immigration et des Communautés culturelles du Québec and by the Conseil de Recherches en Pêche et en Agro-alimentaire du Québec (CORPAQ) grant #3639. N.C. is the recipient of a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) graduate scholarship.

References

[1] Higgins, R., Gottschalk, M., Beaudoin, M. and Rawluk, S.A. (1992) Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in Québec and western Canada. Can. Vet. J. 33, 27–30.

[2] Arends, J.P. and Zanen, H. (1988) Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. Rev. Infect. Dis. 10, 131–137.

[3] Trottier, S., Higgins, R., Brochu, G. and Gottschalk, M. (1991) A case of human endocarditis due to *Streptococcus suis* in North America. Rev. Infect. Dis. 13, 1251–1252.

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

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

[6] Williams, A.E. (1990) Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 isolates. Microb. Pathogen. 8, 189–196.

[7] Gottschalk, M., Lacouture, S. and Dubreuil, J.D. (1995) Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. Microbiology 141, 189–195.

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

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

[10] Domenico, P., Salo, R.J., Cross, A.S. and Cunha, B.A. (1994) Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. Infect. Immun. 62, 4495–4499.

[11] Yeung, M.K. and Mattingly, S.J. (1984) Biosynthetic capacity of type-specific antigen synthesis determines the virulence of serotype III strains of group B streptococci. Infect. Immun. 44, 217–221.

[12] Elliot, S.D. and Tai, J. (1978) The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. J. Exp. Med. 148, 1699–1704.

[13] Charland, N., Kellens, J.T.C., Caya, F. and Gottschalk, M. (1995) Agglutination of *Streptococcus suis* by sialic acid-binding lectins. J. Clin. Microbiol. 33, 2220–2221.

[14] Kazatchkine, M.D., Fearon, D.T. and Austen, K.F. (1979) Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta 1 H for cell-bound C3b. J. Immunol. 122, 75–81.

[15] Edwards, M.S., Kasper, D.L., Jennings, H.J., Baker, C.J. and Nicholson-Weller, A. (1982) Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. J. Immunol. 128, 1278–1283.

[16] Wessels, M.R., Rubens, C.E., Benedi, V.-J. and Kasper, D.L. (1989) Definition of a bacterial virulence factor: Sialylation of the group B streptococcal capsule. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 8983–8987.

[17] Smith, H. (1993) Gonococci in vivo: Host CMP-NANA, sialylated lipopolysaccharide and serum resistance. Can. J. Infect. Dis. 4, 31–37.

[18] Fine, D.P. (1975) Pneumococcal type-associated variability in alternate complement pathway activation. Infect. Immun. 12, 772–778.

[19] Brazeau, C., Gottschalk, M., Vincelette, S. and Martineau-Doizé, B. (1996) In vitro phagocytosis and survival of *Streptococcus suis* capsular type 2 inside murine macrophages. Microbiology, in press.

[20] Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M. and Dubreuil, D. (1992) Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. Vet. Microbiol. 30, 59–71.

[21] Warren, L. (1963) Thiobarbituric acid assay for sialic acids. Methods Enzymol. 6, 463–464.

[22] Shigeoka, A.O., Rote, N.S., Santos, J.I. and Hill, H.R. (1983) Assessment of the virulence factors of group B streptococci: Correlation with sialic acid content. J. Infect. Dis. 147, 857–863.

[23] Day, S.E.J., Vasli, K.K., Russel, R.J. and Arbuthnott, J.P. (1980) A simple method of the study in vivo of bacterial growth and accompanying host response. J. Infect. 2, 39–51.

[24] Dom, P., Haesebrouck, F., Kamp, E.M. and Smits, M.A. (1992) Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and its cytolysins on porcine neutrophil chemiluminescence. Infect. Immun. 60, 4328–4334.

[25] Weiss, D.J., Kraemer, R. and Schmit, K. (1989) Isolation of granulocytes and mononuclear cells from the blood of dogs, cats, horses and cattle. Vet. Clin. Pathol. 18, 33–36.

[26] Goldner, M., Farkas-Himsley, H., Kormendy, A. and Skinner, M. (1983) Bacterial phagocytosis monitored by fluorescence and extracellular quenching: ingestion and intracellular killing. Lab. Med. 14, 291–294.

[27] Beaudoin, M., Higgins, R., Harel, J. and Gottschalk, M. (1992) Studies on a murine model for evaluation of virulence of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates. FEMS Microbiol. Lett. 78, 111–116.

[28] Glantz, S.A. (1987) Primer of Biostatistics, 2nd Edition, pp. 65–68. McGraw-Hill, Inc., NY.

[29] Nagano, Y., Nagano, N., Takahashi, S., Suzuki, A. and Okuwaki, Y. (1989) Sialic acid levels and lag time growth in chemically defined medium containing 200 mM phosphate among strains of various serotypes of *Streptococcus agalactiae*. J. Clin. Microbiol. 27, 2148–2151.

[30] Rittenberg, S.C., Penn, C.W., Parsons, N.J., Veale, D.R. and Smith, H. (1977) Phenotypic changes in the resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to killing by normal human serum. J. Gen. Microbiol. 103, 69–75.

[31] Platt, M.W., Correa, N. Jr. and Mold, C. (1994) Growth of group B streptococci in human serum leads to increased cell surface sialic acid and decreased activation of the alternative complement pathway. Can. J. Microbiol. 40, 99–105.

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

[33] Quessy, S., Dubreuil, J.D., Jacques, M., Malouin, F. and Higgins, R. (1994) Increase of capsular material thickness following in vivo growth of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains. FEMS Microbiol. Lett. 115, 19–26.

[34] Clifton-Hadley, F.A., Alexander, T. and Enright, M. (1986) The epidemiology, diagnosis, treatment, and control of *Streptococcus suis* type 2 infection. Proc. Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract. 471–491.

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

[36] Del Campo Sepulveda, E., Altman, E., Kobisch, M. and Gottschalk, M. (1996) Detection of serotype-specific antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using an indirect ELISA. Vet. Microbiol. in press.

Article III

Streptococcus suis serotype 2 mutants deficient in capsular expression

N. Charland[1], J. Harel[1], M. Kobisch[2], S. Lacasse[1] et M. Gottschalk[1]

[1] Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

[2] Unité Mycoplasmologie Bactériologie, Centre National d'Études Vétérinaires et Alimentaires, Ploufragan, France

Microbiology (1998) **144:** 325-332

Microbiology (1998), 144, 325–332 Printed in Great Britain

Streptococcus suis serotype 2 mutants deficient in capsular expression

Nathalie Charland,[1] Josée Harel,[1] Marylène Kobisch,[2] Serge Lacasse[1] and Marcelo Gottschalk[1]

Author for correspondence: Marcelo Gottschalk. Tel: +1 514 773 8521 ext. 8374. Fax: +1 514 778 8108. e-mail: gottschm@ere.umontreal.ca

[1] Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

[2] Centre National d'Études Vétérinaires et Alimentaires, Unité Mycoplasmologie Bactériologie, BP 53, Zoopôle, 22440 Ploufragan, France

Streptococcus suis serotype 2 is responsible for a wide variety of porcine infections. In addition, it is considered a zoonotic agent. Knowledge about the virulence factors for this bacterium is limited but its polysaccharide capsule is thought to be one of the most important. Transposon mutagenesis with the self-conjugative transposon Tn916 was used to obtain acapsular mutants from the virulent _S. suis_ type 2 reference strain S735. Clones were screened by colony-dot ELISA with a monoclonal antibody specific for a type 2 capsular epitope and clones that failed to react with the antibody were characterized. Two mutants, 2A and 79, having one and two Tn916 insertions respectively, were chosen for further characterization. Absence of capsule was confirmed by coagglutination, capillary precipitation and capsular reaction tests and by transmission electron microscopy. Absence of capsular polysaccharides correlated with increased hydrophobicity and phagocytosis by both murine macrophages and porcine monocytes compared to the wild-type strain. Furthermore, both mutants were shown to be avirulent in murine and pig models of infection. Finally, mutant 2A was readily eliminated from circulation in mice compared to the wild-type strain, which persisted more than 48 h in blood. Thus, isogenic mutants defective in capsule production demonstrate the importance of capsular polysaccharides as a virulence factor for _S. suis_ type 2.

Keywords: *Streptococcus suis*, Tn916, capsule, mutant, virulence

INTRODUCTION

Streptococcus suis is responsible for a wide variety of porcine disease syndromes, such as meningitis, septicaemia, arthritis and endocarditis (Higgins & Gottschalk, 1998). It is also recognized as a human pathogen, causing mainly meningitis (with deafness as a common sequela) and endocarditis (Walsh *et al.*, 1992; Arends & Zanen, 1988; Trottier *et al.*, 1991). To date, 35 serotypes of *S. suis* have been described, with serotype 2 being the most frequently isolated from diseased animals (Higgins & Gottschalk, 1996). Knowledge on virulence factors of *S. suis* is limited. Several virulence factor candidates have been proposed. These include the polysaccharide capsule, cell-wall and extracellular proteins, including muramidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and adhesins, and a haemolysin (Gottschalk *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1994; Tikkanen *et al.*, 1996; Vecht *et al.*, 1991). Recent studies have shown that *S. suis* mutants which produce neither MRP nor EF are as virulent as the wild-type strain (Smith *et al.*, 1996). It has been suggested that these proteins could be used as virulence markers for European strains. On the other hand, most field strains isolated in Canada do not produce these proteins and/or the haemolysin (Gottschalk *et al.*, 1998).

Although the polysaccharide capsule of *S. suis* serotype 2, which contains, among other sugars, a sialic acid moiety (Elliott & Tai, 1978; Katsumi *et al.*, 1996), has been identified as a potential virulence factor, its role in the pathogenesis of the infection can be considered controversial. It has been shown that, with some exceptions (Elliott *et al.*, 1980), both virulent and avirulent strains are encapsulated and are similarly phagocytosed by macrophages, and that the capsule of an avirulent strain does not appear to aid intracellular survival (Brazeau *et al.*, 1996; Williams, 1990). In

Abbreviations: DIG, digoxigenin; EF, extracellular factor; FBS, foetal bovine serum; MRP, muramidase-released protein; NANA, *N*-acetylneuraminic acid (sialic acid); SNA I, *Sambucus nigra* agglutinin; SPF, specific-pathogen free.

0002-1938 © 1998 SGM

addition, sialic acid does not seem to be critical for virulence, since all field strains of *S. suis* serotype 2 tested had the same low sialic acid concentration regardless of their virulence, and blocking or enzymic removal of this sugar did not influence phagocytosis rates and virulence of a virulent strain (Charland *et al.*, 1996). On the other hand, a spontaneous unencapsulated mutant, obtained from a virulent strain by serial passages in presence of anti-capsular antibodies, was shown to be avirulent in mice (Gottschalk *et al.*, 1992) and highly phagocytosed (Brazeau *et al.*, 1996; Salasia *et al.*, 1995). However, this mutant also lacked, at least, a 44 kDa cell-wall protein. The claim that the presence of a capsule is required for virulence awaited testing with isogenic mutants.

Transposon mutagenesis is a powerful tool used to evaluate the involvement of specific factors in the pathogenesis of streptococci (Caparon & Scott, 1991). It has successfully been used to produce unencapsulated mutants of group B streptococci (Rubens *et al.*, 1987). This paper describes the production and characterization of *S. suis* serotype 2 mutants deficient in the expression of the polysaccharide capsule obtained using the self-conjugative transposon Tn*916*.

METHODS

Bacterial strains and culture conditions. The well-encapsulated *S. suis* serotype 2 reference strain S735 (kindly provided by Dr J. Henrichsen, Statens SerumInstitut, Copenhagen, Denmark) was used as the recipient strain for transposon mutagenesis. This strain, which is susceptible to both tetracycline and streptomycin, was rendered resistant to the latter by serial passages in Todd–Hewitt broth (THB; Difco) containing increasing streptomycin concentrations and was named S735-SM. *Enterococcus faecalis* CG110 (kindly supplied by Dr C. E. Rubens, Children's Hospital and Medical Center, Seattle, WA, USA), which contains Tn*916*, a 18 kb transposon encoding tetracycline resistance (Gawron-Burke & Clewell, 1984), was used as the donor strain and grown in THB containing 10 μg tetracycline ml^{-1}. *Escherichia coli* CG120 (kindly provided by Dr D. B. Clewell, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA), possessing plasmid pAM120 encoding ampicillin resistance and containing Tn*916* (Gawron-Burke & Clewell, 1984), was grown in THB with 10 μg tetracycline and 50 μg ampicillin ml^{-1}, and was used for probe preparation.

Transposon mutagenesis. Plate mating between the two strains was done by the method of Caparon & Scott (1991) with the ratio of donor to recipient changed to 1:100. Briefly, *Enterococcus faecalis* CG110, in 5 ml THB containing 10 μg tetracycline ml^{-1}, and *S. suis* S735-SM, in 100 ml THB supplemented with 2 g yeast extract l^{-1}, were grown overnight at 37 °C. Both suspensions were centrifuged, washed three times, resuspended in THB and strain S735-SM mixed with CG110. Spots of the mixed suspension were plated onto bovine blood agar plates and left to incubate overnight at 37 °C. Growth was retrieved by washing the plates with PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1·5 mM KH_2PO_4, pH 7·4). The suspension was centrifuged, resuspended in PBS and plated onto Todd–Hewitt agar (THA) plates containing 800 μg streptomycin ml^{-1} and 10 μg tetracycline ml^{-1}. Plates were incubated for 24–36 h at 37 °C and transconjugants transferred on new selective plates. Conjugation frequency was calculated by dividing the number of Tn*916*-containing colonies resistant to both streptomycin and tetracycline by the total number of potential recipient colonies resistant only to streptomycin.

Screening of transconjugants. Screening was done by colony dot of transconjugants as described by Rioux *et al.* (1997) using a monoclonal antibody, mAb Z3, specific for a serotype 2 sialic-acid-containing capsular epitope (Charland *et al.*, 1997). Failure of colonies to react with mAb Z3 could be due either to the absence of sialic acid or to the absence of all capsular polysaccharides.

Preparation of digoxigenin-labelled Tn*916* probe and DNA–DNA hybridization. Total cellular DNA was first isolated by the method of Sambrook *et al.* (1989). To perform Southern blot DNA–DNA hybridization analysis (Nizet *et al.*, 1996), a Tn*916* probe labelled with digoxigenin (DIG) was prepared using the Boehringer Mannheim DIG DNA labelling and detection kit. The *Eco*RI fragment of plasmid pAM120 containing Tn*916* was isolated from low-melting-point agarose as described by Sambrook *et al.* (1989). The DIG-labelled Tn*916* was used to probe *Eco*RI and *Sca*I digests of whole-cell DNA as described by the manufacturer.

Characterization of mutants

Biochemical identification of mutants. Mutants were confirmed biochemically to be *S. suis* by standard identification techniques (Higgins & Gottschalk, 1990).

Production of haemolysin, MRP and EF. Production of haemolysin was tested as described previously (Gottschalk *et al.*, 1995). Production of MRP and EF was tested as described by Vecht *et al.* (1991).

Sialic acid determination tests. An agglutination test with a sialic-acid-binding lectin from *Sambucus nigra*, SNA I, known to react with the sialic acid moiety of *S. suis* serotype 2 capsule (Charland *et al.*, 1995), was used as a screening test to identify capsule deficient mutants. Presence of N-acetylneuraminic acid (NANA) was shown by coarse aggregates. Absence of NANA was confirmed by the thiobarbituric acid assay (Warren, 1963).

Serotyping of mutants. Serotyping was carried out by three different techniques. Coagglutination, capillary precipitation and capsular reaction tests utilized specific type 2 antiserum as previously described (Higgins & Gottschalk, 1990).

Transmission electron microscopy. Transmission electron microscopy after immunostabilization was carried out as described by Jacques *et al.* (1990). Briefly, wild-type as well as mutant strains were mixed with specific type 2 antiserum or with normal serum as a negative control. Bacterial suspensions were adjusted to OD_{540} 1·8 and exposed to undiluted polyclonal or normal sera for 1 h at 4 °C. Bacterial cells were then suspended in 0·1 M cacodylate buffer, pH 7·0, containing 5% (v/v) glutaraldehyde and 0·15% (w/v) ruthenium red. Fixation was for 2 h at 20 °C. Cells were then immobilized in 4% (w/v) agar, washed five times in cacodylate buffer plus 0·05% ruthenium red, and postfixed with 2% (v/v) osmium tetroxide for 2 h. Samples were washed as above and dehydrated in a graded series of acetone washes containing 0·05% ruthenium red. Specimens were then washed twice in propylene oxide and embedded in Spurr low-viscosity resin. Thin sections were poststained with uranyl acetate and lead citrate and examined with an electron microscope (Philips 201) at an accelerating voltage of 60 kV.

Hydrophobicity test. Hydrophobicity was measured using the n-hexadecane method (Rosenberg, 1984).

Phagocytic assays. Phagocytic cells were retrieved from the peritoneal cavity of mice or from pig blood and left to adhere on microscope slides as described by Brazeau *et al.* (1996) and Charland *et al.* (1996). Bacteria were added to a ratio of 10 bacteria to 1 phagocyte and incubated for 1 h at 37 °C, 5% CO_2. After incubation, cells were stained with the vital dye acridine orange and counterstained with crystal violet, so that only engulfed bacteria were visible under UV light (Williams, 1990). The assay was repeated in three independent experiments. Percentages of phagocytosis were calculated as: (no. of phagocytes with engulfed bacteria divided by 200 examined phagocytes) × 100 (Charland *et al.*, 1996).

Virulence assays. Virulence was assessed in mice and piglets. To measure the LD_{50} in mice, bacteria were grown for 6 h in THB supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS). For each strain, five groups of five BALB/c mice 4–6 weeks old were injected intraperitoneally with 1 ml per mouse of undiluted bacterial suspension or tenfold dilutions in THB-FBS of the original suspension. Mortality was monitored over a week and the LD_{50} of each strain calculated by the method of Reed & Muench (1938). An experimental infection in swine was also carried out. Three groups of seven specific-pathogen-free (SPF) piglets 6–7 weeks old, naturally born from hysterectomy-derived sows, were used (one group per strain) and kept in high-security barns. Bacteria were grown in THB-FBS for 5 h at 37 °C and the OD_{600} of the suspension adjusted to 0·15, which corresponds to about 10^8 c.f.u. ml^{-1}. Piglets were injected intravenously with 1 ml of the suspension. Clinical signs were monitored daily and pigs were killed either if severely sick or, if they presented no signs, one week after infection. Autopsies were performed on each piglet with macroscopic, bacteriological and/or histological examinations of affected tissues.

Bacterial clearance test. Bacteria were grown as for the virulence assay except that suspensions were adjusted to a concentration of 3×10^6 c.f.u. ml^{-1} in THB-FBS to prevent mortality. Groups of seven mice were injected intraperitoneally with 1 ml bacterial suspension. Mice were killed by cervical dislocation at various time intervals after injection, blood samples taken from hearts and viable counts performed on blood agar plates. The assay was repeated in three independent experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of mutants deficient in capsular expression

Tn*916* was transferred from *Enterococcus faecalis* CG110 to S735-SM at a frequency of 1 per $1{\cdot}5 \times 10^6$ recipient cells, which is in the range of conjugation frequency obtained with *Streptococcus pyogenes* (Caparon & Scott, 1987). More than 8000 clones were screened and, of these, seven mutants did not present any reaction with mAb Z3.

After preliminary testing of these clones based on the number of transposon insertions and capsule production, two mutants, named 2A and 79, were selected for further characterization. Both mutants were shown to be biochemically identical to the wild-type strain. In addition, the production of other putative virulence factors of *S. suis* such as haemolysin, MRP and EF was not affected by transposition (Table 1). Since mAb Z3 is specific for a sialic-acid-containing epitope, mutants were tested for the presence of NANA. Fine aggregates were seen in the reaction between both mutants and the lectin SNA I compared to coarse ones with the wild-type strain. In addition, NANA concentration was shown to be very low in both mutants (Table 1). Serotyping, which is indicative of the presence of a capsule, was carried out by three different techniques. Mutants reacted only weakly by coagglutination with specific type 2 antiserum compared to the wild-type strain S735-SM, indicating little capsule expression or reaction with other surface antigens. Capillary precipitation and capsular reaction tests, which are more specific for the detection of capsular antigens, were negative for both mutants (Table 1).

To confirm the absence or altered expression of capsule on mutants, both of the mutants and the wild-type strain were examined by transmission electron microscopy. No or very little capsular material seemed to be present on cell surfaces of mutants 2A (Fig. 1c) and 79 (not shown) after immunostabilization of the capsule. The absence of sialic acid implies the probable absence of the complete capsule since it has been suggested that, after complete removal of the sialic acid moiety, a reaction with anti-type 2 serum is not detected (Katsumi *et al.*, 1996). This would also correlate with the absence of immunostabilization. Katsumi *et al.* (1996) mentioned that the sialic acid residue in the capsule of *S. suis* serotype 2 is probably the exact epitope component.

Molecular characterization of mutants

To determine the number of Tn*916* insertions in each mutant, total DNA was extracted and cut with *Eco*RI and *Sca*I. *Eco*RI does not cut within Tn*916* whereas *Sca*I cuts only once (Flannagan *et al.*, 1994). Southern blot DNA–DNA hybridization analysis, using DIG-labelled Tn*916* to probe *Eco*RI and *Sca*I chromosomal digests of mutants, shows that mutant 2A contained one (Fig. 2 lanes B and C) and mutant 79 two (lanes D and E) Tn*916* insertions. No background hybridization was seen between wild-type DNA and the probe (Fig. 2, lane A). DNA adjacent to these insertions, after digestion with *Sca*I, was of 11·6 kb for mutant 2A, and of 11·6 and 12·7 kb for mutant 79. As shown in Fig. 2, although mutant 79 seemed to have only one Tn*916* insertion after digestion with *Eco*RI, *Sca*I digestion showed another transposon insertion. It seems that only one transposon insertion is sufficient to alter capsular expression as seen for group B streptococci (Rubens *et al.*, 1993, 1987).

Influence of defective capsular expression on hydrophobicity and phagocytosis

It has been shown that alteration of capsular expression can modify surface hydrophobicity and affect adherence on cells (Absolom, 1988). Influence of altered capsular expression on hydrophobicity and phagocytosis was tested (Table 1). Mutants 2A and 79 demonstrated

Table 1. **Characterization of two *S. suis* serotype 2 mutants produced by transposition from reference strain S735-SM**

For agglutination experiments, the capsular reaction test and the capillary precipitation test, the strength of the reaction is indicated as follows: + + +, strong reaction; +, weak reaction; −, no reaction. For phagocytosis experiments, pig monocyte-derived macrophages were used. Data for NANA concentration, hydrophobicity and phagocytosis are the means of three independent experiments ± SD; results for the mutant strains were significantly different ($P < 0.05$) compared to the wild-type strain.

Test	S735-SM	2A	79
MRP protein	Yes	Yes	Yes
EF protein	Yes	Yes	Yes
Haemolysin	Yes	Yes	Yes
SNA I agglutination	+ + +	+	+
NANA concentration	4.07 ± 1.42 μg mg^{-1}	0.11 ± 0.04 μg mg^{-1}	0.10 ± 0.03 μg mg^{-1}
Coagglutination test	+ + +	+	+
Capsular reaction test	+ + +	−	−
Capillary precipitation test	+ + +	−	−
Hydrophobicity	0.9 ± 0.4 %	22.0 ± 0.9 %	17.7 ± 0.8 %
Phagocytosis	23 ± 9 %	70 ± 8 %	70 ± 4 %
LD_{50}	7×10^5 c.f.u. g^{-1}	$> 7 \times 10^7$ c.f.u. g^{-1}	$> 7 \times 10^7$ c.f.u. g^{-1}

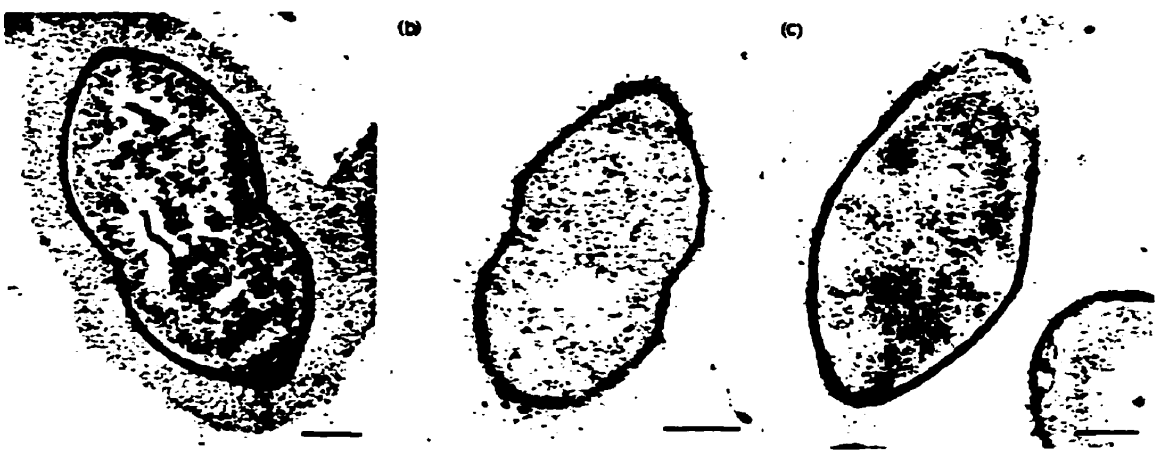


Fig. 1. **Transmission electron micrographs of thin sections of *Streptococcus suis* serotype 2: (a) strain S735-SM stabilized with specific type 2 rabbit polyclonal antiserum, (b) strain S735-SM stabilized with normal rabbit serum (negative control) and (c) mutant 2A stabilized with type 2 rabbit polyclonal antiserum. Results similar to (c) were obtained with mutant 79, and results similar to (b) with both mutants. Bars, 200 nm.**

hydrophobicity at 22% and 17.7% respectively, compared to 0.9% for S735-SM, indicating that capsular polysaccharides are important to surface hydrophobicity of *S. suis* (Salasia *et al.*, 1995). Percentages of phagocytosis by murine macrophages and porcine monocyte-derived macrophages were evaluated for the three strains. These phagocytic cells were chosen to provide a comparison of phagocytosis rates between the natural host's phagocytes and phagocytes from the animal model of choice for *S. suis* infections (Beaudoin *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1988). Table 1 shows that both mutants were significantly more phagocytosed than the wild-type strain by porcine phagocytic cells, with a mean number of 6 (S735-SM), 16 (mutant 2A) and 18 (mutant 79) phagocytosed organisms per phagocyte. Similar results were obtained with murine cells (data not shown). These results show that the presence of capsular polysaccharides prevents phagocytosis, which may help bacterial pathogenesis. Since capsular polysaccharide material confers a net negative charge on a bacterium, it is rendered hydrophilic (Moxon & Kroll, 1990). Removal of capsular material increases the hydrophobic index, thereby increasing adherence and phagocytosis (Absolom, 1988). This seems to be the case for *S. suis*

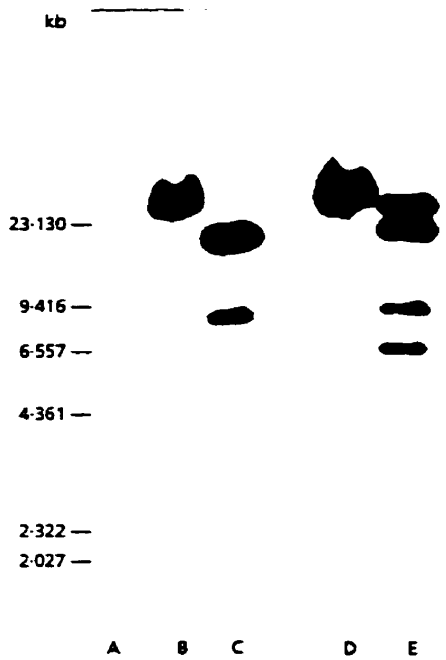


Fig. 2. Southern blot with DIG-labelled Tn*916* of total cellular DNA. Lane A, DNA of strain S735-SM digested with *Eco*RI; lanes B and C, DNA of mutant 2A digested with *Eco*RI (lane B) and *Sca*I (lane C); lanes D and E, DNA of mutant 79 digested with *Eco*RI (lane D) and *Sca*I (lane E). Molecular sizes of standards in kb are indicated. Image generated using a HP ScanJet IIc with PhotoFinish 2.0 software on a PC 486 DX.

unencapsulated mutants. In addition, Tikkanen *et al.* (1996) recently showed that the variable agglutinating activity of some *S. suis* strains was inversely proportional to the amount of capsular polysaccharides, which the authors suggest could mask adhesins.

Influence of defective capsular expression on virulence and blood clearance

Both mutants were more than 100-fold less virulent for mice than the wild-type strain as shown by their LD_{50} of more than 7×10^7 c.f.u. g^{-1}, compared to 7×10^5 c.f.u. g^{-1} for S735-SM (Table 1). For pig infection, Table 2 shows that all piglets injected with S735-SM presented with hyperthermy (i.e. at least 1 °C over the normal body temperature of 39·5 °C for an SPF pig) and locomotive difficulties for at least 3 d post-infection. Forty-eight hours after injection, three piglets showing opisthotonos and paddling signs with elevated temperature were killed. These pigs showed suppurative meningitis at autopsy. *S. suis* serotype 2 was recovered from brains and/or from other organs of all seven pigs. Histological examinations of synovial membranes of some pigs showed an early inflammatory reaction. Piglets injected with both mutants showed no clinical signs. Animals of these groups were killed one week after infection. Autopsies did not reveal significant macroscopic or microscopic lesions. *S. suis* serotype 2 was isolated only from the synovial fluid of a knee in a pig injected with mutant 79. The isolate was still tetracycline-resistant. No bacterium was isolated in any tonsils of these two groups. Isolation of the wild-type strain from many different organs of all infected pigs shows that the presence of capsular polysaccharides may help bacteria to disseminate and survive more easily. In fact, S735-SM could be isolated from its natural reservoir in pigs, the tonsils (Higgins & Gottschalk, 1998), in all animals, whereas mutants could not be recovered from this site. Thus, the presence of capsular polysaccharides contributes to the virulence of *S. suis* serotype 2 in both mice and pigs.

Table 2. Experimental infection of SPF piglets with *S. suis* serotype 2 reference strain S735-SM and two serotype 2 mutants produced by transposition from strain S735-SM

Strain	Dose [10^{-6} × (c.f.u. ml^{-1}) ± SD]	Clinical signs	Lesions	Isolation
S735-SM	5·3 ± 1·2	Fever, locomotive difficulties*	Suppurative meningitis, early inflammatory reaction of synovial membranes†	7/7‡
Mutant 2A	5·7 ± 1·3	None	None	0/7
Mutant 79	3·6 ± 1·4	None	None	1/7§

* All seven pigs of the group were affected.

† Three pigs with severe locomotive difficulties and paddling signs showed meningitis; two other pigs shows inflammation.

‡ Strain isolated from liver, spleen, lungs, heart, tonsils, brains and/or joints from all seven infected pigs.

§ Isolated in synovial fuid from a knee of one pig.

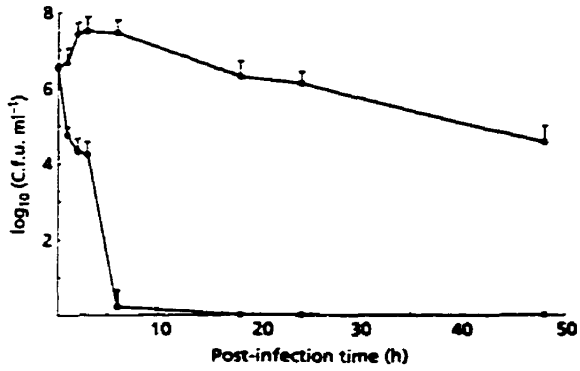


Fig. 3. Bacterial clearance in mice injected with *S. suis* serotype 2 strain 5735-SM (○) and acapsular mutant 2A (●). The data are means of three experiments; error bars represent SD.

Bacterial clearance of the wild-type strain and mutant 2A was tested in mice. Fig. 3 shows that the mutant is cleared rapidly from circulation compared to the wild-type strain. These results support those obtained from the virulence experiments where the mutants were reisolated unfrequently. In addition, clearance results are in agreement with those obtained by Clifton-Hadley (1981) who showed that a less encapsulated variant of a *S. suis* type 2 strain was readily cleared from pig blood.

Capsules have been shown to have a key role in host–pathogen interactions (Moxon & Kroll, 1990). Unencapsulated mutants of bacteria involved in invasive infections, such as group A and B streptococci (Wessels *et al.*, 1991; Rubens *et al.*, 1987) or *Escherichia coli* K-1 (Kim *et al.*, 1992), have demonstrated the critical role of the capsule in virulence. One means by which a bacterium disseminates through a host is by evading the immune system (Moxon & Kroll, 1990) and many encapsulated bacteria have been shown to possess antiphagocytic properties (Dale *et al.*, 1996; Kasper, 1986; Martin *et al.*, 1992). Previous studies with spontaneous, genetically uncharacterized *S. suis* serotype 2 mutants suggested that loss or alteration of capsule expression could influence the fate of the bacterium in a host (Brazeau *et al.*, 1996; Gottschalk *et al.*, 1992). Results reported here show that isogenic mutants with specific mutations which preclude capsular expression are avirulent and cleared rapidly from circulation compared to the wild-type strain, clarifying the ambiguous role of the capsule in the virulence of *S. suis* for both mice and pigs. To our knowledge, the capsule of *S. suis* serotype 2 is the first critical virulence factor described so far for this bacterium.

It is clear, however, that the capsule of *S. suis* serotype 2 cannot be the only factor for virulence since it is known that serotype 2 avirulent field strains are encapsulated (Beaudoin *et al.*, 1992; Quessy *et al.*, 1995). In fact, a monoclonal antibody against a capsular epitope of *S. suis* serotype 2 reference strain could not protect mice completely from a lethal dose of bacteria (Charland *et al.*, 1997). Other factors, such as extracellular or cell-wall-associated proteins, are probably required for successful establishment of the bacteria in the host. The role of the capsule may be, for example, to protect *S. suis* from phagocytosis while it produces its toxic components.

Concluding remarks

Isogenic mutants of *S. suis* serotype 2 deficient in capsule expression were produced by transposon mutagenesis. These mutants were more hydrophobic and more susceptible to phagocytosis by mouse and pig phagocytes than the wild-type strain. In addition, they were avirulent for both mice and piglets in challenge experiments and cleared from circulation rapidly. Characterization of the insertion site is currently in progress.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr J. Henrichsen for confirmation of the capsular reaction test and to Dr M. Jacques for the transmission electron micrographs. We also wish to thank S. Lacouture, B. Chevallier, A. Mesplède, A. Keranflec'h, R. Cariolet and the Laboratoire Départemental d'Analyses of Ploufragan for excellent technical assistance and Dr C. E. Rubens for interesting discussions. This work was supported by Grant 0GP0154280 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Grant 98-NC-1037 from the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche. N.C. is the recipient of an NSERC scholarship.

REFERENCES

Absolom, R. (1988). The role of bacterial hydrophobicity in infection: bacterial adhesion and phagocytic ingestion. *Can J Microbiol* **34**, 287–298.

Arends, J. P. & Zanen, H. (1988). Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis* **10**, 131–137.

Beaudoin, M., Higgins, R., Harel, J. & Gottschalk, M. (1992). Studies on a murine model for evaluation of virulence of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates. *FEMS Microbiol Lett* **78**, 111–116.

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

Caparon, M. G. & Scott, J. R. (1987). Identification of a gene that regulates expression of M protein, the major virulence determinant of group A streptococci. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 8677–86.

Caparon, M. G. & Scott, J. R. (1991). Genetic manipulation of pathogenic streptococci. *Methods Enzymol* **204**, 556–586.

Charland, N., Kellens, J. T. C., Caya, F. & Gottschalk, M. (1995). Agglutination of *Streptococcus suis* by sialic acid-binding lectins. *J Clin Microbiol* **33**, 2220–2221.

Charland, N., Kobisch, M., Martineau-Doizé, B., Jacques, M. &

Gottschalk, M. (1996). Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* **14**, 195–203.

Charland, N., Jacques, M., Lacouture, S. & Gottschalk, M. (1997). Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 1/2. *Microbiology* **143**, 3607–3614.

Clifton-Hadley, F. A. (1981). *Studies of Streptococcus suis type 2 infection in pigs*. PhD thesis, University of Cambridge.

Dale, J. B., Washburn, R. G., Marques, M. B. & Wessels, M. R. (1996). Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect Immun* **64**, 1495–1501.

Elliott, S. D. & Tai, J. (1978). The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. *J Exp Med* **148**, 1699–1704.

Elliott, S. D., Clifton-Hadley, F. A. & Tai, J. (1980). Streptococcal infection in young pigs. V. An immunogenic polysaccharide from *Streptococcus suis* type 2 with particular reference to vaccination against streptococcal meningitis in pigs. *J Hyg* **85**, 275–285.

Flannagan, S. E., Zitzow, L. A., Su, Y. A. & Clewell, D. B. (1994). Nucleotide sequence of the 18-kb conjugative transposon Tn*916* from *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* **32**, 350–354.

Gawron-Burke, C. & Clewell, D. B. (1984). Regeneration of insertionally inactivated streptococcal DNA fragments after excision of transposon Tn*916* in *Escherichia coli*: strategy for targeting and cloning of genes from Gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **159**, 214–221.

Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M. & Dubreuil, D. (1992). Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. *Vet Microbiol* **30**, 59–71.

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

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

Higgins, R. & Gottschalk, M. (1990). An update on *Streptococcus suis* identification. *J Vet Diagn Invest* **2**, 249–252.

Higgins, R. & Gottschalk, M. (1996). Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1995. *Can Vet J* **37**, 242.

Higgins, R. & Gottschalk, M. (1998). Streptococcal diseases. In *Diseases of Swine*, chapter 38. Iowa: Iowa State University Press (in press).

Jacobs, A. A. C., Loeffen, P. L. W., Van Den Berg, A. J. G. & Storm, P. K. (1994). Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* **62**, 1742–1748.

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

Kasper, D. L. (1986). Bacterial capsule – old dogmas and new tricks. *J Infect Dis* **153**, 407–415.

Katsumi, M., Saito, T., Katsoka, Y., Itoh, T., Kikuchi, N. & Hiramune, T. (1996). Comparative preparation methods of sialylated capsule antigen from *Streptococcus suis* type 2 with type specific antigenicity. *J Vet Med Sci* **58**, 947–952.

Kim, K. S., Itabashi, H., Gemski, P., Sadoff, J., Warren, R. L. & Cross, A. S. (1992). The K1 capsule is the critical determinant in the development of *Escherichia coli* meningitis in the rat. *J Clin Invest* **90**, 897–905.

Martin, T. R., Ruzinski, J. T., Rubens, C. E., Chi, E. Y. & Wilson, C. B. (1992). The effect of type-specific polysaccharide capsule on the clearance of group B streptococci from the lungs of infant and adult rats. *J Infect Dis* **165**, 306–314.

Moxon, E. R. & Kroll, J. S. (1990). The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. *Curr Top Microbiol Immunol* **150**, 65–85.

Nizet, V., Gibson, R. L., Chi, E. Y., Framson, P. E., Hulse, M. & Rubens, C. E. (1996). Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect Immun* **64**, 3818–3826.

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

Reed, L. J. & Muench, H. (1938). A simple method of estimating the fifty percent endpoints. *Am J Hyg* **27**, 493–497.

Rioux, S., Bégin, C., Dubreuil, J. D. & Jacques, M. (1997). Isolation and characterization of LPS mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Curr Microbiol* **35**, 139–144.

Rosenberg, M. (1984). Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett* **22**, 289–295.

Rubens, C. E., Wessels, M. R., Heggen, L. M. & Kasper, D. L. (1987). Transposon mutagenesis of type III group B *Streptococcus*: correlation of capsule expression with virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 7208–7212.

Rubens, C. E., Heggen, L. M., Haft, R. F. & Wessels, M. R. (1993). Identification of *cpsD*, a gene essential for type III capsule expression in group B streptococci. *Mol Microbiol* **8**, 843–855.

Salasia, S. I. O., Lämmler, C. & Herrmann, G. (1995). Properties of a *Streptococcus suis* isolate of serotype 2 and two capsular mutants. *Vet Microbiol* **45**, 151–156.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Smith, H. E., Vecht, U., Wisselink, H. J., Stockhofe-Zurwieden, N., Biermann, Y. & Smits, M. A. (1996). Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs. *Infect Immun* **64**, 4409–4412.

Tikkanen, K., Haataja, S. & Finne, J. (1996). The galactosyl-(α1–4)-galactose-binding adhesin of *Streptococcus suis*: occurrence in strains of different hemagglutination activities and induction of opsonic antibodies. *Infect Immun* **64**, 3659–3665.

Trottier, S., Higgins, R., Brochu, G. & Gottschalk, M. (1991). A case of human endocarditis due to *Streptococcus suis* in North America. *Rev Infect Dis* **13**, 1251–1252.

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

Walsh, B., Williams, A. E. & Satsangi, J. (1992). *Streptococcus suis* type 2: pathogenesis and clinical disease. *Rev Med Microbiol* **3**, 65–71.

Warren, L. (1963). Thiobarbituric acid assay of sialic acids. *Methods Enzymol* **6**, 463–464.

Wessels, M. R., Moses, A. E., Goldberg, J. B. & DiCesare, T. J. (1991). Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 8317–8321.

Williams, A. E. (1990). Relationship between intracellular survival

in macrophages and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 isolates. *Microb Pathog* 8, 189–196.

Williams, A. E., Blakemore, W. F. & Alexander, T. J. (1988). A murine model of *Streptococcus suis* type 2 meningitis in the pig. *Res Vet Sci* 45, 394–399.

Received 17 June 1997; revised 29 September 1997; accepted 1 October 1997.

Article IV

Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 1/2

N. Charland, M. Jacques, S. Lacouture et M. Gottschalk

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

Microbiology (1997) **143**: 3607-3614

Microbiology (1997), 143, 3607–3614 Printed in Great Britain

Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 1/2

Nathalie Charland, Mario Jacques, Sonia Lacouture and Marcelo Gottschalk

Author for correspondence: Marcelo Gottschalk. Tel: +1 514 773 8521 ext. 8374. Fax: +1 514 778 8108. e-mail: gottschm@ere.umontreal.ca

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000 St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

A monoclonal antibody (mAb Z3) was produced using BALB/c mice immunized with whole cells of *Streptococcus suis* serotype 2 reference strain S735. Screening by dot-ELISA showed that mAb Z3, of isotype IgG2b, reacted only with reference strains and field isolates of *S. suis* serotypes 1, 2 and 1/2. The recognized epitope was demonstrated to be polysaccharide in nature by periodate oxidation, and located in the capsule, since mAb Z3 reacted with purified capsular material by immunoblotting and was able to stabilize the capsule as shown by electron microscopy. Further characterization indicated that mAb Z3 may react specifically with the sialic acid moiety of the capsule, a common constituent of the polysaccharidic capsular material of the three capsular types, since sialidase-treated cells did not react with mAb Z3 in immunoblotting or indirect ELISA. Purified mAb Z3 was shown to significantly increase the rate of phagocytosis of *S. suis* cells by porcine monocytes and to activate the clearance of bacteria from the circulation in experimentally infected mice. However, mAb Z3 only offered partial protection to mice challenged with a minimal lethal dose. Thus, even though the capsule of *S. suis* seems to be an important virulence factor, the epitope recognized by mAb Z3 does not appear to be involved in complete protection against infection.

Keywords: *Streptococcus suis*, capsule, monoclonal antibody, protection, clearance

INTRODUCTION

Streptococcus suis is a worldwide cause of meningitis, arthritis, endocarditis and septicaemia in swine (Higgins *et al.*, 1992). It is also recognized as an important human pathogen (Arends & Zanen, 1988). Of the 35 serotypes of *S. suis*, serotype 2 is the most prevalent in diseased animals (Higgins *et al.*, 1992). The pathogenesis of the different types of infections due to this bacterium is still unclear. Of the many cell components and toxic products of *S. suis* that have been suggested as virulence factors (Gottschalk *et al.*, 1995; Jacques *et al.*, 1990; Vecht *et al.*, 1989) the polysaccharide capsule appears to be one of the most important (Brazeau *et al.*, 1996; Elliott & Tai, 1978; Gottschalk *et al.*, 1992). Although the capsular material possesses antiphagocytic properties (Brazeau *et al.*, 1996), it has been demonstrated that both virulent and avirulent encapsulated strains belonging to serotype 2 are ingested by phagocytes in the absence of complement and specific antibodies (Brazeau *et al.*, 1996; Williams, 1990). Serotype 2 capsular material contains sialic acid, an important virulence attribute for some other bacteria (Smith, 1993; Wessels *et al.*, 1989). However, *S. suis* sialic acid did not appear as a critical virulence factor (Charland *et al.*, 1996).

Monoclonal antibodies (mAbs) are useful tools for the study of bacterial virulence factors. For bacteria such as group B streptococci, *Neisseria meningitidis* and *Escherichia coli*, mAbs against their capsular material have been shown to induce good protection (Cross *et al.*, 1983; Egan *et al.*, 1983; Hurpin *et al.*, 1992). The aim of this paper is to report the production, characterization and evaluation of the protective activity of a murine mAb that reacts specifically with the capsular polysaccharides of *S. suis* serotype 2.

Abbreviations: i.p., intraperitoneal(ly); SNA, *Sambus nigra* agglutinin.

0002-1804 © 1997 SGM

METHODS

Bacterial strains and culture conditions. The *S. suis* serotype 2 reference strain S735 was kindly provided by Dr J. Henrichsen (Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark). The remaining 34 serotype reference strains came from our collection. A total of 484 *S. suis* field isolates were kindly provided by Dr R. Higgins (Clinical Bacteriology Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal). Of these, 15, 67 and 142 isolates belonged to serotypes 1, 1/2 and 2, respectively. Other isolates represented the remaining 32 serotypes. These isolates had previously been serotyped by standard techniques (Higgins & Gottschalk, 1990). Culture methods and media have been described previously (Charland *et al.*, 1996).

Monoclonal antibody production. BALB/c mice were injected i.p. at 2-week intervals with a 0·3% formalinized whole-cell S735-Quil A saponin suspension (25 μg per mouse; Superfos Biosector, DK-Vedbaek, Denmark). A total of five injections was required to obtain a high titre of antibodies in an indirect ELISA using whole-cell antigen (Del Campo Sepulveda *et al.*, 1996). Three days after the booster inoculation, mice were serologically tested with the indirect ELISA and the spleen of the mouse showing the highest reaction was recovered and fused with myeloma cell line SP2/0 using 50% (w/v) PEG 1500 (Sigma) as a fusogen (Köhler & Milstein, 1975). Hybridoma supernatants were screened for the presence of *S. suis* type 2 antibodies using the indirect ELISA (Del Campo Sepulveda *et al.*, 1996). Positive hybridomas were then tested with the same method, but with purified capsular polysaccharide material as an antigen (Del Campo Sepulveda *et al.*, 1996). When positive, they were cloned by the limiting dilution method (Kamata *et al.*, 1985). The immunoglobulin class of mAb was determined using the Sigma ImmunoType Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit. Ascitic fluid was produced by i.p. injection of BALB/c mice primed with pristane with hybridomas.

ELISA tests. A dot-ELISA was performed with bacteria grown overnight on bovine blood agar plates at 37 °C and from which single colonies were used as inocula for Todd–Hewitt broth (THB, Difco). Suspensions of each isolate adjusted to an OD_{540} of 1·0 were dotted on a nitrocellulose membrane and the dot-ELISA was carried out as described by Bélanger *et al.* (1992). An ELISA-competition test with a sialic-acid-binding lectin from *Sambucus nigra*, SNA I, which is known to react with the sialic acid moiety of *S. suis* type 2 capsule (Charland *et al.*, 1995), was also carried out. Ascitic fluid, produced with clone Z3, diluted to yield an A_{414} of approximately 1·0 in indirect ELISA was mixed with increasing amounts of SNA I and the solutions added to purified capsular material coated to microplates and reactions revealed as described by Del Campo Sepulveda *et al.* (1996). In addition, an inhibition-ELISA was performed. Ascitic fluid, prepared as described above, was mixed with untreated, or with sialidase-, periodate- or proteinase K- (500 μg proteinase K ml^{-1}, 55 °C, 1 h; Sigma) treated whole-cell antigen of type 2 reference strain S735, whole-cell antigens of types 1 or 1/2 reference strains or purified sialic acid (Sigma), respectively. Suspensions were incubated at room temperature for 15 min, centrifuged and supernatants added to purified capsular material coated to microplates. The percentage inhibition was calculated using the formula $100(1-A/B)$, where A and B are A_{414} in the presence and absence of inhibitor, respectively.

PAGE and immunoblotting analysis. PAGE (8%, w/v, separating gel) and blotting on PVDF-N membrane (Millipore) of untreated or periodate-treated ($NaIO_4$, 20 mM, 25 °C, 1 h) purified capsular material of *S. suis* type 2 were performed using an improved technique for carbohydrates as described by Tikkanen *et al.* (1995). SDS-PAGE (8% separating gel) and blotting on a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) of untreated or sialidase-treated (0·6 U sialidase from *Clostridium perfringens* ml^{-1} acetate buffer, pH 5·5, 37 °C, 3 h, Boehringer Mannheim) whole-cell antigen of *S. suis* serotype 2 were performed as described by Radacovici *et al.* (1992). Monoclonal antibody Z3 reaction on both blots was revealed as described by Radacovici *et al.* (1992).

Sialic acid determination. Sialic acid concentrations were determined using the Warren–Aminoff method (Warren, 1963).

Transmission electron microscopy. Transmission electron microscopy after immunostabilization with mAb Z3 was carried out as previously described (Jacques *et al.*, 1990). Bacterial suspensions were adjusted to OD_{540} 1·8 and exposed to ascitic fluid diluted 1:1 for 1 h at 4 °C. Bacterial cells were then suspended in 0·1 M cacodylate buffer, pH 7·0, containing 5% (v/v) glutaraldehyde and 0·15% ruthenium red. Fixation was for 2 h at 20 °C. Cells were then immobilized in 4% (w/v) agar, washed five times in cacodylate buffer containing 0·05% ruthenium red, and postfixed with 2% osmium tetroxide for 2 h. Samples were washed as above and dehydrated in a graded series of acetone washes containing 0·05% ruthenium red. Specimens were then washed twice in propylene oxide and embedded in Spurr low-viscosity resin. Thin sections were poststained with uranyl acetate and lead citrate and examined with an electron microscope (Philips 201) at an accelerating voltage of 60 kV.

Opsonization and phagocytic assay. Immunoglobulins were first purified by chromatography on a protein G–Sepharose column (Pharmacia), with 3 M NaCl, 1·5 M glycine, pH 8·9, as binding buffer, and 0·1 M citric acid, pH 4·0, as elution buffer. Purified IgG was then dialysed against 0·1× PBS (14 mM NaCl, 0·3 mM KCl, 1 mM Na_2HPO_4, 0·15 mM KH_2PO_4, pH 7·4) overnight and lyophilized. Immunoglobulin concentration was determined by the method of Markwell *et al.* (1978). The opsonizing capacity of mAb Z3 was determined using a porcine blood monocytes phagocytic assay (Charland *et al.*, 1996). Strain S735 was opsonized with heat-inactivated porcine serum (to prevent opsonization by complement; negative control), with 80 μg purified mAb Z3 or with polyclonal anti-type 2 rabbit serum as a positive control. Phagocytosis was left to proceed for 3 h at 37 °C, 5% CO_2. Cells were then stained with the vital dye acridine orange, counterstained with crystal violet to quench monocyte external fluorescence, and percentage phagocytosis was measured under UV light. The assay was repeated in three independent experiments.

Protection assay. The protective capacity of mAb Z3 was tested in a standardized mouse model of infection (Beaudoin *et al.*, 1992). The test was repeated in three independent experiments. Strain S735 grown for 6 h in THB containing 10% foetal bovine serum (FBS) was adjusted to a concentration of 10^8 c.f.u. ml^{-1} in THB-FBS, which represents the minimal lethal dose to kill all control mice (Kebede *et al.*, 1990). Bacterial suspensions were mixed with 0·8 mg of purified mAb Z3 ml^{-1} and 1 ml per mouse was injected intraperitoneally into a group of 15 BALB/c mice, so that mice received the equivalent of 40 mg mAb Z3 kg^{-1}. Another group of 15 mice received only the bacterial suspension as a negative control whereas the final group received bacteria mixed with a polyclonal anti-type 2 rabbit serum diluted as already described (Gottschalk *et al.*, 1992) as a positive control. When

a dose of 10^7 c.f.u. ml^{-1} was used as a challenge, one group of mice received isotype-matched, non-specific monoclonal antibody 5.1 G8 F10 as a negative control, a mAb that reacts with *Actinobacillus pleuropneumoniae* type 1 lipopolysaccharides (Lairini *et al.*, 1995). Mortality and clinical signs were then monitored twice a day for a week.

Bacterial clearance test. A bacterial clearance test was performed with mAb Z3 and repeated in two independent experiments. Bacteria were grown in THB-FBS as above and the concentration adjusted to 3×10^6 c.f.u. ml^{-1} to keep all mice alive and slightly affected by infection. One group of six mice was injected i.p. with 1 ml S735 suspension, another group with S735 mixed with mAb Z3 (40 mg kg^{-1}) and a last group with S735 mixed with mAb 5.1 G8 F10 (40 mg kg^{-1}) as a negative control. Blood samples were taken in duplicate from the orbital artery at various time intervals after injection and viable counts were performed on blood agar plates.

RESULTS AND DISCUSSION

mAb Z3 and its capsular type specificity

The screening steps of mAb production led to the selection of positive clone Z3, producing immunoglobulins of class IgG2b. The capsular type specificity of mAb Z3 was controlled against reference strains of all *S. suis* serotypes using a dot-ELISA. Of the 35 *S. suis* reference strains, only serotypes 1, 2 and 1/2 reacted with mAb Z3. Despite the fact that the epitope recognized by mAb Z3 probably involves a sialic acid moiety (see below), reference strains of other sialic-acid-containing serotypes (Charland *et al.*, 1995) did not react with the antibody. It is possible that different serotypes contain sialic acid in their respective capsular material, yet the specific epitope recognized by mAb Z3 is only present in serotypes 1, 2 and 1/2. To confirm the specificity of mAb Z3, attempts were made to detect this epitope on a total of 484 field isolates representing the 35 serotypes of *S. suis*. Results showed that 93%, 98% and 96% of isolates, belonging to serotypes 1, 2 and 1/2 respectively, were positive. Isolates from all other serotypes were negative. It is conceivable that the few negative field strains which belong to serotypes 1, 2 or 1/2 were low-encapsulated strains. In fact, serotyping is usually carried out by the coagglutination test, using polyclonal antibodies (Higgins & Gottschalk, 1990), which can detect other surface antigens. So far, there is no report on the isolation of sialic-acid-negative *S. suis* serotype 2 strains (Charland *et al.*, 1995). Thus, mAb Z3 recognized an epitope shared by the three serotypes. This could explain the previously described cross-reactions between them (Elliott & Tai, 1978; Perch *et al.*, 1981).

Characterization of the epitope recognized by mAb Z3

Results from immunoblots showed that mAb Z3 reacted with the type 2 capsule in the high-molecular-mass region. Similar results were obtained by Del Campo Sepulveda *et al.* (1996) and Tikkanen *et al.* (1995) using polyclonal antibodies. It has been reported that the molecular mass of the *S. suis* serotype 2 capsule is about

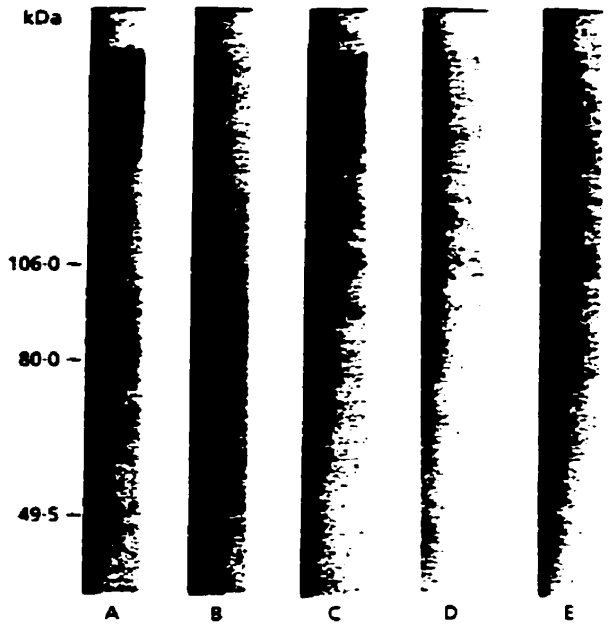


Fig. 1. Immunoblot using mAb Z3, purified capsular material (CPS; 50 µg per well) and whole cells (WC, adjusted to OD_{540} 6; 20 µl per well) of *S. suis* serotype 2 reference strain S735 with different treatments. Lane A, untreated CPS; lane B, periodate-treated CPS; lane C, untreated WC; lane D, sialidase-treated WC; lane E, immunoblot of untreated CPS with isotype-matched, non-specific monoclonal antibody 5.1 F8 G10 as a negative control. Molecular masses of standards in kDa are indicated. Image generated on a PC 486DX with an HP ScanJet IIc scanner using PhotoFinish 2·0 (Zsoft Corporation).

310 kDa (Katsumi *et al.*, 1996). The epitope was shown to be polysaccharide in nature, since the reaction was affected by periodate oxidation (Fig. 1, lane B). In addition, proteins did not appear to be involved in the reaction since the blotting method of Tikkanen *et al.* (1995), which uses a nitrocellulose membrane between the gel and the PVDF-N membrane to prevent transfer of interfering proteins, allowed a clear reaction between mAb Z3 and capsular material. While mAb Z3 gave similar results with untreated whole-cell antigen of type 2 (Fig. 1, lane C), sialidase treatment completely eliminated the reaction (Fig. 1, lane D). Similar results were obtained with whole-cell antigens of capsular types 1 and 1/2 (data not shown). This indicates that the sialic acid moiety of the capsule may be involved in the recognition of the epitope by mAb Z3. Our results are in agreement with those of Katsumi *et al.* (1996), who reported that, after complete removal of capsular sialic acid, reactivity with anti-type 2 serum was no longer present. They also suggested that the sialic acid moiety contains the reactive epitope in the capsule. However, since the complete structure of the *S. suis* capsule is unknown, removal of other epitopes by sialidase treatment cannot be ruled out.

The ELISA-competition test showed a competitive

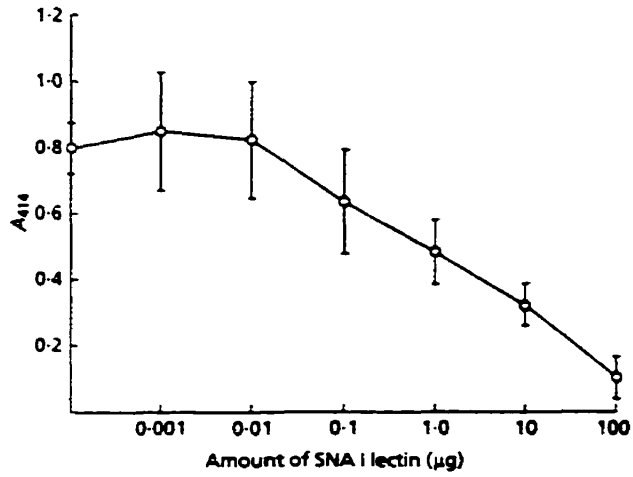


Fig. 2. ELISA-competition test between monoclonal antibody Z3 and *Sambucus nigra* lectin (SNA I) with *S. suis* serotype 2 purified capsular material as antigen. The bars represent SD (n = 4).

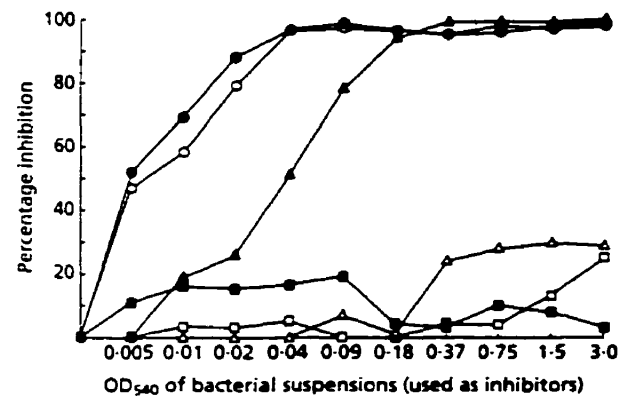


Fig. 3. Inhibition of monoclonal antibody Z3 by whole cells (WC) of *S. suis* serotype 2 (○), proteinase K- (●), sialidase- (□), and periodate- (■) treated WC of type 2, WC of type 1 (△) and WC of type 1/2 (▲) using type 2 purified capsular material as an antigen in an ELISA-inhibition test (n = 4).

reaction between the SNA I lectin and mAb Z3 (Fig. 2). This is further evidence for the sialic acid nature of the recognized epitope, although the possibility of competition by steric hindrance cannot be excluded.

An inhibition-ELISA was developed to ascertain which antigens could inhibit the reaction between capsular material and mAb Z3. Fig. 3 shows that the reaction obtained in the indirect ELISA between mAb Z3 and purified capsule can be strongly inhibited by untreated or proteinase K-treated but not by periodate- or sialidase-treated serotype 2 whole-cell antigen. Serotype 1/2 whole-cell antigen presented an inhibition activity similar to that obtained with type 2 antigen. Interestingly, serotype 1 whole-cell antigen presented a low inhibition potential (25–30%). This could be explained, in part, by a lower amount of capsular material and/or capsular sialic acid. In fact, sialic acid concentrations of the reference strains of *S. suis* serotypes 1, 1/2 and 2 were shown to be $0{\cdot}44 \pm 0{\cdot}22$ μg mg^{-1}, $1{\cdot}57 \pm 0{\cdot}22$ μg mg^{-1} and $3{\cdot}36 \pm 0{\cdot}22$ μg mg^{-1} respectively (means ± SD, n = 3). In addition, the agglutination reaction obtained between the type 1 strain and SNA I lectin was significantly weaker than those obtained with types 2 and 1/2 (Charland *et al.*, 1995). Capsular material of type 1 was four times thinner than that of the two other types (Jacques *et al.*, 1990). Sialic acid or capsular material concentration may have been high enough to obtain a positive reaction by dot-ELISA but not quite high enough to have a significant inhibition potential on mAb Z3. On the other hand, a weak affinity of mAb Z3 for type 1 capsule coupled to amounts of capsule above saturation could also be responsible for the results obtained in this study. Although sialic acid did not present any inhibition potential of mAb Z3 (data not shown), the fact that the sialic acid moiety of the capsular material is involved in the epitope recognized by the mAb is still plausible. Indeed, high numbers of monomers are needed for functional binding to other sialic-acid-specific mAbs (Hayrinen *et al.*, 1989; Hurpin *et al.*, 1992).

Monoclonal antibody Z3 stabilized the capsule of the reference strains of serotypes 1, 1/2 and 2 (Fig. 4). Less capsular material was stabilized on type 1, as previously shown by Jacques *et al.* (1990) with polyclonal antibodies, compared to the other two types. This confirms results obtained in the ELISA-inhibition test.

Involvement of mAb Z3 in opsonization, protection and clearance of *S. suis* serotype 2

The phagocytic assay carried out in this study showed the opsonizing potential of mAb Z3. Results obtained with non-opsonized cells (31% ± 1%; mean ± SD, n = 3) were similar to those previously obtained in other studies (Charland *et al.*, 1996). Interestingly, cells opsonized with mAb Z3 (48% ± 4%) or polyclonal serum (42% ± 3%) were significantly more phagocytosed by porcine blood monocytes ($P < 0{\cdot}005$; analysed by Student's two-tailed unpaired t test). Increased amounts of mAb Z3 (800 μg) did not increase the phagocytosis rate (45% ± 2%; $P > 0{\cdot}05$). Despite the fact that more bacteria were phagocytosed after opsonization with anti-capsular antibodies, the values obtained in this study were lower than expected. A clear correlation between encapsulation and resistance to phagocytosis has been demonstrated by us (Charland *et al.*, 1997, Brazeau *et al.*, 1996) and by other workers (Wibawan & Lämmler, 1994; Quessy *et al.*, 1994b). However, there is no published report on phagocytosis obtained after opsonization with serotype-specific antibodies.

In the protection assay, 2 d post-inoculation, 15 out of 15 mice in the negative control group were seriously ill or

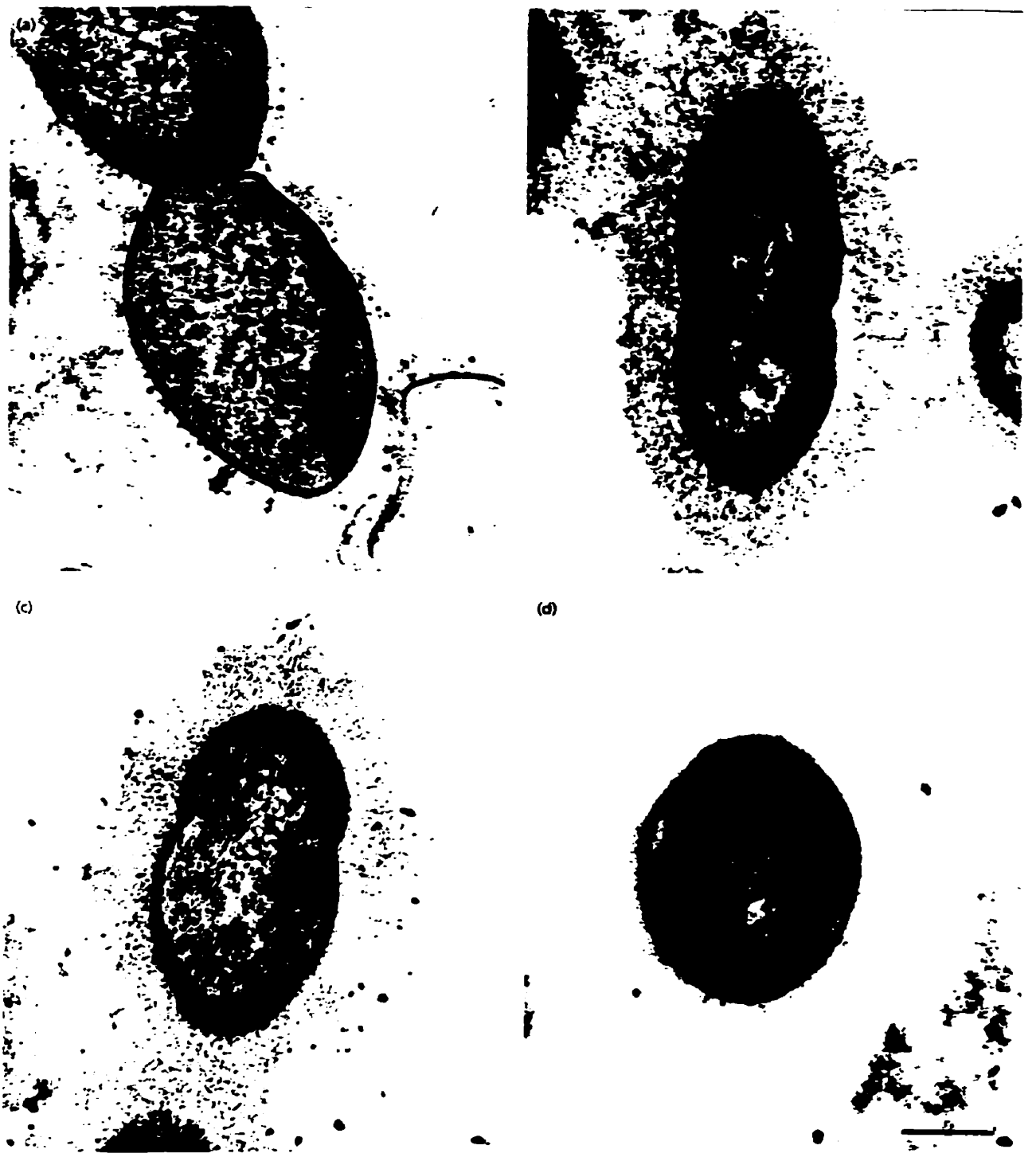


Fig. 4. Transmission electron micrograph of thin sections of cells of *S. suis* serotypes 1 (a), 1/2 (b), 2 (c) and 3 (d; negative control) incubated with monoclonal antibody Z3 and stained with ruthenium red. Bar, 200 nm.

Table 1. **Evaluation of the protective activity of a *Streptococcus suis* serotype 2 specific monoclonal antibody Z3, rabbit polyclonal anti-type 2 antibodies and isotype-matched, non-specific monoclonal antibody 5.1 G8 F10 using a standardized murine model of infection**

No. of bacteria injected (c.f.u. ml^{-1})	Antibody	No. of affected mice/no. of inoculated mice	Protection (%)
10^8	None	15/15 ($P>0{\cdot}05$)	ND
	Z3 (40 mg kg^{-1})	13/15 ($P>0{\cdot}05$)	14
	Polyclonal	0/15	100
10^7	None	9/15 ($P<0{\cdot}0005$)	ND
	Z3 (40 mg kg^{-1})	0/15 ($P<0{\cdot}0005$)	100
	5.1 (40 mg kg^{-1})	15/15	0

ND, Not determined.

dead as well as 13 out of 15 mice of the group injected with mAb Z3 (Table 1). Since antibody concentrations used in similar experiments by other workers (Ricci *et al.*, 1996; Teti *et al.*, 1992) did not show any protective activity in our hands, a higher amount of mAb was used to ensure that a failure in protection was not due to a low antibody concentration. All mice injected with the polyclonal serum survived and did not show any clinical signs. Inoculation of fewer bacteria showed that the mAb could, at least partially, protect mice (Table 1) whereas mice injected with mAb 5.1 G8 F10 (40 mg kg^{-1}) as a negative control were not protected. All mice injected with mAb Z3 survived and did not show clinical signs whereas those injected with the control mAb were seriously affected or died. These results indicate that protection induced by mAb Z3 was specific and not due to a high amount of IgG. Injection of other mice with 40 mg mAb Z3 kg^{-1} mixed with bacterial suspensions of types 1 and 1/2 showed similar results (data not shown).

Fig. 5 shows that mAb Z3 had a possible role in elimination of bacteria *in vivo*. As soon as 2 h after injection, mAb Z3 helped completely to clear circulating bacteria, whereas in mice injected with S735 alone, a high number of bacteria could still be recovered 48 h after injection. Mice injected with mAb 5.1 G8 F10 as a negative control did not show any decrease in the number of circulating bacteria, unlike mAb Z3, indicating that clearance was antibody-specific. However, it cannot be ruled out that some differences in clearance of infection between the test and control groups might have been a reflection of micro-agglutinations of the bacteria, since mice were injected with a mixture of cells and mAb. Clearance may have been accelerated by removal of agglutinations of bacteria, in both protection and clearance assays.

Capsular material is the first bacterial component to be met by the host defence mechanisms. It is one of the first constituents to stimulate the immune system of an individual. However, in pigs infected with *S. suis*

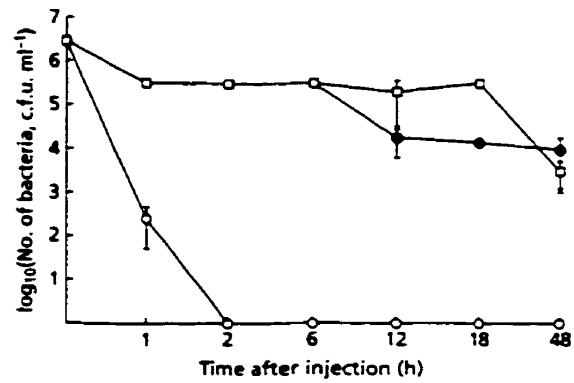


Fig. 5. Clearance of circulating *S. suis* serotype 2 in BALB/c mice injected with (○), or without (●) monoclonal antibody Z3, or with isotype-matched, non-specific monoclonal antibody 5.1 F8 G10 (□) as a negative control. The bars (not shown where smaller than symbols) represent the range (n = 2).

serotype 2, very few anti-capsular antibodies could be detected even though they are protected against a challenge with a virulent strain (Del Campo Sepulveda *et al.*, 1996). Interestingly, Kebede *et al.* (1990) could not obtain any protection against serotypes 1 and 2 using a live 1/2 vaccine. Since a live vaccine was used in this study, it is possible that other factors such as common antigens (proteins) as well as a cellular immune response helped to provide protection. Elliott *et al.* (1980) could elicit opsonizing antibodies in pigs vaccinated with purified capsular polysaccharides although they did not test their protective activity whereas Holt *et al.* (1990b) could stimulate anti-capsule antibody production, but failed to stimulate immunity. Thus, although antibodies to capsular material are shown to be protective against many bacterial pathogens on their own (Hurpin *et al.*, 1992; Ricci *et al.*, 1996), the situation may be different for *S. suis*. Indeed, in addition to the capsule, other structures, such as bacterial proteins (Holt *et al.*, 1990a;

Quessy *et al.*, 1994a), are probably involved in the induction of a complete protection. However, bacterial doses injected in mice are, in general, quite high and it is conceivable that mAb Z3 could protect pigs against a natural challenge which may involve lower doses of bacteria.

Pathogenesis of *S. suis* infections differs from that of other streptococcal infections (Wessels *et al.*, 1989; Williams & Blakemore, 1990). In fact, although *S. suis* possesses capsular sialic acid, like group B streptococci, sialic acid does not seem to be involved in resistance to phagocytosis as for group B streptococci (Wessels *et al.*, 1989). Capsular sialic acid also plays a role in the pathogenesis of other meningitis-causing bacteria such as *Escherichia coli* K1 (Kim *et al.*, 1992) and group B *Neisseria meningitidis* (Jarvis & Vedros, 1987). Interestingly, these two bacteria have immunochemically identical capsules (Kasper *et al.*, 1973). The sialic acid concentration in *S. suis* strains seems to be considerably lower than in other bacterial species which might explain, at least in part, differences seen between results with mAb Z3 and results with mAb of group B streptococci (Egan *et al.*, 1983; Teti *et al.*, 1992).

Concluding remarks

In conclusion, a mAb directed to a *S. suis* capsular epitope, possibly the sialic acid moiety, was shown to have opsonizing capacities. In addition, this mAb helped to eliminate bacteria from circulation in mice. However, protection in a murine model could only be observed when mice were challenged with a sublethal dose of bacteria. Antibodies against other structures, such as cell-wall proteins, are probably needed to obtain complete protection against infection due to *S. suis* serotype 2.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank M. Marcoux, D. Meunier-Coté and B. Foiry for their excellent technical assistance and Dr R. Higgins for reviewing the manuscript. This work was supported by grant OGP0154280 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and by grant 97-NC-1037 from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la recherche. N.C. is the recipient of a NSERC scholarship.

REFERENCES

Arends, J. P. & Zanen, H. (1988). Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis* **10**, 131–137.

Beaudoin, M., Higgins, R., Harel, J. & Gottschalk, M. (1992). Studies on a murine model for evaluation of virulence of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates. *FEMS Microbiol Lett* **78**, 111–116.

Bélanger, M., Rioux, S., Foiry, B. & Jacques, M. (1992). Affinity for porcine respiratory tract mucus is found in some isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **97**, 119–126.

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

Charland, N., Kellens, J. T. C., Caya, F. & Gottschalk, M. (1995). Agglutination of *Streptococcus suis* by sialic acid-binding lectins. *J Clin Microbiol* **33**, 2220–2221.

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

Charland, N., Harel, J., Kobisch, M., Jacques, M. & Gottschalk, M. (1997). Production and characterization of *Streptococcus suis* type 2 mutants deficient in capsular expression. In *Abstracts of the 97th Annual Meeting of the American Society for Microbiology*, abstract B50. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Cross, A. S., Zollinger, W., Mandrell, R., Gemski, P. & Sadoff, J. (1983). Evaluation of immunotherapeutic approaches for the potential treatment of infections caused by K1-positive *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **147**, 68–76.

Del Campo Sepulveda, E., Altman, E., Kobisch, M. & Gottschalk, M. (1996). Detection of serotype-specific antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using an indirect ELISA. *Vet Microbiol* **52**, 113–125.

Egan, M. L., Pritchard, D. G., Dillon, H. C., Jr & Gray, B. M. (1983). Protection of mice from experimental infection with type III group B streptococcus using monoclonal antibodies. *J Exp Med* **158**, 1006–1011.

Elliott, S. D. & Tai, J. (1978). The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. *J Exp Med* **148**, 1699–1704.

Elliott, S. D., Clifton-Hadley, F. A. & Tai, J. (1980). Streptococcal infection in young pigs. V. An immunogenic polysaccharide from *Streptococcus suis* type 2 with particular reference to vaccination against streptococcal meningitis in pigs. *J Hyg* **85**, 275–285.

Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M. & Dubreuil, D. (1992). Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. *Vet Microbiol* **30**, 59–71.

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

Hayrinen, J., Bitter-Suermann, D. & Finne, J. (1989). Interaction of meningococcal group B monoclonal antibody and its Fab fragment with alpha 2-8-linked sialic acid polymers: requirement of a long oligosaccharide segment for binding. *Mol Immunol* **26**, 523–529.

Higgins, R. & Gottschalk, M. (1990). An update on *Streptococcus suis* identification. *J Vet Diagn Invest* **2**, 249–252.

Higgins, R., Gottschalk, M., Beaudoin, M. & Rawluk, S. A. (1992). Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in Québec and western Canada. *Can Vet J* **33**, 27–30.

Holt, M. E., Enright, M. R. & Alexander, T. J. L. (1990a). Protective effect of sera raised against different fractions of *Streptococcus suis* type 2. *J Comp Pathol* **103**, 85–94.

Holt, M. E., Enright, M. R. & Alexander, T. J. L. (1990b). Immunisation of pigs with killed cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Res Vet Sci* **48**, 23–27.

Hurpin, C. M., Carosella, E. D. & Cazenave, P.-A. (1992). Bactericidal activity of two IgG_{2a} murine monoclonal antibodies with distinct specificities for group B *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide. *Hybridoma* **11**, 677–687.

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

Jarvis, G. A. & Vedros, N. A. (1987). Sialic acid of group B *Neisseria meningitidis* regulates alternative complement pathway activation. *Infect Immun* **55**, 174–180.

Kamata, Y., Kozaki, S., Nagai, T. & Sakaguchi, G. (1985). Production of monoclonal antibodies against *Clostridium botulinum* type E derivative toxin. *FEMS Microbiol Lett* **26**, 305–309.

Kasper, D. L., Winkelhake, L. J., Zollinger, W. D., Brandt, B. L. & Artenstein, M. S. (1973). Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of *Escherichia coli* O7:K1 (L):NM and group B *Neisseria meningitidis*. *J Immunol* **110**, 262–268.

Katsumi, M., Saito, T., Kataoka, Y., Itoh, T., Kikuchi, N. & Hiramune, T. (1996). Comparative preparation methods of sialylated capsule antigen from *Streptococcus suis* type 2 with type specific antigenicity. *J Vet Med Sci* **58**, 947–952.

Kebede, M., Chengappa, M. M. & Stuart, J. G. (1990). Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of *Streptococcus suis*: efficacy trial of the mutant vaccine in mice. *Vet Microbiol* **22**, 249–257.

Kim, K. S., Itabashi, H., Gemski, P., Sadoff, J., Warren, R. L. & Cross, A. S. (1992). The K1 capsule is the critical determinant in the development of *Escherichia coli* meningitis in the rat. *J Clin Invest* **90**, 897–905.

Köhler, G. & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495.

Lairini, K., Stenbaek, E., Lacouture, S. & Gottschalk, M. (1995). Production and characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet Microbiol* **46**, 369–381.

Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L. & Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**, 206–210.

Perch, B., Kjems, E., Slot, P. & Pedersen, K. B. (1981). Biochemical and serological properties of R, S, and RS streptococci. *Acta Path Microbiol Scand Sect B Microbiol* **89**, 167–171.

Quessy, S., Dubreuil, J. D., Caya, M., Létourneau, R. & Higgins, R. (1994a). Comparison of pig, rabbit and mouse IgG response to *Streptococcus suis* serotype 2 proteins and active immunization against the infection. *Can J Vet Res* **58**, 220–223.

Quessy, S., Dubreuil, J. D., Jacques, M., Malouin, F. & Higgins, R. (1994b). Increase in capsular material thickness following *in vivo* growth of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains. *FEMS Microbiol Lett* **115**, 19–26.

Radacovici, S., Lallier, R., Larivière, S. & Dubreuil, J. D. (1992). Biochemical characterization of antigenic saline extract of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 and identification of a serotype-specific antigen for ELISA serodiagnosis. *Vet Microbiol* **30**, 369–385.

Ricci, M. L., Vonhunolstein, C., Gomez, M. J. J., Parisi, L., Tissi, L. & Orefici, G. (1996). Protective activity of a murine monoclonal antibody against acute and chronic experimental infection with type IV group B *Streptococcus*. *J Med Microbiol* **44**, 475–481.

Smith, H. (1993). Gonococci *in vivo*: host CMP-NANA, sialylated lipopolysaccharide and serum resistance. *Can J Infect Dis* **4**, 31–37.

Teti, G., Calapai, M., Calogero, G., Tomasello, F., Mancuso, G., Galli, A. & Riggio, G. (1992). Specificity and protective activity of murine monoclonal antibodies directed against the capsular polysaccharide of type III group B streptococci. *Hybridoma* **11**, 13–22.

Tikkanen, K., Häyrinen, J., Pelkonen, S. & Finne, J. (1995). Immunoblot analysis of bacterial polysaccharides: application to the type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis* and *Streptococcus agalactiae*. *J Immunol Methods* **187**, 233–244.

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

Warren, L. (1963). Thiobarbituric acid assay of sialic acids. *Methods Enzymol* **6**, 463–464.

Wessels, M. R., Rubens, C. E., Benedi, V.-J. & Kasper, D. L. (1989). Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 8983–8987.

Wibawan, I. W. T. & Lämmler, C. (1994). Relation between encapsulation and various properties of *Streptococcus suis*. *J Vet Med Ser B* **41**, 453–459.

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

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

Received 22 April 1997; revised 24 July 1997; accepted 5 August 1997.

IV- DISCUSSION

1. Acide sialique et *Streptococcus suis*

L'acide sialique est relié à la virulence de plusieurs pathogènes [215, 245, 248]. Elliott et Tai [11] ont démontré la présence de NANA dans les capsules de *S. suis* sérotypes 1 et 2. Cependant, la présence de NANA chez les autres sérotypes de *S. suis* n'était pas connue. Les tests d'agglutination en tube avec la lectine SNA I, spécifique à NANA, ont permis de confirmer la présence de ce sucre dans la capsule du sérotype 2, grâce tout d'abord à l'absence de réaction chez un mutant non-capsulé spontané et, plus tard, chez des mutants non-capsulés isogéniques. La réaction d'agglutination était fortement positive avec la souche sauvage mais beaucoup plus faible avec les mutants. La spécificité de la réaction entre *S. suis* et SNA I permet également d'établir le lien impliquant NANA. Cette lectine réagit avec NANA et le galactose ou le *N*-acétylgalactosamine en position α(2-6) (NANA(α2-6)Gal/GalNAc) [310]. Ce lien se retrouve généralement en position terminale d'une chaîne polysaccharidique [310]. De plus, toutes les souches de sérotype 2 testées possèdent elles aussi NANA. D'autre part, bien que la présence de NANA chez le sérotype 1/2 ait été acceptée de par ses réactions croisées avec des antisérums contre les sérotypes 1 et 2 [13], aucune étude à ce sujet n'avait préalablement eu lieu. Nos expériences ont permis de confirmer ce fait, qui a aussi été démontré avec notre anticorps monoclonal. Par ailleurs, les réactions avec SNA I ont mis en évidence trois autres sérotypes possédant NANA, soient les sérotypes 14, 15 et 16. Fait à noter, la souche de sérotype 14, souche isolée d'un cas de méningite humaine [14], réagit exactement de la même façon que celle de sérotype 2 qui est d'origine porcine [12]. La réaction entre SNA I et *S. suis* nous donnait un outil pour étudier le rôle de NANA chez la bactérie.

L'acide sialique avait déjà été proposé comme facteur de virulence potentiel pour *S. suis* [68], bien qu'aucune étude à ce sujet n'ait été effectuée. Malgré le fait que NANA soit présent chez toutes les souches de sérotype 2 testées avec SNA I, la concentration de ce sucre chez des souches de virulence variable n'était pas connue. Une variation à ce niveau pouvait expliquer les

différences de virulence. Cependant, notre étude a démontré que toutes les souches de sérotype 2 testées biochimiquement présentent la même concentration de NANA, indépendamment de leur virulence. De plus, cette concentration est beaucoup plus faible que celle retrouvée chez d'autres streptocoques pathogènes, les SGB. En fait, la concentration de NANA dans la capsule de *S. suis* sérotype 2 après croissance *in vitro* est quatre fois moins élevée que celle des souches les plus virulentes de SGB et une fois et demie celle des souches les moins virulentes [311].

La concentration de NANA double après croissance *in vivo* mais cette augmentation est probablement reliée à une plus grande production de polysaccharides capsulaires en général puisque la capsule double aussi en épaisseur. Cette augmentation est retrouvée chez les souches virulente et non-virulente testées. Donc, le rôle de la capsule dans la virulence ne dépendrait pas de son épaisseur, tel que suggéré par Quessy et coll. [130] qui proposaient que seule la souche virulente pouvait augmenter l'épaisseur de sa capsule *in vivo*. Bien que l'épaisseur de la capsule de la souche virulente augmente après croissance *in vivo*, l'épaisseur de la capsule de la souche non-virulente augmente aussi lors de la croissance en chambres intrapéritonéales chez le porc, contrairement aux observations faites chez le rat [130]. Clifton-Hadley et coll. [9] avaient d'ailleurs remarqué que l'épaisseur de la capsule d'une souche n'était pas reliée à sa virulence. La même observation a été faite pour *S. aureus* type capsulaire 8; aucune différence n'a pu être observée dans la virulence de souches produisant des quantités variables de capsule [312]. Il est aussi possible que les bactéries aient absorbé NANA lié à des protéines de l'hôte suite aux échanges de fluide entre les chambres et la cavité péritonéale des porcs. Cependant, même si quelques souches reconnaissent des résidus NANA [98], très peu d'études ont été faites à ce sujet. L'adhésine "majeure" de *S. suis* semble plutôt impliquée dans la reconnaissance du galactose [101]. L'augmentation de la concentration de NANA est donc probablement due à une augmentation de l'épaisseur de la capsule.

Les résultats des concentrations de NANA selon la virulence des souches nous suggéraient que NANA ne jouait pas un rôle critique dans la virulence de *S. suis*. Cette hypothèse a été confirmée d'abord grâce aux tests de phagocytose et ensuite grâce aux essais de virulence effectués avec la souche traitée à la sialidase ou dont les résidus NANA avaient été bloqués avec la lectine SNA I. Même si NANA était retiré ou bloqué, la phagocytose s'effectuait de la même façon que lorsque NANA était présent, que les bactéries aient été testées après croissance *in vitro* ou *in vivo*. L'activation du complément ne semble pas affectée par la présence ou l'absence de NANA de *S. suis*. En fait, le complément ne jouerait pas un rôle critique dans la phagocytose de *S. suis*. Brazeau et coll. [298] ont démontré que lorsque du sérum inactivé ou non à la chaleur était ajouté, la phagocytose était augmentée de façon similaire. Ces résultats suggèrent qu'un facteur du sérum autre que le complément favorise la phagocytose. Au niveau de la survie intracellulaire, l'absence ou le blocage de NANA semble accompagner une diminution de la survie de la souche virulente. Cependant, ce seul fait ne semble pas impliquer NANA de façon significative dans la survie intracellulaire des souches virulentes. De plus, si NANA avait eu un rôle à jouer au niveau du système immunitaire non-spécifique, son implication aurait été démontrée par son rôle anti-phagocytaire. Donc, l'absence ou le blocage de NANA aurait augmenté la phagocytose des bactéries grâce à l'activation de la voie alterne du complément, les bactéries auraient été éliminées rapidement et les signes cliniques et/ou la mortalité auraient diminué, ce qui n'a pas été le cas.

La faible concentration de NANA dans la capsule de *S. suis* peut, en partie, expliquer pourquoi NANA ne joue pas un rôle aussi critique dans la virulence que pour les SGB. Cependant, une autre possibilité existe. Selon Edwards et coll. [234], la position de NANA dans une chaîne polysaccharidique est importante pour son implication dans la virulence. Lorsque NANA n'est pas en position terminale, la bactérie serait moins virulente. L'arrangement des sucres dans la capsule de *S. suis* sérotype 2 n'est pas connu. Malgré le fait que

la réaction avec SNA I implique un lien terminal, il est à noter que les bactéries doivent subir un traitement draconien avec la glycine-HCl (pH 2) chaude avant que la réaction soit fortement visible entre les cellules et la lectine. Ce traitement dégrade des structures de surface et dissout des glycoconjugués pour permettre une meilleure exposition des sucres impliqués dans la réaction [313]. Il est donc possible que NANA ne soit pas en position terminale puisqu'une partie des sucres de la capsule peut avoir été enlevée par le traitement, ce qui expliquerait pourquoi NANA ne joue pas de rôle dans la virulence de *S. suis*. La réponse sera obtenue lorsque la structure de la capsule sera connue.

Pourquoi alors *S. suis* produirait-il de NANA ? Le rôle de NANA pourrait être au niveau de l'interaction avec l'immunité spécifique plutôt que non-spécifique. La capsule de *S. suis* est peu immunogène [304]. D'ailleurs, il a été démontré que des porcs protégés contre une infection possèdent un faible titre d'anticorps anti-capsule de *S. suis* [52]. Le rôle de NANA chez *S. suis* pourrait être de "mimer" les résidus NANA retrouvés sur les cellules de l'hôte, donc de limiter la production d'anticorps anti-NANA pour éviter les réactions autoimmunes. Finne et coll. [257] ont d'ailleurs démontré que des anticorps anti-capsule de méningocoques du groupe B réagissent avec des cellules nerveuses. D'un autre côté, NANA pourrait bloquer les sites antigéniques susceptibles d'activer la production d'anticorps protecteurs ou simplement empêcher stériquement l'attachement d'anticorps déjà produits [244]. L'implication de NANA au niveau de l'immunité spécifique est probablement l'explication la plus plausible selon les résultats obtenus avec *S. suis*. D'ailleurs, selon l'hypothèse suggérée par Williams et Blakemore [78], la bactérie n'aurait pas intérêt à prévenir sa phagocytose puisque ce serait son moyen de survie et de transport.

2. Premier facteur de virulence confirmé pour *Streptococcus suis* sérotype 2

Les capsules bactériennes sont impliquées dans la virulence de plusieurs bactéries pathogènes [136]. La capsule entière de *S. suis* sérotype 2, non seulement sa partie NANA, a déjà été proposée comme facteur de virulence [68].

Des études ont permis d'obtenir des résultats suggérant le rôle que la capsule de *S. suis* pourrait jouer dans la virulence. Le mutant non-capsulé spontané produit par passages successifs en présence d'anticorps anti-capsule est non-virulent chez la souris [291] et plus phagocyté que la souche sauvage [298]. Cependant, il manque au moins une protéine majeure de 44 kDa à ce mutant qui pourrait être impliquée dans la virulence [291]. De plus, ce mutant n'a jamais été testé chez l'hôte naturel, le porc.

D'un autre côté, Williams [297] ainsi que Brazeau et coll. [298] signalent que des souches virulentes et non-virulentes capsulées sont phagocytées de la même façon. De plus, un facteur autre que la capsule aiderait à la survie intracellulaire des souches virulentes [297, 298]. Suite à ces observations et selon l'hypothèse de Williams et Blakemore [78], la capsule ne serait pas importante dans la virulence de *S. suis* puisque les souches virulentes sont phagocytées, malgré leur capsule, survivent dans les macrophages et sont transportées jusqu'au système nerveux central où elles causent la méningite. Cependant, le pourcentage de phagocytose est relativement faible, même dans les expériences menées par Williams (8-12%; [297]). Les expériences que nous avons menées lors de cette étude ont confirmé ces résultats, bien que le pourcentage de phagocytose soit légèrement plus élevé avec des monocytes de porc qu'avec des macrophages péritonéaux de souris (20-30%). Un calcul rapide à partir de nos résultats obtenus lors des tests de phagocytose *in vitro* avec des monocytes de porc démontre que la majorité des bactéries demeure à l'extérieur des phagocytes. Alors que 18% de l'inoculum de départ de la souche sauvage est phagocyté, environ 82% des bactéries demeurent donc à l'extérieur. Par contre, lors des tests de phagocytose avec les mutants non-capsulés, les macrophages ont ingéré la totalité de l'inoculum de départ. Ces résultats ont été confirmés par Segura et coll. [192], la phagocytose étant mesurée cette fois-ci à l'aide de comptes viables plutôt que par coloration vitale.

La capsule confère donc une capacité anti-phagocytaire aux bactéries. Par contre, ce rôle anti-phagocytaire ne semble pas lié à un blocage de l'activation de la voie alterne du complément, comme observé avec les test sur NANA. Il est possible que la capsule interfère avec la déposition du facteur du complément C3b sur sa paroi comme chez *C. fetus* [180]. D'autre part, la capsule pourrait bloquer la liaison entre le C3b déposé sur sa paroi et les récepteurs du C3b des macrophages comme chez *S. pneumoniae* et *S. aureus* [178, 183]. Cependant, des expériences additionnelles sont requises afin d'établir les moyens utilisés par *S. suis* pour inhiber sa phagocytose.

La production de mutants isogéniques non-capsulés a permis d'établir l'importance de la capsule de *S. suis* sérotype 2 dans la virulence. L'absence de capsule favorise la phagocytose, permettant à l'hôte d'éliminer très rapidement les bactéries de la circulation. La capsule est impliquée dans la virulence par la protection qu'elle confère aux bactéries et cette survie permet la dissémination des bactéries chez l'hôte. Il est possible qu'une variation dans l'épaisseur ou la production de la capsule soit requise, dépendamment de l'étape de l'infection comme suggéré pour d'autres bactéries [164, 280]. Il a été démontré pour *S. suis* que l'épaisseur de la capsule varie selon la phase et le milieu de croissance [290]. La bactérie pourrait avoir recours à un contrôle d'expression de la capsule similaire aux SGB [280]. La présence de la capsule de *S. suis* affecte l'exposition d'adhésines [101]. Il est donc possible qu'au début de l'infection, la capsule soit plus ou moins exprimée pour permettre l'adhérence et la colonisation de l'hôte, alors que pendant l'infection, la capsule doit être présente pour la résistance à la phagocytose.

Malgré tout, la capsule n'est pas un facteur de virulence unique. Cet argument est d'ailleurs renforcé par les résultats obtenus suite aux essais d'infections avec *S. suis* sérotype 8 ([148], voir Annexe). Alors que les capsules de *S. pneumoniae* types 19A et 19F et *S. suis* sérotype 8 présentent des épitopes communs, seuls les pneumocoques causent des lésions chez le

cobaye; aucun signe clinique n'a pu être détecté suite à l'infection de cobayes par une forte dose de *S. suis* sérotype 8 ([148], Annexe). Par contre, malgré le fait que certaines capsules possèdent des épitopes communs, la possibilité que la composition chimique de ces capsules diffère ne peut être écartée. D'ailleurs, il a été démontré que les capsules des types 3 et 8 de *S. pneumoniae* ont des capsules chimiquement différentes bien qu'elles partagent des épitopes similaires [314]. Ces distinctions pourraient être à l'origine de la différence au niveau du caractère virulent des souches, comme il a aussi été démontré pour *N. meningitidis*: bien que NANA soit présent chez ces bactéries, sa position dans les chaînes polysaccharidiques est importante pour la virulence des souches [234]. Chez *S. suis* sérotype 2, des souches non-virulentes capsulées ont été rapportées [31, 43]. Des facteurs de virulence autres que la capsule, encore non-étudiés ou toujours inconnus, sont donc requis. La capsule est cependant essentielle pour les souches virulentes; la capsule doit les protéger le temps qu'elles produisent les autres facteurs de virulence. La virulence de *S. suis* sérotype 2 est probablement multi-factorielle. Il serait intéressant d'étudier plus en profondeur les différences entre les souches virulentes et non-virulentes afin de déterminer quels sont ces autres facteurs qui influencent la virulence. Des études ont déjà été faites au niveau des protéines [43, 50] mais aucune n'a pu être impliquée directement dans la virulence jusqu'à ce jour. Une étude pourrait être faite au niveau moléculaire. Une technologie récente, la "mutagenèse à étiquette" [315], permet d'identifier simultanément des gènes reliés à la virulence. Par des marquages différenciés sur un transposon utilisé pour la mutagenèse, un groupe de mutants peut être injecté dans un même animal, les isolats virulents ré-isolés de la rate de l'animal et ces isolats criblés par PCR avec des sondes préparées à partir de tous les transposons marqués différemment. En comparant les isolats aux clones de départ, les mutants non-virulents sont repérés parmi ceux ne réagissant pas avec les sondes. Les sites d'insertion du transposon chez ces mutants peuvent ensuite être séquencés pour connaître les gènes interrompus pouvant être reliés à la virulence de la souche [315]. Cette

méthode pourrait permettre d'identifier plusieurs facteurs impliqués dans la virulence de *S. suis*.

Puisque la capsule empêche la phagocytose de *S. suis*, l'hypothèse du "cheval de Troie" suggérée par Williams et Blakemore [81] semble peu probable. Une nouvelle hypothèse pourrait impliquer les bactéries libres. Résistant à la phagocytose grâce à leur capsule, les bactéries survivent et voyagent dans la circulation sanguine jusqu'au système nerveux central. À ce niveau, elles traversent librement la barrière hémato-méningée en interagissant avec les cellules cervicales et/ou en favorisant la production de cytokines inflammatoires qui augmenteraient la perméabilité de la barrière hémato-méningée.

3. La capsule, facteur de protection partielle

La capsule étant la première composante bactérienne à entrer en contact avec le système immunitaire de l'hôte, elle est aussi une des premières à le stimuler. Chez d'autres bactéries, des anticorps anti-capsule, monoclonaux ou polyclonaux, sont en général protecteurs [115, 209, 260, 261, 316]. Un anticorps monoclonal (AcMo Z3) produit contre *S. suis* sérotype 2 reconnaît un épitope capsulaire contenant NANA. Fait intéressant, cet anticorps réagit avec les sérotypes 1 et 1/2 en plus du sérotype 2. Bien que les réactions croisées entre les sérotypes 2 et 1/2, et 1 et 1/2 aient été attendues, cet anticorps a permis pour la première fois de démontrer des épitopes communs entre les sérotypes 1 et 2. Ces épitopes impliqueraient NANA.

Bien que NANA ne soit pas impliqué dans la virulence de *S. suis*, il pouvait être impliqué dans la protection. L'AcMo Z3 a démontré une capacité opsonisante lors de tests de phagocytose sur lames *in vitro*. L'opsonisation était similaire à celle obtenue avec des anticorps polyclonaux. Des résultats semblables ont été obtenus lors de tests de phagocytose en suspension mesurés par cytométrie en flux après opsonisation avec des anticorps polyclonaux [299]. Malgré le fait que la phagocytose avec les anticorps

polyclonaux n'était pas très élevée, il semblerait que ces types d'anticorps soient suffisants pour conférer à des souris une protection totale contre une dose létale. Par contre, AcMo Z3 n'a pu protéger totalement contre cette même dose létale, malgré la présence d'une grande quantité d'anticorps. Cette quantité était beaucoup plus élevée que celle utilisée, et généralement protectrice, contre d'autres pathogènes [262, 317]. Une réduction de la dose de bactéries injectées en présence de AcMo Z3 a résulté en la protection de toutes les souris. Un AcMo utilisé comme contrôle négatif (AcMo anti-LPS d'*A. pleuropneumoniae*) n'a montré aucune protection à la même dose que AcMo Z3, indiquant que la protection conférée par Z3 était spécifique et non due à une grande quantité d'IgG. Le test d'élimination d'une dose sous-létale de bactéries chez la souris a montré que AcMo Z3 pouvait avoir un rôle dans le contrôle de l'infection. Les résultats de ce test suggèrent que AcMo Z3 pourrait éventuellement protéger des porcs infectés par une dose "naturelle" de *S. suis*, soit une dose beaucoup plus faible que celle utilisée dans les tests. Cependant, comme il est probable que la capsule seule, bien qu'impliquée dans la survie, ne soit pas impliquée directement dans l'apparition de signes cliniques et syndromes causés par les souches virulentes (puisque les souches non-virulentes sont elles aussi capsulées), la production d'anticorps anti-capsule n'est possiblement pas suffisante. Des anticorps contre d'autres antigènes, comme des protéines [289, 291, 305, 318], seraient nécessaires pour arrêter l'infection. Les résultats de protection avec les anticorps polyclonaux supportent d'ailleurs cette hypothèse. Le sérum hyperimmun, qui contient des anticorps anti-capsule et anti-protéines, a réussi à protéger les souris contre une dose létale.

D'un autre côté, une immunité cellulaire peut aussi être requise si la bactérie envahit certaines cellules. Il a été démontré que l'injection d'interleukine 1β (IL-1β) et d'IL-2 améliore la réponse immunitaire des porcs [309]. Le nombre de leucocytes augmente, de même que le nombre de cellules T cytotoxiques ($CD8^+$). L'activité des cellules NK est stimulée ainsi que la production d'anticorps. Cependant, tel qu'observé avec nos résultats, l'immunité cellulaire ne viserait pas

les macrophages qui phagocytent peu *S. suis*. De plus, la dose d'IL-1β requise pour avoir une bonne protection a causé des problèmes de croissance aux porcs immunisés. Par contre, IL-1β a augmenté la réponse humorale contre *S. suis*, spécialement contre les protéines. Ces résultats supportent l'hypothèse que des anticorps anti-protéines seraient efficaces contre l'infection.

Un groupe finlandais ayant identifié et caractérisé une adhésine de *S. suis* propose qu'un vaccin contre cette adhésine pourrait empêcher la colonisation des porcs par la bactérie [101, 319]. Cependant, l'adhésine devra être exposée en surface pour que les anticorps soient efficaces. À ce sujet, ce même groupe a démontré que la capsule pouvait masquer les adhésines [101]. Il a d'ailleurs été suggéré que la capsule pouvait masquer les épitopes d'anticorps protecteurs [130]. Comme il est possible que la bactérie contrôle l'épaisseur de sa capsule selon l'étape de l'infection, un vaccin efficace devrait contenir des anticorps anti-capsule et anti-protéines.

V- CONCLUSIONS

L'acide sialique capsulaire de *S. suis* sérotype 2 n'est pas un facteur de virulence critique pour la bactérie.

Par contre, malgré le fait que NANA capsulaire ne soit pas requis pour la virulence, la capsule de *S. suis* sérotype 2 est un facteur de virulence important. La capsule est le premier facteur de virulence décrit pour *S. suis* sérotype 2.

Cependant, bien que la capsule soit requise pour la virulence, des anticorps contre d'autres épitopes, en plus des épitopes capsulaires, sont requis pour une protection complète.

Les résultats obtenus durant ce projet tendent à contredire l'hypothèse de la traversée de la barrière hémato-méningée par les bactéries via leur transport et survie dans les macrophages. La phagocytose étant limitée par la présence de la capsule, les bactéries demeureraient à l'extérieur des phagocytes dans la circulation. Une nouvelle hypothèse serait donc que les bactéries traversent la barrière hémato-méningée librement.

Les outils obtenus et les techniques développées durant ce projet permettront une meilleure compréhension de la pathogenèse de la bactérie. Cette compréhension permettra l'établissement de meilleurs moyens de contrôle et de protection contre *S. suis* sérotype 2.

VI- BIBLIOGRAPHIE

[1] **Higgins, R. et M. Gottschalk.** 1998. Streptococcal diseases. *Dans* A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire et D. J. Taylor (eds.), Diseases of swine, 8ième ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, **sous presse**.

[2] **Jansen, E. J. et C. A. Van Dorssen.** 1951. Meningoencephalitis bij varkens door streptococcen. Tijdschr Diergeneeskd, **76**:815-832.

[3] **Field, H. I., D. Buntain et J. T. Done.** 1954. Studies on piglet mortality. I. Streptococcal meningitis and arthritis. Vet. Rec. **66**:453-455.

[4] **de Moor, C. E.** 1963. Septicaemic infections in pigs, caused by haemolytic streptococci from new Lancefield groups designated R, S and T. Ant. Leeuw. J. Microbiol. Serol. **29**:272-280.

[5] **Kilpper-Balz, R. et K. H. Schleifer.** 1987. *Streptococcus suis* sp. nov.; nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. **37**:160-162.

[6] **Higgins, R. a. G., M.** 1990. An update on *Streptococcus suis* identification. J. Vet. Diagn. Invest. **2**:249-252.

[7] **Elliott, S. D.** 1966. Streptococcal infections in young pigs. I. An immunological study of the causative agent (PM *Streptococcus*). J. Hyg. Camb. **64**:205-212.

[8] **Devriese, L. A., K. Ceyssens, J. Hommez, R. Kilpper-Balz et K. H. Schleifer.** 1991. Characteristics of different *Streptococcus suis* ecovars and description of a simplified identification method. Vet. Microbiol. **26**:141-150.

[9] **Clifton-Hadley, F. A., T. J. L. Alexander et M. Enright.** 1986. The epidemiology, diagnosis and control of *Streptococcus suis* type 2 infection. Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Swine Practionners, p. 471-491.

[10] **Elliott, S. D., M. McCarty et R. C. Lancefield.** 1977. Teichoic acids of group D streptococci with special reference to strains from pig meningitis (*Streptococcus suis*). J. Exp. Med. **145**:490-499.

[11] **Elliott, S. D. et J. Tai.** 1978. The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. J. Exp. Med. **148**:1699-1704.

[12] **Windsor, R. S. et S. D. Elliott.** 1975. Streptococcal infections in young pigs. IV. An outbreak of streptococcal meningitis in weaned pigs. J. Hyg. Camb. **75**:69-78.

[13] **Perch, B., E. Kjems, P. Slot et K. B. Pedersen.** 1981. Biochemical and serological properties of R, S and RS streptococci. Acta Pathol. Microbiol. Scand. B **89**:167-171.

[14] **Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, K. R. Mittal et J. Henrichsen.** 1989. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol. **27**:2633-2636.

[15] **Perch, B., K. B. Pedersen et J. Henrichsen.** 1983. Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol. **17**:993-996.

[16] **Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, M. Beaudoin et J. Henrichsen.** 1991. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol. **29**:2590-2594.

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

[18] **Higgins, R. et M. Gottschalk.** 1996. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1995. Can. Vet. J. **37**:242.

[19] **Monter Flores, J. L., R. Higgins, S. D'Allaire, R. Charette, M. Boudreau et M. Gottschalk.** 1993. Distribution of the different capsular types of *Streptococcus suis* in nineteen swine nurseries. Can. Vet. J. **34**:170-171.

[20] **Reams, R. Y., D. D. Harrington, L. T. Glickman, H. L. Thacker et T. L. Bowersock.** 1996. Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. J. Vet. Diagn. Invest. **8**:119-121.

[21] **Kawamura, Y., X. G. Hou, F. Sultana, H. Miura et T. Ezaki.** 1995. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. Int. J. Syst. Bacteriol. **45**:406-408.

[22] **Mogollon, J. D., C. Pijoan, M. P. Murtaugh, E. L. Kaplan, J. E. Collins et P. P. Cleary.** 1990. Characterization of prototype and clinically defined strains of *Streptococcus suis* by genome fingerprinting. J. Clin. Microbiol. **28**:2462-2466.

[23] **Beaudoin, M., J. Harel, R. Higgins, M. Gottschalk, M. Frenette et J. I. MacInnes.** 1992. Molecular analysis of isolates of *Streptococcus suis* capsular type 2 by restriction-endonuclease-digested DNA separated on SDS-PAGE and by hybridization with an rDNA probe. J. Gen. Microbiol. **138**:2639-2645.

[24] **Hampson, D. J., D. J. Trott, I. L. Clarke, C. G. Mwaniki et I. D. Robertson.** 1993. Population structure of Australian isolates of *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol. **31**:2895-2900.

[25] **Mwaniki, C. G., I. D. Robertson, D. J. Trott, R. F. Atyeo, B. J. Lee et D. J. Hampson.** 1994. Clonal analysis and virulence of Australian isolates of *Streptococcus suis* type 2. Epidemiol. Infect. **113**:321-334.

[26] **Harel, J., R. Higgins, M. Gottschalk et M. Bigras-Poulin.** 1994. Genomic relatedness among reference strains of different *Streptococcus suis* serotypes. Can. J. Vet. Res. **58**:259-262.

[27] **Okwumabua, O., J. Staats et M. M. Chengappa.** 1995. Detection of genomic heterogeneity in *Streptococcus suis* isolates by DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes (ribotyping). J. Clin. Microbiol. **33**:968-972.

[28] **Smith, H. E., M. Rijnsburger, N. Stockhofe-Zurwieden, H. J. Wisselink, U. Vecht et M. A. Smits.** 1997. Virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 1 can be recognized by a unique ribotype profile. J. Clin. Microbiol. **35**:1049-1053.

[29] **Chatellier, S., J. Harel, Y. Zhang, M. Gottschalk, R. Higgins, L. A. Devriese et R. Brousseau.** 1998. Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. Int. J. Syst. Bacteriol. **sous presse**.

[30] **Staats, J. J., B. L. Plattner, J. Nietfeld, S. Dritz et M. M. Chengappa.** 1998. Use of ribotyping and hemolysin activity to identify highly virulent *Streptococcus suis* type 2 isolates. J. Clin. Microbiol. **36**:15-19.

[31] **Beaudoin, M., Higgins, R., Harel, J. and Gottschalk, M.** 1992. Studies on a murine model for evaluation of virulence of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates. FEMS Microbiol. Lett. **78**:111-116.

[32] **Williams, A. E., Blakemore, W. F. and Alexander, T. J.** 1988. A murine model of *Streptococcus suis* type 2 meningitis in the pig. Res. Vet. Sci. **45**:394-399.

[33] **Robertson, I. D. et D. K. Blakemore.** 1990. Experimental studies on the comparative infectivity and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2. II. Porcine and human isolates in laboratory animals. Epidemiol. Infect. **105**:479-484.

[34] **Kataoka, Y., M. Haritani, M. Mori, M. Kishima, C. Sugimoto, M. Nakazawa et K. Yamamoto.** 1991. Experimental infections of mice and pigs with *Streptococcus suis* type 2. J. Vet. Med. Sc. **53**:1043-1049.

[35] **Vecht, U., N. Stockhofezurwieden, B. J. Tetenburg, H. J. Wisselink et H. E. Smith.** 1997. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 for mice and pigs appeared host-specific. Vet. Microbiol. **58**:53-60.

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

[37] **Touil, F. et R. Higgins.** 1988. Les infections à *Streptococcus suis* chez l'espèce porcine: revue de la littérature. Méd. Vét. Québec **18**:25-33.

[38] **Galina, L., J. E. Collins et C. Pijoan.** 1992. Porcine *Streptococcus suis* in Minnesota. J. Vet. Diagn. Invest. **4**:195-196.

[39] **Kataoka, Y., C. Sugimoto, M. Nakazawa, T. Morozumi et M. Kashiwazaki.** 1993. The epidemiological studies of *Streptococcus suis* infections in Japan from 1987 to 1991. J. Vet. Med. Sc. **55**:623-626.

[40] **Prieto, C., F. J. Garcia, P. Suarez, M. Imaz et J. M. Castro.** 1994. Biochemical traits and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughtered pigs. Zentralbl. Vet. B **41**:608-617.

[41] **Higgins, R. et M. Gottschalk.** 1997. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1996. Can. Vet. J. **38**:302.

[42] **Vecht, U., H. J. Wisselink, J. E. van Dijk et H. E. Smith.** 1992. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. Infect. Immun. **60**:550-556.

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

[44] **Sanford, S. E. et M. E. Tilker.** 1982. *Streptococcus suis* type II-associated diseases in swine: observations of a one-year study. J. Am. Vet. Med. Ass. **181**:673-676.

[45] **Touil, F., R. Higgins et M. Nadeau.** 1988. Isolation of *Streptococcus suis* from diseased pigs in Canada. Vet. Microbiol. **17**:171-177.

[46] **Chanter, N., P. W. Jones et T. J. Alexander.** 1993. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis*--a speculative review. Vet. Microbiol. **36**:39-55.

[47] **Katsumi, M., Y. Kataoka, T. Takahashi, N. Kikuchi et T. Hiramune.** 1997. Bacterial isolation from slaughtered pigs associated with endocarditis, especially the isolation of *Streptococcus suis*. J. Vet. Med. Sc. **59**:75-78.

[48] **Reams, R. Y., D. D. Harrington, L. T. Glickman, H. L. Thacker et T. B. Bowersock.** 1995. Fibrinohemorrhagic pneumonia in pigs naturally infected with *Streptococcus suis*. J. Vet. Diagn. Invest. **7**:406-408.

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

[50] **Vecht, U., H. J. Wisselink, J. Anakotta et H. E. Smith.** 1993. Discrimination between virulent and nonvirulent *Streptococcus suis* type 2 strains by enzyme-linked immunosorbent assay. Vet. Microbiol. **34**:71-82.

[51] **Gottschalk, M., A. Lebrun, H. Wisselink, J. D. Dubreuil, H. Smith et U. Vecht.** 1998. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. Can. J. Vet. Res. **65**:71-74.

[52] **del Campo Sepúlveda, E. M., E. Altman, M. Kobisch, D. A. S et M. Gottschalk.** 1996. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. Vet. Microbiol. **52**:113-125.

[53] **Blouin, C., R. Higgins, M. Gottschalk et J. Simard.** 1994. Evaluation of the antibody response in pigs vaccinated against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. Can. J. Vet. Res. **58**:49-54.

[54] **Clifton-Hadley, F. A. et M. R. Enright.** 1984. Factors affecting the survival of *Streptococcus suis* type 2. Vet. Rec. **117**:585-587.

[55] **Clifton-Hadley, F. A. et T. J. L. Alexander.** 1980. The carrier site and carrier rate of *Streptococcus suis* type 2 in pigs. Vet. Rec. **107**:40-41.

[56] **Clifton-Hadley, F. A., T. J. L. Alexander, I. Upton et W. P. H. Duffus.** 1984. Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs. Vet. Rec. **114**:513-518.

[57] **Mwaniki, C. G., I. D. Robertson et D. J. Hampson.** 1994. The prevalence of *Streptococcus suis* type 2 in Western Australian piggeries. Austr. Vet. J. **71**:385-386.

[58] **Elliott, S. D., T. J. L. Alexander et J. H. Thomas.** 1966. Streptococcal infection in young pigs. II. Epidemiology and experimental production of the disease. J. Hyg. Camb. **64**:213-220.

[59] **Robertson, I. D., D. K. Blackmore, D. J. Hampson et Z. F. Fu.** 1991. A longitudinal study of natural infection of piglets with *Streptococcus suis* types 1 and 2. Epidemiol. Infect. **107**:119-126.

[60] **Enright, M. R., T. J. L. Alexander et F. A. Clifton-Hadley.** 1987. Role of houseflies (*Musca domestica*) in the epidemiology of *Streptococcus suis* type 2. Vet. Rec. **121**:132-133.

[61] **Sala, V., A. Colombo et L. Gerola.** 1989. Infection risks of *Streptococcus suis* type 2 localizations in slaughtered swine. Arch. Vet. Ital. **40**:180-184.

[62] **Hommez, J., J. Wullepit, P. Cassimon, F. Castryck, K. Ceyssens et L. A. Devriese.** 1988. *Streptococcus suis* and other streptococcal species as a cause of extramammary infection in ruminants. Vet. Rec. **123**:626-627.

[63] **Devriese, L. A. et F. Haesebrouck.** 1992. *Streptococcus suis* infections in horses and cats. Vet. Rec. **130**:380.

[64] **Devriese, L. A., J. I. C. Cruz-Colque, P. De Herdt et F. Haesebrouck.** 1992. Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats. J. Appl. Bacteriol. **73**:421-425.

[65] **Devriese, L. A., M. Desmidt, S. Roels, J. Hoorens et F. Haesebrouck.** 1993. *Streptococcus suis* infection in fallow deer. Vet. Rec. **132**:283.

[66] **Keymer, I. F., S. E. Heath et J. G. P. Wood.** 1983. *Streptococcus suis* type II infection in a racoon dog (*Nyctereutes procyonoide*), family *Canidae*. Vet. Rec. **113**:624.

[67] **Devriese, L. A., F. Haesebrouck, P. De Herdt, P. Dom, R. Ducatelle, M. Desmidt, S. Messier et R. Higgins.** 1994. *Streptococcus suis* infections in birds. Avian Pathol. **23**:721-724.

[68] **Arends, J. P. et H. Zanen.** 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. Rev. Infect. Dis. **10**:131-137.

[69] **Perseghin, P., G. Bezzi, P. Troupioti et M. Gallina.** 1995. *Streptococcus suis* meningitis in an Italian blood donor. Lancet, **346**:1305-1306.

[70] **Michaud, S., R. Duperval et R. Higgins.** 1996. *Streptococcus suis* meningitis: first case reported in Québec. Can. J. Infect. Dis. **7**:329-331.

[71] **Bezian, M. C., B. S. Diallo, A. Chachia, C. Gabinski et J. Beylot.** 1996. Fulminant purpura during *Streptococcus suis* meningitis and septiceamia. Méd. Malad. Infect. **26**:349-351.

[72] **Walsh, B., A. E. Williams et J. Satsangi.** 1992. *Streptococcus suis* type 2: pathogenesis and clinical disease. Rev. Med. Microbiol. **3**:65-71.

[73] **Büngener, W. et R. Bialek.** 1989. Fatal *Streptococcus suis* septicemia in an abattoir worker. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **8**:306-308.

[74] **Peetermans, W. E. C., B. G. Moffie et J. Thompson.** 1989. Bacterial endocarditis caused by *Streptococcus suis* type 2. J. Infect. Dis. **159**:595-596.

[75] **Trottier, S., R. Higgins, G. Brochu et M. Gottschalk.** 1991. A case of human endocarditis due to *Streptococcus suis* in North America. Rev. Infect. Dis. **13**:1251-1252.

[76] **Williams, D. M., G. H. K. Lawson et A. C. Rowland.** 1973. Streptococcal infection in piglets: the palatin tonsils as portals of entry for *Streptococcus suis*. Res. Vet. Sci. **15**:352-362.

[77] **Windsor, R. S.** 1977. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis* type II. Vet. Rec. **101**:378-379.

[78] **Williams, A. E. et W. F. Blakemore.** 1990. Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. J. Infect. Dis. **162**:474-481.

[79] **Williams, A. E.** 1989. Studies on the pathogenesis of *Streptococcus suis* type 2 in the pig. Thèse de Ph. D., University of Cambridge, Cambridge, UK.

[80] **Williams, A. E. et W. F. Blakemore.** 1990. Pathology of streptococcal meningitis following intravenous, intracisternal and natural routes of infection. Neuropathol Appl. Neurobiol. **16**:345-356.

[81] **Williams, A. E. et W. F. Blakemeore.** 1990. Monocyte-mediated entry of pathogens into the central nervous system. Neuropathol Appl. Neurobiol. **16**:377-392.

[82] **Alexander, T. J. L.** 1995. *Streptococcus suis*: pathogenesis and host response. Presenté à the Allen D. Leman Swine Conference, Minnesota.

[83] **Lamont, M. H., P. T. Edwards et R. S. Windsor.** 1980. Streptococcal meningitis in pigs: results of a five-year survey. Vet. Rec. **107**:467-469.

[84] **Vecht, U., H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden et H. E. Smith.** 1996. Characterization of virulence of the *Streptococcus suis* serotype 2 reference strain Henrichsen S 735 in newborn gnotobiotic pigs. Vet. Microbiol. **51**:125-136.

[85] **Walton, J. R.** 1988. The right to prescribe. Vet. Rec. **123**:209.

[86] **del Castillo, J., G.-P. Martineau, S. Messier et R. Higgins.** 1995. The use of pharmacokinetics to implement penicillin prophylaxis for streptococcal diseases. Presenté à the Allen D. Leman Swine Conference, Minnesota.

[87] **Johnston, P. I., M. Lavery et J. C. Braidwood.** 1990. Penicillins: stability and efficacy in-feed. Pig Vet. J. **24**:65-71.

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

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

[90] **Seol, B., Z. Kelneric, D. Hajsig, J. Madic et T. Naglic.** 1996. Susceptibility to antimicrobial agents of *Streptococcus suis* capsular type 2 strains isolated from pigs. Zentralbl. Bakteriol. **283**:328-331.

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

[92] **Stuart, J. G., E. J. Zimmerer et R. L. Maddux.** 1992. Conjugation of antibiotic resistance in *Streptococcus suis*. Vet. Microbiol. **30**:213-222.

[93] **Wasteson, Y., S. Hoie et M. C. Roberts.** 1994. Characterization of antibiotic resistance in *Streptococcus suis*. Vet. Microbiol. **41**:41-49.

[94] **Turgeon, P. L., R. Higgins, M. Gottschalk et M. Beaudoin.** 1994. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates. Br. Vet. J. **150**:263-269.

[95] **Salmon, S. A., J. L. Watts, C. A. Case, L. J. Hoffman, H. C. Wegener et R. J. Yancey.** 1995. Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from United States, Canada and Denmark. J. Clin. Microbiol. **33**:2435-2444.

[96] **Amass, S. F., C. C. Wu et L. K. Clark.** 1996. Evaluation of antibiotics for the elimination of the tonsillar carrier state of *Streptococcus suis* in pigs. J. Vet. Diagn. Invest. **8**:64-67.

[97] **Beachey, E. H.** 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating attachment of bacteria to mucosal surfaces. J. Infect. Dis. **143**:325-345.

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

[99] **Gottschalk, M., A. Lebrun, M. Jacques et R. Higgins.** 1990. Hemagglutination properties of *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol. **28**:2156-2158.

[100] **Haataja, S., K. Tikkanen, J. Liukkonen, C. Francois-Gerard et J. Finne.** 1993. Characterization of a novel bacterial adhesion specificity of *Streptococcus suis* recognizing blood group P receptor oligosaccharides. J. Biol. Chem. **268**:4311-4317.

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

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

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

[104] **Handley, P. S., P. L. Carter, J. E. Wyatt et L. M. Hesketh.** 1985. Surface structures (peritrichous fibrils and tufts of fibrils) found on *Streptococcus sanguis* strains may be related to their ability to coaggregate with other oral genera. Infect. Immun. **47**:217-227.

[105] **Arends, J. P. et H. C. Zanen.** 1985. A subtype of *Streptococcus suis* type 2 isolated from cases of meningitis in man and pigs. *Dans* Y. Kimuro (ed.), Recent advances in streptococci and streptococcal diseases, p. 343-344.

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

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

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

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

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

[111] **Vecht, U., H. J. Wisselink, F. H. Reek, N. Stockhofe-Zurwieden et H. E. Smith.** 1996. Diagnosis of several capsular serotypes of *Streptococcus suis* by phenotype and PCR and the relation with virulence for pigs. Presenté à 14th International Pig Veterinary Society Congress, Bologne, Italie, 7-10 juillet 1996.

[112] **Smith, H. E., U. Vecht, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, Y. Biermann et M. A. Smits.** 1996. Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs. Infect. Immun. **64**:4409-4412.

[113] **Welch, R. A., E. P. Dellinger, B. Minshew et S. Falkow.** 1981. Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. Nature, **294**:665-667.

[114] **Alouf, J. E.** 1980. Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenis toxin). Pharmacol. Ther. **11**:661-717.

[115] **Inzana, T. J.** 1990. Capsules and virulence in the HAP group of bacteria. Can. J. Vet. Res. **54**:S22-S27.

[116] **Hommez, J., L. A. Devriese, F. Castryck et C. Miry.** 1991. Beta-hemolytic streptococci from pigs: bacteriological diagnosis. Zentralbl. Vet. B **38**:441-444.

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

[118] **Gottschalk, M. G., S. Lacouture et J. D. Dubreuil.** 1995. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. Microbiology, **141**:189-195.

[119] **Feder, I., M. M. Chengappa, B. Fenwick, M. Rider et J. Staats.** 1994. Partial characterization of *Streptococcus suis* type 2 hemolysin. J. Clin. Microbiol. **32**:1256-1260.

[120] **Alouf, J. E. et C. Geoffroy.** 1991. The family of the antigenically-related cholesterol-binding ("sulphydryl-activated") cytolytic toxins. *Dans* Sourcebook of bacterial protein toxins, Academic Press, New York, NY, p. 147-186.

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

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

[123] **Odierno, L., M. Lalonde, J. Harel et M. Gottschalk.** 1997. Production and characterization of weakly hemolytic isogenic mutants of *Streptococcus suis* capsular type 2. Presenté à Conference of Research Workers in Animal Diseases, Chicago, Il, 10-11 novembre 1997.

[124] **Serhir, B., R. Higgins, B. Foiry et M. Jacques.** 1993. Detection of immunoglobulin-G-binding proteins in *Streptococcus suis*. J. Gen. Microbiol. **139**:2953-2958.

[125] **Reader, R. et M. D. Boyle.** 1993. Association of type II immunoglobulin G-binding protein expression and survival of group A streptococci in human blood. Infect. Immun. **61**:3696-3702.

[126] **Widders, P. R.** 1990. Fc receptors and the pathogenesis of bacterial infections in animals. *Dans* M. D. P. Boyle (ed.), Bacterial immunoglobulin binding proteins, vol. 1. Academic Press, San Diego, CA, p. 155-164.

[127] **Benkirane, R., M. Gottschalk, M. Jacques et J. D. Dubreuil.** 1998. Immunochemical characterization of an IgG-binding protein of *Streptococcus suis*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **20**:121-127.

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

[129] **Scott, J. H., S. Abraham, M. Caparon, P. Falk, J. W. I. St. Geme et S. Normark.** 1993. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. Cell, **73**:887-901.

[130] **Quessy, S., J. D. Dubreuil, M. Jacques, F. Malouin et R. Higgins.** 1994. Increase of capsular material thickness following in vivo growth of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains. FEMS Microbiol. Lett. **115**:19-26.

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

[132] **Pancholi, V. et V. Fischetti.** 1992. A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. J. Exp. Med. **176**:415-426.

[133] **Kaufmann, S. H., B. Schoel, J. D. van Embden, T. Koga, A. Wand-Wurttenberger, M. E. Munk et U. Steinhoff.** 1991. Heat-shock protein 60: Implication for pathogenesis of and protection against bacterial infections. Immunol. Rev. **121**:67-90.

[134] **Benkirane, R., M. G. Gottschalk et J. D. Dubreuil.** 1997. Identification of a *Streptococcus suis* 60-kDa heat-shock protein using Western blotting. FEMS Microbiol. Lett. **153**:379-385.

[135] **Yamaguchi, M., M. Miyake, H. Nishiya et M. Noda.** 1994. A cytotoxic factor of *Streptococcus suis* isolated from a septicemia patient. Jap. J. Med. Sc. Biol. **47**:318-319.

[136] **Moxon, E. R. et J. S. Kroll.** 1990. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **150**:65-85.

[137] **Katsumi, M., T. Saito, Y. Kataoka, T. Itoh, N. Kikuchi et T. Hiramune.** 1996. Comparative preparation methods of sialylated capsule antigen from *Streptococcus suis* type 2 with type specific antigenicity. J. Vet. Med. Sc. **58**:947-952.

[138] **Costerton, J. W., R. T. Irvin et K.-J. Cheng.** 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. Ann. Rev. Microbiol. **35**:299-324.

[139] **Ørskov, I., A. Birch-Andersen, J. P. Duguid, J. Stenderup et F. Ørskov.** 1985. An adhesive protein capsule of *Escherichia coli*. Infect. Immun. **47**:191-200.

[140] **Salyers, A. A.** 1994. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. ASM Press, Washington, D. C.

[141] **Bayer, M. E. et M. H. Bayer.** 1994. Biophysical and structural aspects of the bacterial capsule. ASM News, **60**:192-198.

[142] **Roberts, I. S.** 1995. Bacterial polysaccharides in sickness and in health. Microbiology **141**:2023-2031.

[143] **Henrichsen, J.** 1995. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. **33**:2759-2762.

[144] **Ørskov, F. et I. Ørskov.** 1992. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. Can. J. Microbiol. **38**:699-704.

[145] **Higgins, R. et M. Gottschalk.** 1995. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1994. Can. Vet. J. **36**:320.

[146] **Kasper, D. L., L. J. Winkelhake, W. D. Zollinger, B. L. Brandt et M. S. Artenstein.** 1973. Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of *Escherichia coli* O7:K1 (L):NM and group B *Neisseria meningitidis*. J. Immunol. **110**:262-268.

[147] **Jann, B. et K. Jann.** 1990. Structure and biosynthesis of the capsular antigens of *Escherichia coli*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **150**:19-42.

[148] **Gottschalk, M., J. Kolberg, N. Charland et M. Jacques.** 1995. *Streptococcus pneumoniae* types 19A and 19F and *Streptococcus suis* capsular type 8 share common capsular epitopes. J. Clin. Microbiol. **33**:2492-2495.

[149] **Bell, G. I.** 1978. Models for the specific adhesion of cells to cells. Science, **200**:618-627.

[150] **Ophir, T. et D. L. Gutnick.** 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of micro-organisms from desiccation. Appl. Env. Microbiol. **60**:740-745.

[151] **Bacon, B. E., R. Cherniak, K. J. Kwon-Chung et E. S. Jacobson.** 1996. Structure of the O-deacetylated glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* Cap70 as determined by 2D NMR spectroscopy. Carbohyd. Res. **283**:95-110.

[152] **Williams, I., W. A. Venables, D. Lloyd, F. Paul et I. Critchley.** 1997. The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. Microbiology, **143**:2407-2413.

[153] **MacLennan, M., G. Foster, K. Dick, W. J. Smith et B. Nielsen.** 1996. *Streptococcus suis* serotypes 7, 8 and 14 from diseased pigs in Scotland. Vet. Rec. **139**:423-424.

[154] **Bayston, R. et E. Lambert.** 1997. Duration of protective activity of cerebrospinal fluid shunt catheters impregnated with antimicrobial agents to prevent bacterial catheter-related infection. J. Neurosurg. **87**:247-251.

[155] **Goldstein, I. J., H. C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa et N. Sharon.** 1980. What should be called a lectin? Nature, **285**:66.

[156] **Kolenbrander, P. E.** 1993. Coaggregation of human oral bacteria: potential role in the accretion of plaque. J. Appl. Bacteriol. **22**:79-86.

[157] **Jenkinson, F. F.** 1994. Adherence and accumulation of oral streptococci. Trends Microbiol. **2**:209-212.

[158] **Absolom, R.** 1988. The role of bacterial hydrophobicity in infection: bacterial adhesion and phagocytic ingestion. Can. J. Microbiol. **34**:287-298.

[159] **Lopez-Torres, A. J. et V. Stout.** 1996. Role of colanic acid polysaccharide in serum resistance in vivo and in adherence. Curr. Microbiol. **33**:383-389.

[160] **Gibson, R. L., M. K. Lee, C. Soderland, E. Y. Chi et C. E. Rubens.** 1993. Group B streptococci invade endothelial cells: type III capsular polysaccharide attenuates invasion. Infect. Immun. **61**:478-485.

[161] **Granlund-Edstedt, M., M. Sellin, A. Holm et S. Hakansson.** 1993. Adherence and surface properties of buoyant density subpopulations of group B streptococci, type III. Apmis, **101**:141-148.

[162] **Kallman, J., J. Schollin, S. Hakansson, A. Andersson et E. Kihlstrom.** 1993. Adherence of group B streptococci to human endothelial cells in vitro. Apmis, **101**:403-408.

[163] **Fuhrmann, C., I. Soedarmanto et C. Lammler.** 1997. Studies on the rodcoccus life cycle of *Rhodococcus equi.* Zentralbl. Vet. B **44:**287-294.

[164] **St. Geme, J. W. I. et S. Falkow.** 1991. Loss of capsule expression by *Haemophilus influenzae* type b results in enhanced adherence to and invasion of human cells. Infect. Immun. **59:**1325-1333.

[165] **Virji, M., H. Kayhty, D. J. P. Ferguson, C. Alexandrescu et E. R. Moxon.** 1991. Interactions of *Haemophilus influenzae* with cultured human endothelial cells. Microb. Pathog. **10:**231-245.

[166] **Hammerschmidt, S., R. Hilse, J. P. van Putten, R. Gerardy-Schahn, A. Unkmeir et M. Frosch.** 1996. Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. EMBO J. **15:**192-198.

[167] **Ibrahim, A. S., S. G. Filler, M. S. Alcouloumre, T. R. Kozel, J. E. Edwards, Jr. et M. A. Ghannoum.** 1995. Adherence to and damage of endothelial cells by *Cryptococcus neoformans* in vitro: role of the capsule. Infect. Immun. **63:**4368-4374.

[168] **LiPuma, J. J. et J. R. Gilsdorf.** 1987. Role of capsule in adherence of *Haemophilus influenzae* type b to human buccal epithelial cells. Infect. Immun. **55:**2308-2310.

[169] **Geelen, S., C. Bhattacharyya et E. Tuomanen.** 1993. The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. Infect. Immun. **61:**1538-1543.

[170] **Pruimboom, I. M., R. B. Rimler, M. R. Ackermann et K. A. Brogden.** 1996. Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to turkey air sac macrophages. Avian Dis. **40:**887-893.

[171] **Favre-Bonte, S., A. Darfeuille-Michaud et C. Forestier.** 1995. Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human intestine-407 cells. Infect. Immun. **63:**1318-1328.

[172] **Abbas, A. K., A. H. Litchman et J. S. Pober.** 1994. Cellular and molecular immunology, 2ième ed. W. B. Saunders Company, Philadelphie, PA.

[173] **Van Emmerik, L. C., E. J. Kuijper, C. A. P. Fijen, J. Dankert et S. Thiel.** 1994. Binding of mannan-binding protein to various bacterial pathogens of meningitis. Clin. Exp. Immunol. **97**:411-416.

[174] **Lu, J., S. Thiel, H. Wiedemann, R. Timpl et K. M. B. Reid.** 1990. Binding of pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r2C1s2 complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. J. Immunol. **144**:2287-2294.

[175] **Schweinle, J. E., R. A. B. Ezekowitz, A. J. Tenner, M. Kulhman et K. A. Joiner.** 1989. Human mannose-binding protein activates the alternative complement pathway and enhances serum bactericidal activity on mannose-rich isolate of *Salmonella*. J. Clin. Invest. **84**:1821-1829.

[176] **Lu, J. H.** 1997. Collectins-collectors of microorganisms for the innate immune system. Bioessays, **19**:509-518.

[177] **Fearon, D. T.** 1978. Regulation by membrane sialic acid of β1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **75**:1971-1975.

[178] **Brown, E. J.** 1985. Interaction of Gram-positive microorganisms with complement. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **121**:159-187.

[179] **Howard, C. J. et A. A. Glynn.** 1971. The virulence for mice of strains of *Escherichia coli* related to the effect of K antigens on their resistance to phagocytosis and killing by complement. Immunology, **20**:767-777.

[180] **Blaser, M. J., P. F. Smith, J. Repin et K. A. Joiner.** 1988. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. II. Failure of encapsulated *Campylobacter fetus* to bind C3b explains serum and phagocytosis resistance. J. Clin. Invest. **81**:1424-1444.

[181] **Roberts, I. S.** 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. Ann. Rev. Microbiol. **50**:285-315.

[182] **Marques, M. B., D. L. Kasper, M. K. Pangburn et M. R. Wessels.** 1992. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. Infect. Immun. **60**:3986-3993.

[183] **Wilkinson, B. J., S. P. Sisson, Y. Kim et P. K. Peterson.** 1979. Localization of the third component of complement on the cell wall of encapsulated *Staphylococcus aureus* M: implications for the mechanism of resistance to phagocytosis. Infect. Immun. **26**:1159-1163.

[184] **Moxon, E. R., J. F. Goldthorn et A. D. Schwartz.** 1980. *Haemophilus influenzae* infection in rats: effect of splenectomy on bloodstream and meningeal invasion after intravenous and intranasal inoculations. Infect. Immun. **27**:872-875.

[185] **Brown, E. J., S. W. Hosea et M. M. Frank.** 1983. The role of antibody and complement in the reticuloendothelial clearance of pneumococci from the bloodstream. Rev. Infect. Dis. **5**:S797-S805.

[186] **Williams, A. E., D. J. Maskell et E. R. Moxon.** 1991. Relationship between intracellular survival in macrophages and virulence of *Haemophilus influenzae* type b. J. Infect. Dis. **163**:1366-1369.

[187] **McNeil, G., M. Virji et E. R. Moxon.** 1994. Interactions of *Neisseria meningitidis* with human monocytes. Microb. Pathog. **16**:153-163.

[188] **Nilsson, I.-M., J. C. Lee, T. Bremell, C. Rydén et A. Tarkowski.** 1997. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. Infect. Immun. **65**:4216-4221.

[189] **Shimoji, Y., Y. Yokomizo et Y. Mori.** 1996. Intracellular survival and replication of *Erysipelothrix rhusiopathiae* within murine macrophages: failure of induction of the oxidative burst of macrophages. Infect. Immun. **64**:1789-1793.

[190] **Rubens, C. E., L. M. Heggen, R. F. Haft et M. R. Wessels.** 1993. Identification of *cpsD*, a gene essential for type III capsule expression in group B streptococci. Mol. Microbiol. **8**:843-855.

[191] **Wessels, M. R., R. F. Haft, L. M. Heggen et C. E. Rubens.** 1992. Identification of a genetic locus essential for capsule sialylation in type III group B streptococci. Infect. Immun. **60**:392-400.

[192] **Segura, M. A., P. Cléroux et M. Gottschalk.** 1998. *Streptococcus suis* and Group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **sous presse**.

[193] **Finlay, B. B. et S. Falkow.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**:136-169.

[194] **Bellinger-Kawahara, C. et M. A. Horwitz.** 1990. Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. J. Exp. Med. **172**:1201-1210.

[195] **Schlesinger, L. S. et M. A. Horwitz.** 1994. A role for natural antibody in the pathogenesis of leprosy: antibody in nonimmune serum mediates C3 fixation to the *Mycobacterium leprae* surface and hence phagocytosis by human mononuclear phagocytes. Infect. Immun. **62**:280-289.

[196] **Kiehlbauch, J. A., R. A. Albach, L. L. Baum et K. P. Chang.** 1985. Phagocytosis of *Campylobacter jejuni* and its intracellular survival in mononuclear phagocytes. Infect. Immun. **48**:446-451.

[197] **De Herdt, P., F. Haesebrouck, G. Charlier, R. Ducatelle, L. A. Devriese et G. Vandenbossche.** 1995. Intracellular survival and multiplication of virulent and less virulent strains of *Streptococcus bovis* in pigeon macrophages. Vet. Microbiol. **45**:157-169.

[198] **Ishibashi, Y. et T. Arai.** 1990. Roles of the complement receptor type 1 (CR1) and type 3 (CR3) on phagocytosis and subsequent phagosome-lysosome fusion in *Salmonella*-infected murine macrophages. FEMS Microbiol. Immunol. **2**:89-96.

[199] **Anderson, J. C. et M. R. Williams.** 1985. The contribution of a capsule to survival of staphylococci within bovine neutrophils. J. Med. Microbiol. **20**:317-323.

[200] **Valentin-Weigand, P., P. Benkel, M. Rohde et G. S. Chhatwal.** 1996. Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 macrophages. Infect. Immun. **64**:2467-2473.

[201] **Antal, J. M., J. V. Cunningham et K. J. Goodrum.** 1992. Opsonin-independent phagocytosis of group B streptococci: role of complement receptor type three. Infect. Immun. **60:**1114-1121.

[202] **Cywes, C., H. C. Hoppe, M. Daffé et M. R. W. Ehlers.** 1997. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. Infect. Immun. **65:**4258-4266.

[203] **Ferrante, A., L. J. Beard et R. G. Feldman.** 1990. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. Pediatr. Infect. Dis. J. **9:**S16-S24.

[204] **Pier, G. B. et R. B. Markham.** 1982. Induction in mice of cell mediated immunity to *Pseudomonas aeruginosa* by high molecular weight polysaccharide and vinblastine. J. Immunol. **128:**2121-2125.

[205] **Onderdonk, A. B., R. B. Markham, D. F. Zaleznik, R. L. Cisneros et D. L. Kasper.** 1982. Evidence for T cell dependent immunity to *Bacteroides fragilis* in an intraabdominal abscess model. J. Clin. Invest. **69:**9-16.

[206] **Shapiro, M. E., A. B. Onderdonk et D. L. Kasper.** 1982. Cellular immunity to *Bacteroides fragilis* capsular polysaccharide. J. Exp. Med. **155:**1188-1197.

[207] **Greenwood, B. M.** 1984. Selective primary health care:strategies for control of disease in the developing world. XIII. Acute bacterial meningitis. Rev. Infect. Dis. **6:**374-389.

[208] **Lifely, M. R., C. Moreno et J. C. Lindon.** 1987. An integrated molecular and immunological approach towards a meningococcal group B vaccine. Vaccine, **5:**11-26.

[209] **Peltola, H., T. Kilpi et M. Anttila.** 1992. Rapid disappearance of *Haemophilus influenzae* type b meningitis after routine childhood immunisation with conjugate vaccines. Lancet, **340:**592-594.

[210] **Domenico, P., R. J. Salo, A. S. Cross et B. A. Cunha.** 1994. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. Infect. Immun. **62:**4495-4499.

[211] **Swartley, J. S., A. A. Marfin, S. Edupuganti, L.-J. Liu, P. Cieslak, B. Perkins, J. D. Wenger et D. S. Stephens.** 1997. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **94**:271-276.

[212] **Kroll, J. S. et E. R. Moxon.** 1990. Capsulation in distantly related strains of *Haemophilus influenzae* type b: genetic drift and gene transfer. J. Bacteriol. **172**:1374-1379.

[213] **Coffey, T. J., C. G. Dowson, M. Daniels, J. Zhou, C. Martin, B. G. Spratt et J. M. Musser.** 1991. Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. Mol. Microbiol. **5**:2255-2260.

[214] **Cross, A. S.** 1990. The biological significance of bacterial encapsulation. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **150**:87-95.

[215] **Kim, K. S., J. H. Kang et A. S. Cross.** 1986. The role of capsular antigens in serum resistance and in vivo virulence of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **35**:275-278.

[216] **Nosanchuk, J. D. et A. Casadevall.** 1997. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. Infect. Immun. **65**:1836-1841.

[217] **Nomura, S., K. Murata et A. Nagayama.** 1995. Effects of sub-minimal inhibitory concentrations of antimicrobial agents on the cell surface of *Klebsiella pneumoniae* and phagocytic killing activity. J. Chemother. **7**:406-413.

[218] **Horwitz, M. A. et S. C. Silverstein.** 1980. Influence of the *Escherichia coli* capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. J. Clin. Invest. **65**:82-94.

[219] **Schauer, R.** 1982. Sialic acids: Chemistry, metabolism and function, vol. 10. Springer-Verlag, New York, NY.

[220] **Blix, G., L. Svennerholm et I. Werner.** 1952. The isolation of chondrosamine from gangliosides and from submaxillary mucin. Acta Chem. Scand. **6**:358-363.

[221] **Varki, A.** 1997. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. FASEB J. **11**:248-255.

[222] **Stryer, L.** 1988. Biochemistry, 3ième ed. W. H. Freeman and Company, New York, NY.

[223] **Dietzschold, B.** 1977. Oligosaccharides of the glycoprotein of rabies virus. J. Virol. **23**:286-293.

[224] **Jennings, H. J., A. K. Bhattacharjee, D. R. Bundle, C. P. Kenny, A. Martin et I. C. P. Smith.** 1977. Structures of the capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* as determined by 13C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. J. Infect. Dis. **Suppl.**:S78-S83.

[225] **Ørskov, F., I. Ørskov, A. Sutton, R. Schneerson, W. Liu, W. Egan, G. E. Hoff et J. B. Robbins.** 1979. Form variation in *Escherichia coli* K1:determined by O-acetylation of the capsular polysaccharides. J. Exp. Med. **149**:669-685.

[226] **Hall, B. F. et K. A. Joiner.** 1993. Developmentally-regulated virulence factors of *Trypanosoma cruzy* and their relationship to evasion of host defences. J. Eukar. Microbiol. **40**:207-213.

[227] **Seed, T. M., M. Aikawa, C. Sterling et J. Rabbege.** 1974. Surface properties of extracellular malaria parasites: mophological and cytochemical study. Infect. Immun. **9**:750-756.

[228] **Schauer, R.** 1985. Sialic acids and their role as biological masks. Trends Biochem. Sc. **10**:357-360.

[229] **Kanwar, Y. S. et M. G. Farquhar.** 1980. Detachment of endothelium and epithelium from the glomerular basement membrane produced by kidey perfusion with neuraminidase. Lab. Invest. **42**:375-384.

[230] **Kemp, R. B.** 1970. The effect of neuraminidase (3:2:1:18) on the aggregation of cells dissociated from embryonic chick muscle tissue. J. Cell Sci. **6**:751-766.

[231] **Durocher, J. R., R. C. Payne et M. E. Conrad.** 1975. Role of sialic acid in erythrocyte survival. Blood, **45**:11-20.

[232] **Frosch, M., C. Weisgerber et T. Meyer.** 1989. Molecular characterization and expression in *Escherichia coli* of the gene complex encoding the polysaccharide capsule of *Neisseria meningitidis* group B. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **86:**1669-1673.

[233] **Wessels, M. R., V. Pozsgay, D. L. Kasper et H. J. Jennings.** 1987. Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsular polysaccharide of type III group B *Streptococcus*. J. Biol. Chem. **262:**8262-8267.

[234] **Edwards, M. S., D. L. Kasper, H. J. Jennings, C. J. Baker et A. Nicholson-Weller.** 1982. Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. J. Immunol. **128:**1278-1283.

[235] **Mandrell, R. E., H. Schneider, M. Apicella, W. Zollinger, P. A. Rice et J. M. Griffiss.** 1986. Antigenic and physical diversity of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharides. Infect. Immun. **54:**63-69.

[236] **Mandrell, R. E. et M. A. Apicella.** 1993. Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: molecular mimicry and host-modification of LOS. Immunobiology, **187:**382-402.

[237] **van Putten, J. P. M. et B. D. Robertson.** 1995. Molecular mechanisms and implications for infection of lipopolysaccharide variation in *Neisseria*. Mol. Microbiol. **16:**847-853.

[238] **Mandrell, R. E., H. Smith, G. A. Jarvis, J. M. Griffiss et J. A. Cole.** 1993. Detection and some properties of the sialyltransferase implicated in the sialylation of lipopolysaccharide of *Neisseria gonorrhoeae*. Microb. Pathog. **14:**307-313.

[239] **Mandrell, R. E., J. J. Kim, C. M. John, B. W. Gibson, J. V. Sugai, M. A. Apicella, J. M. Griffiss et R. Yamasaki.** 1991. Endogenous sialylation of the lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis*. J. Bacteriol. **173:**2823-2832.

[240] **Meri, S. et M. K. Pangburn.** 1990. Discrimination between activators and non-activators of the alternative pathway of complement: Regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **87**:3982-3986.

[241] **Pangburn, M. K. et H. J. Müller-Eberhard.** 1978. Complement C3 convertase: Cell surface restriction of β1H control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **75**:2416-2420.

[242] **Pilatte, Y., J. Bignon et C. R. Lambré.** 1993. Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. Glycobiology, **3**:201-217.

[243] **Kasper, D. L.** 1986. Bacterial capsule-Old dogmas and new tricks. J. Infect. Dis. **153**:407-415.

[244] **Shigeoka, A. O., N. S. Rote, J. I. Santos et H. R. Hill.** 1983. Assessment of the virulence factors of group B streptococci: Correlation with sialic acid content. J. Infect. Dis. **147**:857-863.

[245] **Wessels, M. R., C. E. Rubens, V.-J. Benedi et D. L. Kasper.** 1989. Definition of a bacterial virulence factor: Sialylation of the group B streptococcal capsule. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **86**:8983-8987.

[246] **Wibawan, W. T. et C. Lämmler.** 1991. Influence of capsular neuraminic acid on properties of streptococci of serological group B. J. Gen. Microbiol. **137**:2721-2725.

[247] **Vogel, U., A. Weinberger, R. Frank, A. Müller, J. Köhl, J. P. Atkinson et M. Frosch.** 1997. Complement factor C3 deposition and serum resistance in isogenic capsule and lipooligosaccharide sialic acid mutants of serogroup B *Neisseria meningitidis*. Infect. Immun. **65**:4022-4029.

[248] **Vogel, U., S. Hammerschmidt et M. Frosch.** 1996. Sialic acids of both the capsule and the sialylated lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup B are prerequisites for virulence of meningococci in the infant rat. Med. Microbiol. Immunol. **185**:81-87.

[249] **Jarvis, G. A.** 1994. Analysis of C3 deposition and degradation on *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Infect. Immun. **62**:1755-1760.

[250] **Kim, J. J., D. Zhou, R. E. Mandrell et J. M. Griffiss.** 1992. Effect of exogenous sialylation of the lipooligosaccharide of *Neisseria gonorrhoeae* on opsonophagocytosis. Infect. Immun. **60**:4439-4442.

[251] **Bruyn, G. A. W., B. J. M. Zegers et R. van Furth.** 1992. Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. Clin. Infect. Dis. **14**:251-262.

[252] **Vann, W. F., M. A. Schmidt, B. Jann et K. Jann.** 1981. The structure of the capsular polysaccharide (K5 antigen) of urinary tract infective *Escherichia coli* O10:K5:H4. A polymer similar to desulfo-heparin. Eur. J. Biochem. **116**:359-364.

[253] **Sugahara, K., N. B. Schwartz et A. Dorfman.** 1979. Biosynthesis of hyaluronic acid by *Streptococcus*. J. Biol. Chem. **254**:6252-6261.

[254] **Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et J. D. Watson.** 1989. Molecular biology of the cell, 2ième ed. Garland Publishing Inc., New York, NY.

[255] **Wyle, F., M. Arstein, B. L. Brandt, E. C. Tramont, D. L. Kasper, P. L. Altieri, S. L. Berman et J. P. Lowenthal.** 1972. Immunologic response of man to group B meningococcal polysaccharide vaccines. J. Infect. Dis. **126**:514-521.

[256] **Bhattacharjee, A. K., H. J. Jennings, C. P. Kenny, A. Martin et I. C. P. Smith.** 1975. Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance. J. Biol. Chem. **250**:1926-1932.

[257] **Finne, J., M. Leinonen et P. H. Mäkelä.** 1983. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Lancet, **2**:355-357.

[258] **Bitter-Suermann, D. et J. Roth.** 1987. Monoclonal antibodies to polysialic acid reveal epitope sharing between invasive pathogenic bacteria, differentiating cells and tumor cells. Immunol. Res. **6**:225-237.

[259] **Artenstein, M. S., B. L. Brandt, E. C. Tramont, W. C. J. Branche, H. D. FLeet et R. L. Cohen.** 1971. Serologic studies of meningococcal infection and polysaccharide vaccination. J. Infect. Dis. **124**:277-288.

[260] **Cross, A. S., W. Zollinger, R. Mandress, P. Gemski et J. Sadoff.** 1983. Evaluation of immunotherapeutic approaches for the potential treatment of infections caused by K1-positive *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. **147**:68-76.

[261] **Hurpin, C. M., E. D. Carosella et P.-A. Cazenave.** 1992. Bactericidal activity of two IgG_{2a} murine monoclonal antibodies with distinct fine specificities for group B *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide. Hybridoma, **11**:677-687.

[262] **Teti, G., M. Calapai, G. Calogero, F. Tomasello, G. Mancuso, A. Galli et G. Riggio.** 1992. Specificity and protective activity of murine monoclonal antibodies directed against the capsular polysaccharide of type III group B streptococci. Hybridoma, **11**:13-22.

[263] **Vimr, E., S. Steenbergen et M. Cieslewicz.** 1995. Biosynthesis of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1. J. Indust. Microbiol. **15**:352-360.

[264] **Whitfield, C. et M. A. Valvano.** 1993. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in Gram-negative bacteria. Adv. Microb. Physiol. **35**:135-246.

[265] **Rubens, C. E., R. F. Haft et M. R. Wessels.** 1995. Characterization of the capsular polysaccharide genes of group B streptococci. Dev. Biol. Stand. **85**:237-244.

[266] **García, E. et R. López.** 1997. Molecular biology of the capsular genes of *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiol. Lett. **149**:1-10.

[267] **Boulnois, G. J. et I. S. Roberts.** 1990. Genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **150**:1-18.

[268] **Bliss, J. M. et R. P. Silver.** 1996. Coating the surface: a model for expression of capsular polysialic acid in *Escherichia coli* K1. Mol. Microbiol. **21**:221-231.

[269] **Edwards, U., A. Müller, S. Hammerschmidt, R. Gerardy-Schahn et M. Frosch.** 1994. Molecular analysis of the biosynthesis pathway of the α-2,8 polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis* group B. Mol. Microbiol. **14**:141-149.

[270] **Kroll, J. S., S. Zamze, B. Loynds et E. R. Moxon.** 1989. Common organization of chromosomal loci for the production of different capsular polysaccharides in *Haemophilus influenzae*. J. Bacteriol. **171**:3343-3347.

[271] **Guidolin, A., J. K. Morona, R. Morona, D. Hansman et J. C. Paton.** 1994. Nucleotide sequence analysis of genes essential for capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 19F. Infect. Immun. **62**:5384-5396.

[272] **Kuypers, J. M., L. M. Heggen et C. E. Rubens.** 1989. Molecular analysis of a region of the group B *Streptococcus* chromosome involved in type III capsule expression. Infect. Immun. **57**:3058-3065.

[273] **Haft, R. F., M. R. Wessels, M. Fisk Mebane, N. Conaty et C. E. Rubens.** 1996. Characterization of *cpsF* and its product CMP-*N*-acetylneuraminic acid synthetase, a group B streptococcal enzyme that can function in K1 capsular polysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **19**:555-563.

[274] **Wessels, M. R., J. B. Goldberg, A. E. Moses et T. J. DiCesare.** 1994. Effects on virulence of mutations in a locus essential for hyaluronic acid capsule expression in group A streptococci. Infect. Immun. **62**:433-441.

[275] **Rubens, C. E., Wessels, M. R., Heggen, L. M. and Kasper, D. L.** 1987. Transposon mutagenesis of type III group B *Streptococcus*: correlation of capsule expression with virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **84**:7208-7212.

[276] **Lee, J. C., M. J. Betley, C. A. Hopkins, N. E. Perez et G. B. Pier.** 1987. Virulence studies, in mice, of transposon-induced mutants of *Staphylococcus aureus* differing in capsule size. J. Infect. Dis. **156**:741-750.

[277] **Kim, K. S., H. Itabashi, P. Gemski, J. Sadoff, R. L. Warren et A. S. Cross.** 1992. The K1 capsule is the critical determinant in the development of *Escherichia coli* meningitis in the rat. J. Clin. Invest. **90**:897-905.

[278] **Zwahlen, A., J. S. Kroll, L. G. Rubin et E. R. Moxon.** 1989. The molecular basis of pathogenicity in *Haemophilus influenzae*: comparative virulence of genetically-related capsular transformants and correlation with changes at the capsulation locus cap. Microb. Pathog. **7**:225-235.

[279] **Kelly, T., J. P. Dillard et J. Yother.** 1994. Effect of genetic switching of capsular type on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. **62**:1813-1819.

[280] **Paoletti, L. C., R. A. Ross et K. D. Johnson.** 1996. Cell growth rate regulates expression of group B *Streptococcus* type III capsular polysaccharide. Infect. Immun. **64**:1220-1226.

[281] **Kroll, J. S., I. Hopkins et E. R. Moxon.** 1988. Capsule loss in *Haemophilus influenzae* type b occurs by recombination-mediated disruption of a gene essential for polysaccharide export. Cell, **53**:347-356.

[282] **Kroll, J. S., B. M. Loynds et E. R. Moxon.** 1991. The *Haemophilus influenzae* capsulation gene cluster: a compound transposon. Mol. Microbiol. **5**:1549-1560.

[283] **St. Geme, J. W., III et D. Cutter.** 1996. Influence of pili, fibrils, and capsule on in vitro adherence by *Haemophilus influenzae* type b. Mol. Microbiol. **21**:21-31.

[284] **Nizet, V., P. Ferrieri et C. E. Rubens.** 1998. Molecular pathogenesis of group B streptococcal disease in newborns. *Dans* D. Stevens et E. Kaplan (eds.), Streptococcal infections. Oxford Press, New York, **sous presse**.

[285] **Schell, M. A.** 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. Ann. Rev. Microbiol. **47**:597-626.

[286] **Barnett, M. J. et S. R. Long.** 1990. DNA sequence and translational product of a new nodulation-regulatory locus: SyrM has sequence similarity to NodD proteins. J. Bacteriol. **172**:3695-3700.

[287] **Huang, J., B. F. Carney, T. P. Denny, A. K. Weissinger et M. A. Schell.** 1995. A complex network regulates expression of eps and other virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*. J. Bacteriol. **177**:1259-1267.

[288] **Crater, D. L. et I. van de Rijn.** 1995. Hyaluronic acid synthesis operon (*has*) expression in group A streptococci. J. Biol. Chem. **270**:18452-18458.

[289] **Quessy, S., J. D. Dubreuil et R. Higgins.** 1994. Immunization of mice against *Streptococcus suis* serotype 2 infections using a live avirulent strain. Can. J. Vet. Res. **58**:299-301.

[290] **Gottschalk, M., R. Higgins et M. Jacques.** 1993. Production of capsular material by *Streptococcus suis* serotype 2 under different growth conditions. Can. J. Vet. Res. **57**:49-52.

[291] **Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques et D. Dubreuil.** 1992. Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. Vet. Microbiol. **30**:59-71.

[292] **Salasia, S. I., C. Lammler et G. Herrmann.** 1995. Properties of a *Streptococcus suis* isolate of serotype 2 and two capsular mutants. Vet. Microbiol. **45**:151-156.

[293] **Clifton-Hadley, F. A.** 1981. Studies of *Streptococcus suis* infection in pigs. Thèse de Ph. D., University of Cambridge, Cambridge, UK.

[294] **Upton, I.** 1986. The immune response of the pig to infections with *Streptococcus suis* type 2. Thèse de Ph. D., University of Cambridge, Cambridge, UK.

[295] **Ferrieri, P., B. Burke et J. Nelson.** 1980. Production of bacteremia and meningitis in infant rats with group B streptococcal serotypes. Infect. Immun. **27**:1023-1032.

[296] **Moxon, E. R. et P. T. Ostrow.** 1977. *Haemophilus influenzae* meningitis in infant rats: role of bacteremia in pathogenesis of age-dependent inflammatory responses in cerebrospinal fluid. J. Infect. Dis. **135**:303-307.

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

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

[299] **Galina Pantoja, L.** 1994. Pathogenesis of *Streptococcus suis* meningitis macrophage response and interaction with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Thèse de Ph. D., University of Minnesota, Minnesota, USA.

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

[301] **Wibawan, I. W. et C. Lammler.** 1994. Relation between encapsulation and various properties of *Streptococcus suis*. Zentralbl. Vet. B **41**:453-459.

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

[303] **Fischetti, V., K. F. Jones, S. K. Hollingshead et J. R. Scott.** 1988. Structure, function and genetics of streptococcal M protein. Rev. Infect. Dis. **10**:S356-S359.

[304] **Elliott, S. D., F. Clifton-Hadley et J. Tai.** 1980. Streptococcal infection in young pigs. V. An immunogenic polysaccharide from *Streptococcus suis* type 2 with particular reference to vaccination against streptococcal meningitis in pigs. J. Hyg. Camb. **85**:275-285.

[305] **Holt, M. E., M. R. Enright et T. J. L. Alexander.** 1990. Immunisation of pigs with killed cultures of *Streptococcus suis* type 2. Res. Vet. Sci. **48**:23-27.

[306] **Holt, M. E., M. R. Enright et T. J. L. Alexander.** 1988. Immunisation of pigs with live cultures of *Streptococcus suis* type 2. Res. Vet. Sci. **45**:349-352.

[307] **Busque, P., R. Higgins, F. Caya et S. Quessy.** 1997. Immunization of pigs against *Streptococcus suis* serotype 2 infection using a live avirulent strain. Can. J. Vet. Res. **61**:275-279.

[308] **Kebede, M., M. M. Chengappa et J. G. Stuart.** 1990. Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of *Streptococcus suis*: efficacy trial of the mutant vaccine in mice. Vet. Microbiol. **22**:249-257.

[309] **Blecha, F., D. N. Reddy, C. G. Chitko-McKown, D. S. McVey, M. M. Chengappa, R. D. Goodband et J. L. Nelssen.** 1995. Influence of recombinant bovine interleukin-1 beta and interleukin-2 in pigs vaccinated and challenged with *Streptococcus suis*. Vet. Immunol. Immunopathol. **44**:329-346.

[310] **Shibuya, N., I. J. Goldstein, W. F. Broekaert, M. Nsimba-Lubaki, B. Peeters et W. J. Peumans.** 1987. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α2-6)Gal/GalNAc sequence. J. Biol. Chem. **262**:1596-1601.

[311] **Nagano, Y., N. Nagano, S. Takahashi, A. Suzuki et Y. Okuwaki.** 1989. Sialic acid levels and lag time growth in chemically defined medium containing 200 mM phosphate among strains of various serotypes of *Streptococcus agalactiae*. J. Clin. Microbiol. **27**:2148-2151.

[312] **Lee, J. C., S. Takeda, P. J. Livolsi et L. C. Paoletti.** 1993. Effects of in vitro and in vivo growth conditions on expression of type 8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. **61**:1853-1858.

[313] **Kellens, J. T. C., J. A. Jacobs, W. J. Peumans et E. E. Stobberingh.** 1993. The agglutination of β-haemolytic streptococci by lectins. J. Med. Microbiol. **39**:440-445.

[314] **Van Damm, J. E. G., A. Fleer et H. Snippe.** 1990. Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. Antonie Leeuwenhoek, **58**:1-47.

[315] **Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton et D. W. Holden.** 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. Science, **269**:400-403.

[316] **Egan, M. L., D. G. Pritchard, H. C. Dillon Jr et B. M. Gray.** 1983. Protection of mice from exprimental infection with type III group B *Streptococcus* using monoclonal antibodies. J. Exp. Med. **158**:1006-1011.

[317] **Ricci, M. L., C. Vonhunolstein, M. J. J. Gomez, L. Parisi, L. Tissi et G. Orefici.** 1996. Protective activity of a murine monoclonal antibody against acute and chronic experimental infection with type IV group B *Streptococcus*. J. Med. Microbiol. **44**:475-481.

[318] **Holt, M. E., M. R. Enright et T. J. L. Alexander.** 1990. Protective effect of sera raised against different fractions of *Streptococcus suis* type 2. J. Comp. Pathol. **103**:85-94.

[319] **Hansen, H. C., S. Haataja, J. Finne et G. Magnusson.** 1997. Di-, tri-, and tetravalent dendritic galabiosides that inhibit hemagglutination by *Streptococcus suis* at nanomolar concentration. J. Am. Chem. Soc. **119**:6974-6979.

VII- ANNEXE

Article V

Streptococcus pneumoniae types 19A and 19F and *Streptococcus suis* capsular type 8 share common capsular epitopes

M. Gottschalk[1], J. Kolberg[2], N. Charland[1]* et M. Jacques[1]

[1] Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

[2] Department of Vaccine, National Institute of Public Health, Oslo, Norvège

*N. Charland a réalisé les "dot blots" avec les anticorps et les différentes souches.

Journal of Clinical Microbiology (1995) **33:** 2492-2495

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 1995, p. 2492–2495 Vol. 33, No. 9
0095-1137/95/$04.00+0
Copyright © 1995, American Society for Microbiology

Streptococcus pneumoniae Types 19A and 19F and *Streptococcus suis* Capsular Type 8 Share Common Capsular Epitopes

MARCELO GOTTSCHALK,[1]* JAN KOLBERG,[2] NATHALIE CHARLAND,[1] AND MARIO JACQUES[1]

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6,[1] and Department of Vaccine, National Institute of Public Health, 0462 Oslo 4, Norway[2]

Received 23 January 1995/Returned for modification 31 March 1995/Accepted 14 June 1995

Two monoclonal antibodies (MAbs) to *Streptococcus pneumoniae* types 19A and 19F were tested with the 35 reference strains and 334 field strains of *Streptococcus suis* by dot blotting. Both MAbs reacted with the capsular type 8 reference strain, and one reacted with 69% and one reacted with 100% of 81 *S. suis* capsular type 8 field strains tested. Epitopes recognized by both MAbs are capsular in origin.

Streptococcus pneumoniae is a gram-positive bacterium associated with various human infections (12), and it occasionally causes different infections in animals (17). In addition to a common group antigen (cell wall polysaccharide), 85 type-specific capsular pneumococcal polysaccharide antigens have been identified (18). *S. pneumoniae* type 19 is composed of four cross-reacting serotypes, namely, 19A, 19F, 19B, and 19C. One of the most common types causing pneumococcal disease in young children is type 19F, which ranks first among all pneumococcal isolates recovered from children with acute otitis media (12). The chemical structures of the 19A and 19F capsular polysaccharides have been reported by Jennings and coworkers (9). These polymers are composed of similar trisaccharide units and differ only in the position of the linkage to the α-L-Rha_p residue. Immunological cross-reactions between these groups are frequently observed (11).

Streptococcus suis is one of the most important swine pathogens. It is also an important zoonotic agent causing mainly meningitis and endocarditis (1). So far, 35 capsular types have been described (2, 7), of which capsular types 2, 1/2, 3, and 8 are the most commonly isolated from diseased pigs (6). Of these, capsular type 8 is frequently isolated in cases of bronchopneumonia.

Cross-reactions among capsular polysaccharides of pathogenic bacteria, and between normal flora bacteria and pathogenic microorganisms, have previously been described. For example, *Neisseria meningitidis* groups A, B, and C cross-react with *Escherichia coli* K93, K1, and K92, respectively, and *Haemophilus influenzae* type b cross-reacts with *E. coli* K100 (8). Cross-reactions between pneumococci and other streptococci are frequently observed, these being mainly due to cell wall polysaccharides and F antigen (15). However, using rabbit sera, Lee et al. (13) observed cross-reactions between *S. pneumoniae* group 19 and another *Streptococcus* strain (which was later considered the reference strain of *S. suis* capsular type 8) which were due not to cell wall polysaccharides but probably to the capsule, since the biochemical compositions of the capsular materials of both microorganisms were very similar. In the present article we report that monoclonal antibodies (MAbs) against *S. pneumoniae* types 19A and 19F cross-react with *S. suis* capsular type 8.

Two MAbs were used, MAb CS19 H11, which was previously described (10), and MAb 182, A-1. MAb CS19 H11 was obtained after immunization of mice with the 23-valent pneumococcal vaccine (Pneumovax N; Merck, Sharp and Dohme, Rahway, N.J.). Its isotype is immunoglobulin A, and it reacts with both 19A and 19F polysaccharides. This specificity was confirmed by dot blotting with heat-killed pneumococci and peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins as a secondary antibody. MAb 182, A-1 was obtained after immunization of mice with a heat-killed and sonicated suspension of pneumococci of type 19F (field strain 325/89) followed by a final immunization with purified 19F capsular polysaccharides (American Type Culture Collection, Rockville, Md.) before fusion, as previously described (10). The isotype belongs to the immunoglobulin M class, and this MAb also reacts with types 19A and 19F.

The MAbs were tested by dot blotting with *S. suis* strains, as well as with *Enterococcus faecalis* (seven strains) and *Streptococcus bovis* (five strains). Reference strains of *S. suis* capsular types 1 to 34 and type 1/2 originated from our laboratory. In addition, a total of 334 field strains, representing all described capsular types (including 81 capsular type 8 strains) and isolated from diseased animals at the Diagnostic Laboratory at the Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, were also tested. Biochemical identification and serotyping were carried out as previously described (5). These field strains (with accompanying serotyping results) were kindly supplied by Robert Higgins, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada.

Dot blotting was performed as previously described (10), with some modifications. Briefly, streptococci were cultivated aerobically overnight at 37°C on 5% ovine blood agar plates; *S. pneumoniae* strains were grown in a 5% CO_2 atmosphere. Plates were washed with phosphate-buffered saline (PBS; 0.01 M, pH 7.2) containing 0.05% formaldehyde, and the suspensions were diluted in the same buffer to obtain an optical density of 1.0 at 514 nm. The suspensions were spotted onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.), and after blockage for 30 min with a 2% casein solution, the membranes were incubated for 1 h at room temperature in the presence of either MAb (ascitic fluid diluted 1/200). After being washed several times with PBS, the strips were incubated for 1 h at room temperature with peroxidase-

* Corresponding author. Phone: (514) 773-8521, ext. 8374. Fax: (514) 778-8108. Electronic mail address: gottschm@ERE.UMontreal.CA.

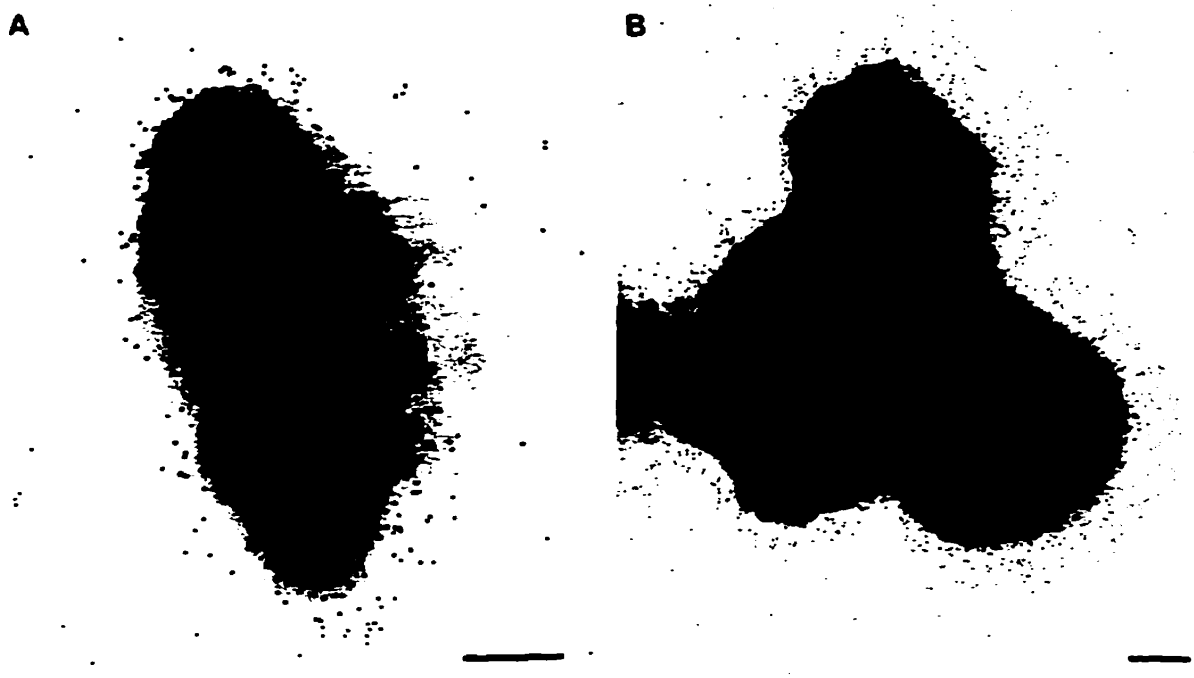


FIG. 1. Transmission electron micrographs of bacterial cells of *S. suis* capsular type 8 (strain 14636 74) (A) and *S. pneumoniae* type 19F (strain 4117) (B) incubated with MAb 182, A-1 and colloidal gold-labeled goat anti-mouse immunoglobulin. Bars, 200 nm.

conjugated goat anti-mouse immunoglobulin (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West Grove, Pa.). Strains of *S. pneumoniae* types 19A (strain 822828) and 19F (strain 4117), kindly provided by Josée Hamel (National Laboratory of Immunology, Ottawa, Ontario, Canada), were used as positive controls. The *S. suis* capsular type 8 reference strain and the *S. pneumoniae* control strains were also tested after cell treatment with proteinase K (100 μg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) in PBS at 55°C for 1 h. Periodate oxidation was performed by incubation of the antigens with 15 mM $NaIO_4$ as previously described (19).

Results showed that among the *S. suis* reference strains, both MAbs reacted only with that of capsular type 8; all other capsular types tested negative. Similar results were obtained with the *S. suis* field strains. In the latter case, MAbs 182, A-1 and CS19 H11 recognized all and 56 (69%) of the 81 capsular type 8 field strains, respectively, indicating that the reacting epitopes involved are most probably different. Epitopes recognized by both MAbs are polysaccharidic in nature, since the reaction was not affected after treatment with proteinase K, whereas it completely disappeared after periodate oxydation (19). Finally, all other field strains of *S. suis* belonging to capsular types other than type 8, as well as the *E. faecalis* and *S. bovis* strains, were completely negative with either MAb.

Immunogold labeling was carried out to verify whether the epitope recognized by MAb 182, A-1 was located at the bacterial cell surface. Grids with bacteria (*S. suis* capsular type 8 or *S. pneumoniae* type 19F) were incubated with the MAb, and after washing, gold-labeled goat anti-mouse immunoglobulin (10-nm-diameter gold colloidal particles; Sigma Chemical) was added. Grids were examined with an electron microscope (Philips 201) at an accelerating voltage of 60 kV, as previously described (4). Figure 1 shows that the epitope is located at the bacterial surface for the *S. suis* and *S. pneumoniae* strains, since an extensive labeling over the entire bacterial surface was observed. To confirm that the epitope recognized by MAb 182, A-1 was located in the capsule, immunostabilization of the capsular material of the *S. suis* capsular type 8 reference strain was performed as previously described (4). Agar-grown bacteria were harvested and exposed to the MAb diluted 1/100. Bacterial cells were then suspended in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.0) containing glutaraldehyde and ruthenium red (14). Controls without MAbs were processed simultaneously. Results showed that MAb 182, A-1 was able to stabilize the capsule of *S. suis* capsular type 8, which otherwise collapses during preparation for electron microscopy (Fig. 2A and B). Similar results were obtained with MAb CS19 H11 (data not shown). In addition, thin sections of ruthenium red-stained, immunostabilized cells of *S. suis* capsular type 8 (seen in Fig. 2A) were immunogold labeled as described above. Gold particles associated with the capsular material layer were observed (Fig. 2C).

We have confirmed that *S. pneumoniae* type 19 (19A and 19F) and *S. suis* capsular type 8 share at least two common epitopes, which are capsular in origin. Differentiation of these species may be complicated, since they are morphologically very similar; moreover, *S. suis* strains are frequently misidentified as *S. pneumoniae* when rapid multitest systems, such as the Rapid-Strep API System, are used (3). In addition, optochin-susceptible *S. suis* isolates have recently been reported (16). Although the capsule of *S. pneumoniae* has been considered a major virulence factor, *S. suis* capsular type 8, which possesses an antigenically similar capsule, has not been iso-

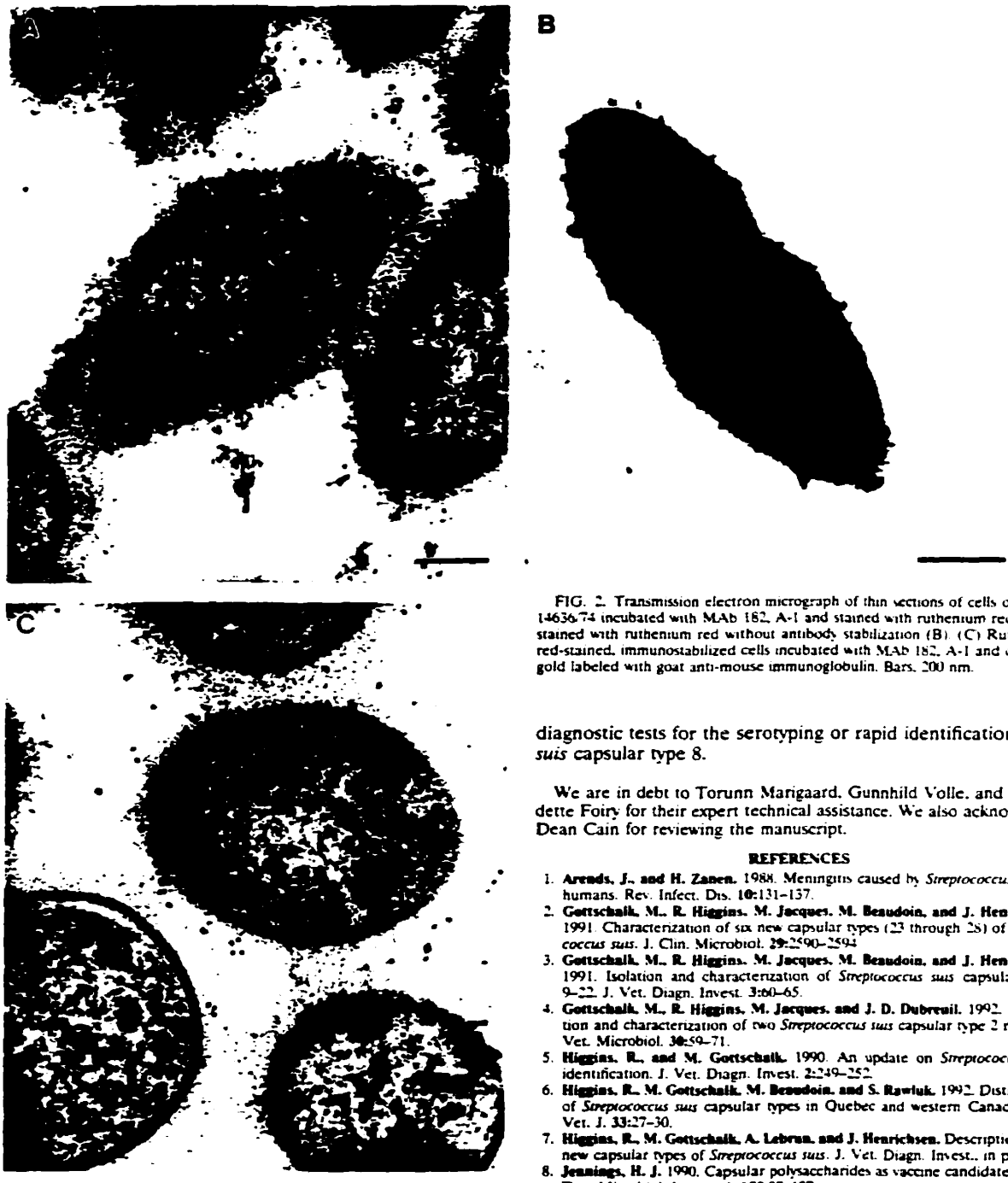


FIG. 2. Transmission electron micrograph of thin sections of cells of *S. suis* 14636/74 incubated with MAb 182, A-1 and stained with ruthenium red (A) or stained with ruthenium red without antibody stabilization (B). (C) Ruthenium red-stained, immunostabilized cells incubated with MAb 182, A-1 and colloidal gold labeled with goat anti-mouse immunoglobulin. Bars, 200 nm.

lated from humans so far. Furthermore, while pneumococci of group 19 are highly invasive in laboratory guinea pigs, possibly because of their capsular material (13), different strains of *S. suis* capsular type 8 failed to produce any clinical sign after intraperitoneal challenge with a large number of bacteria (unpublished observations). Finally, MAb 182, A-1 may be used in diagnostic tests for the serotyping or rapid identification of *S. suis* capsular type 8.

We are in debt to Torunn Marigaard, Gunnhild Volle, and Bernadette Foiry for their expert technical assistance. We also acknowledge Dean Cain for reviewing the manuscript.

REFERENCES

1. **Arends, J., and H. Zanen.** 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. Rev. Infect. Dis. **10**:131–137.
2. **Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, M. Beaudoin, and J. Henrichsen.** 1991. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol. **29**:2590–2594.
3. **Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, M. Beaudoin, and J. Henrichsen.** 1991. Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9–22. J. Vet. Diagn. Invest. **3**:60–65.
4. **Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, and J. D. Dubreuil.** 1992. Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. Vet. Microbiol. **30**:59–71.
5. **Higgins, R., and M. Gottschalk.** 1990. An update on *Streptococcus suis* identification. J. Vet. Diagn. Invest. **2**:249–252.
6. **Higgins, R., M. Gottschalk, M. Beaudoin, and S. Rawluk.** 1992. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in Quebec and western Canada. Can. Vet. J. **33**:27–30.
7. **Higgins, R., M. Gottschalk, A. Lebrun, and J. Henrichsen.** Description of six new capsular types of *Streptococcus suis*. J. Vet. Diagn. Invest., in press.
8. **Jennings, H. J.** 1990. Capsular polysaccharides as vaccine candidates. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **150**:97–127.
9. **Jennings, H. J., K. G. Rosell, and D. J. Carlo.** 1980. Structural determination of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 19 (19F). Can. J. Chem. **58**:1069–1074.
10. **Kolberg, J., I. Asberge, E. Jantzen, M. Lovik, G. Lermark, and T. Steen.** 1992. Murine monoclonal antibodies against pneumococcal capsular polysaccharide types 4, 8, 22F and 19A/19F. APMIS **100**:91–94.
11. **Krishnamurthy, T., C.-J. Lee, J. Henrichsen, D. J. Carlo, T. M. Stoudt, and J. B. Robbins.** 1978. Characterization of the cross-reaction between type 19F(19) and 19A(57) pneumococcal capsular polysaccharides: compositional

analysis and immunological relation determined with rabbit typing antisera. Infect. Immun. 22:727–735.

12. **Lee, C.-J., E.-D. Ching, and H. Vickers.** 1991. Maternal immunity and antibody response of neonatal mice to pneumococcal type 19F polysaccharide. J. Clin. Microbiol. 29:1904–1909.
13. **Lee, C.-J., K. Koizumi, J. Henrichsen, B. Perch, C. Lin, and W. Egan.** 1984. Capsular polysaccharides of nongroupable streptococci that cross-react with pneumococcal group 19. J. Immunol. 133:2706–2711.
14. **Luft, J. H.** 1971. Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. Anat. Rec. 171:347–368.
15. **Sorensen, U. B., and J. Henrichsen.** 1987. Cross-reactions between pneumococci and other streptococci due to C polysaccharide and F antigen. J. Clin. Microbiol. 25:1854–1859.
16. **Suarez, P., M. Imaz, and J. M. Castro.** 1994. Biochemical traits and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughtered pigs. J. Vet. Med. Ser. B 41:608–617.
17. **Vaissaire, J., P. Geslin, J. L. Martel, B. Beugnies, C. Chirol, M. Mollard, and A. Fremaux.** 1988. Septicemies à pneumocoques (*Streptococcus pneumoniae*) chez différentes espèces animales (bovin, caprine, rongeurs). Mise en evidence en France. Bull. Soc. Vet. Prat. Fr. 72:211–221.
18. **Van Damm, J. E. G., A. Fleer, and H. Snippe.** 1990. Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. Antonie Leeuwenhoek 58:1–17.
19. **Woodward, M. P., W. W. Young, Jr., and R. A. Bloodgood.** 1985. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. J. Immunol. Methods 78:143–153.