UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES, TECHNOLOGIES

EA 3854 « Bactéries et Risque Materno-fœtal »

THÈSE présentée par

Mazen SALLOUM

soutenue le **01 décembre 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie

Les infections à *Streptococus agalactiae* chez l'adulte

Émergence et impact de la lysogénie

THÈSE dirigée par :

Mr QUENTIN Roland	Professeur des Universités, université François–Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

Mme JUMAS-BILAK Estelle	Professeur des Universités, Université Montpellier 1
Mr PICARD Bertrand	Professeur des Universités, Université Paris 7

JURY :

Mme VAN DER MEE-MARQUET Nathalie	Praticien Hospitalier, CHRU, Tours
Mr DONNIO Pierre-Yves	Professeur des Universités, Université Rennes1
Mr MEREGHETTI Laurent	Maître de conférences, Université François–Rabelais, Tours
Mme JUMAS-BILAK Estelle	Professeur des Universités, Université Montpellier 1
Mr PICARD Bertrand	Professeur des Universités, Université Paris 7
Mr QUENTIN Roland	Professeur des Universités, université François–Rabelais, Tours

Je dédie ce travail

à Yara,
à Jad,
à mes parents,
mes frères et belles sœurs,
et à ma seconde famille.

Remerciements

à Madame le Docteur Nathalie van der Mee-Marquet,
Praticien Hospitalier, Laboratoire de Bactériologie et d'Hygiène Hospitalière de l'Hôpital Trousseau du C.H.U. de Tours,
Responsable du Réseau des Hygiénistes du Centre,
Tu as accepté de me donner ce travail et tu m'as soutenu tout au long de sa réalisation.
Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée, pour ta rigueur scientifique et ton aide précieuse pour la discussion des résultats, et pour tes conseils avisés dans la rédaction de ce travail.
Trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de tout mon respect.

à Monsieur le Professeur Roland Quentin,
Professeur des Universités, Praticien Hospitalier,
Chef de service du Laboratoire de Bactériologie et d'Hygiène Hospitalière de l'hôpital Trousseau du C.H.U. de Tours,
Responsable de l'Equipe de recherche EA3854,
Vous m'avez fait confiance et m'avez accueilli dans votre service et avez mis à ma disposition tout le matériel nécessaire à ce travail.
Je vous remercie pour votre rigueur scientifique et votre aide précieuse pour la discussion des résultats.
Veuillez trouver dans ce travail, l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

à Madame le Professeur Estelle Jumas-Bilak,
Professeur des Universités,
Responsable de l'Equipe de recherche EA 3755-DIBOP
Soyez remerciée d'avoir accepté de juger mon travail en étant rapporteur de cette thèse,
Soyez assurée de ma sincère reconnaissance.

à Monsieur le Professeur Bertrand Picard,
Professeur des Universités,
Equipe de recherche Inserm U722,
Soyez remercié d'avoir accepté de juger mon travail en étant rapporteur de cette thèse,
Soyez assuré de mon profond respect.

à Monsieur le Professeur Pierre-Yves Donnio,
Professeur des Universités,
Unité de recherche EA 1254 Microbiologie - Risques infectieux,
Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail,
Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

à Monsieur le Docteur Laurent Mereghetti,
Maître de Conférences des Universités,
Equipe de recherche EA 3854,
Soyez remercié d'avoir accepté de juger mon travail,
Soyez assuré de mon profond respect.

à Madame le Docteur Anne-Sophie Domelier,
Pour le partage de tes connaissances, ton soutien, et ton amitié.

à Monsieur Pierre-Yves Sizaret « Département de Microscopie »
Pour votre disponibilité et votre patience.

à Madame le Docteur Claire de Gialluly,
Pour les années sympathiques passées dans le même bureau que toi,
Sois assurée de mes sentiments les meilleurs.

à Laurence Arnault,
Pour la sympathique collaboration qui a contribué à rendre ces années de thèse très agréables.
Je tiens à t'exprimer toute ma reconnaissance.

à Patricia Play,
Pour ta disponibilité largement mise à contribution et ton aide précieuse dans la préparation des milieux,
Je tiens à t'exprimer toute ma reconnaissance.

à tous les membres de l'équipe du laboratoire,
Pour la gentillesse qu'ils ont exprimée pendant ces années,
Qu'ils sachent qu'ils ont été pour moi un soutien au cours de ces années.

Aux docteurs Marie-Frédérique Lartigue, Philippe Lanotte, Agnès Rosenau
Pour votre sympathie,
Soyez assurés de mes sentiments les meilleurs.

à tous les internes du service de Bactériologie et d'Hygiène Hospitalière de l'hôpital Trousseau du C.H.U. de Tours,
Pour votre sympathie,
Soyez assurés de mes sentiments les meilleurs.

à Véronique et Claire du laboratoire de Biochimi, pour votre sympathie.

Résumé

Streptococcus agalactiae, associé initialement à la mammite bovine, est depuis les années 1960s, le principal responsable des infections invasives materno-fœtales. Les souches responsables des infections invasives néonatales sont majoritairement de sérotype III et appartiennent à la division phylogénétique I en MLEE et au complexe clonal CC17 en MLST. Elles sont fréquemment lysogènes et leurs prophages sont aptes à lyser des populations rivales de *S. agalactiae* appartenant à l'ensemble des clones *intra-species* (Domelier *et al.*, 2009), suggérant l'importance des mécanismes de transduction et de la lysogénie dans l'évolution adaptative et l'émergence du clone CC17.

Depuis les années 1990s, *S. agalactiae*, commensal fréquent de l'homme, est responsable d'infections invasives émergentes chez le sujet âgé présentant des facteurs de risque d'infection. Ces infections sont le plus souvent des bactériémies, des infections cutanées ou ostéo-articulaires. Les souches associées à ces infections sont rarement de sérotype III et n'appartiennent pas au CC17.

Notre premier objectif a été de préciser les caractéristiques des souches responsables des infections invasives émergentes de l'adulte. Nous avons étudié 261 souches de *S. agalactiae*, soit 133 souches isolées d'infections invasives chez l'adulte (24 infections cutanées, 34 infections ostéo-articulaires, 67 bactériémies, 8 méningites), 67 souches isolées d'infections invasives néonatales (20 bactériémies, 47 méningites) et 61 souches colonisantes isolées chez l'adulte asymptomatique (souches uro-génitales, de la peau, de la gorge et de la marge anale). Chaque souche a été sérotypée puis analysée par MLST, macrorestriction de l'ADN génomique et en terme de contenu prophagique.

Nous montrons que les souches associées aux infections invasives chez l'adulte appartiennent majoritairement aux sérotypes V et Ia.

Nous montrons que les souches associées aux infections invasives chez l'adulte appartiennent majoritairement aux deux clones phylogénétiquement éloignés, CC1 et CC23. Nos résultats montrent que les clones associés aux souches invasives présentent des caractéristiques particulières. Le CC23 est un clone génétiquement très hétérogène dont les souches sont caractérisées par des profils PFGE très divers et un contenu prophagique fréquent et diversifié. A l'opposé, le CC1 est génétiquement homogène. Tel que le CC17 dont il est génétiquement

éloigné, le CC1 présente un nombre limité de STs suggérant une exposition limitée des gènes de ménage aux mutations ou recombinaisons, et une homogénéité remarquable en terme de contenu en prophages. De plus, tel que pour le CC17, l'analyse PFGE montre une diversité importante des souches au sein du clone CC1 et l'existence de sous-clones parmi lesquels un nombre limité regroupe les souches invasives.

Enfin, nous montrons des caractéristiques moléculaires semblables pour les souches isolées des infections cutanées, des infections ostéo-articulaires, et des bactériémies chez l'adulte, suggérant que la peau et les tissus mous puissent être une porte d'entrée possible pour la bactériémie et pour les infections de l'os et des articulations.

L'étude du contenu prophagique des souches invasives de l'adulte montre une lysogénie fréquente, comparable à celle des souches associées aux infections invasives néonatales. Ceci suggère l'importance de la lysogénie dans la spécialisation de ces souches particulièrement aptes à infecter la peau, les os, et les articulations chez l'adulte. Aussi, dans un deuxième temps, nous avons isolé des phages tempérés de souches associées à des infections invasives cutanées et ostéo-articulaires afin de les caractériser et de les comparer aux phages isolés récemment de souches représentatives des infections materno-fœtales (Domelier *et al.*, 2009). Sept phages ont été isolés et étudiés. Leur caractérisation en microscopie électronique a permis de les classer dans la famille des *SIPHOVIRIDAE*. L'analyse par restriction enzymatique de l'ADN phagique utilisant trois enzymes *Hind*III, *Eco*RI, et *Cla*I, l'amplification par PCR de fragments d'ADN prophagique, et l'étude de leur spectre lytique, a montré la diversité des phages isolés et leur différence des phages isolés des souches associées aux infections materno-fœtales. L'étude de la susceptibilité aux 7 phages des 261 souches de *S. agalactiae* a montré que les phages isolés de souches lysogènes de CC23 présentent un spectre lytique restreint aux souches de CC23. A l'opposé, et comme cela a été démontré pour les phages isolés de souches de CC17, les phages isolés de souches lysogènes de CC1 ont présenté un spectre lytique étendu aux souches de tous les clones *intra-species*.

Summary

Streptococcus agalactiae, initially associated with bovin mammitis, has emerged in the 1960s as the leading cause of invasive infections in neonates. The strains associated with invasive infections in neonates are mainly characterized by serotype III and belong to MLEE I and CC17 using MLST. These strains are frequently lysogenic and their prophages are able to lyse strains belonging to all clones *intra-specie*s (Domelier *et al.*, 2009), suggesting that mechanisms of transduction and lysogeny might be involved in the adaptive evolution and emergence of these CC17 strains.

Since 1990, an emergence of invasive infections due to *S. agalactiae* has been established in nonpregnant adults, mainly elderly and with risk factors for infection. These infections consist mainly in bacteremia, skin and osteoarticular infections. The strains associated with these emerging infections are rarely characterized by serotype III and do not belong to CC17.

Our first goal was to study the characteristics of the strains associated with emerging infections in adults. We have studied 261 strains of *S.* agalactiae, including 133 strains isolated from invasives infections in adults (24 skin and soft tissue infections, 34 osteoarticular infections, 67 bloodstream infections, 8 meningitis), 67 strains isolated from neonatal invasives infections (20 bloodstream infections, 47 meningitis) et 61 colonizing strains isolated from asymptomatic adults (uro-genital, skin, throat, rectal). Each strain has been srotyped, and then analysed by MLST, DNA macrorestriction and for prophagic content.

We showed that the strains isolated from adult infections were mainly distributed in the serotypes V and Ia.

We showed that the strains isolated from adult infections mainly belonged to the two phylogenetically distant clones, CC1 and CC23. Our results showed that these two clones present particular characteristics. CC23 is a genetically heterogenous clone, characterized by strains with highly diverse PFGE profiles et frequent and diverse prophagic content. By contrast, CC1 is genetically homogenous. Such as CC17, from which it is genetically distant, CC1 showed a restricted number of STs, suggesting a limited exposition of house keeping genes to mutations or recombinaisons, and a high homogeneity with prophagic content. Also, and such as CC17, PFGE analysis indicated a high diversity among strains from CC1 and a restricted number of sub-clones where most invasive strains are clustered.

We found that the molecular characteristics were similar for the strains isolated from skin infections, osteoarticular infections and bloodstream infections in adults. These data suggest that skin and soft tissues could be the portal of entry for bloodstream infection and for the bone and articulations.

The prophagic content study of the strains associated with invasive infections in adults showed a frequent lysogeny, such as demonstrated with invasive infections in neonates. This suggests a likely role of lysogeny in the specialisation of these strains able to infect the skin, the bone and the articulations in adults. Also, our second goal was to isolate and study phages from strains associated with invasive cutaneous and osteoarticular infections in adults, and to compare their characteristics with those described for phages isolated from diverse of *S. agalactiae* strains associated with materno-foetal infections (Domelier *et al.*, 2009). Sevent phages were isolated and studied, classified among *SIPHOVIRIDAE* on the basis of their morphology studied with electronic microscopy. Restriction analysis of phagic DNA using *Hind*III, *Eco*RI, et *Cla*I, PCR for prophagic DNA and lytic spectrum analysis showed genetiacally diverse phages, distinct from the phages isolated from strains responsible for materno-foetal infections. Lytis activity study of the 7 phages on 261 *S. agalactiae* strains showed that phages isolated from lysogenic strains of CC23 had a narrow lytic spectrum restricted to strains belonging to CC23. By contrast, and such as that demonstrated with phages isolated from CC17 strains responsible for neonatal meningitis, the phages isolated from lysogenic strains of CC1 had a wide lytic spectrum and were able to lyse strains belonging to all clones *intra-species*.

Table des matières

Remerciements **2**

Résumé **4**

Summary **6**

Liste des tableaux **13**

Liste des figures **14**

Liste des annexes **16**

Liste des abréviations **17**

Introduction **19**

Revue de la littérature **21**

Streptococcus agalactiae **22**

1. Caractères généraux 22
   a. Taxonomie 22
   b. Caractères morphologiques et culturaux 22
   c. Caractères biochimiques et métabolisme 22
   d. Caractères génomiques 23
   e. Sensibilité aux agents antimicrobiens 23
2. Ultrastructure bactérienne 23
   a. La paroi 23
   b. La capsule 25
   c. Le cytoplasme et la membrane plasmique 26
   d. Les substances produites 26
3. Identification de *Streptococcus agalactiae* 26
   a. Examen direct des cocci à Gram positif à partir des prélèvements biologiques 26
   b. Recherche d'antigènes solubles à partir des prélèvements biologiques 26
   c. L'isolement du germe 27
   d. Caractérisation de *S. agalactiae* 27
4. Facteurs de virulence et régulation 28
   a. Les toxines porogènes : l'hémolysine/cytolysine β (β-H/C) ou CylE, et le facteur CAMP (Christie Atkins Munch Peterson). 29

b. Les facteurs favorisant l'échappement immunitaire 29
- La capsule polysaccharidique riche en acide sialique. 29
- La superoxide dismutase. 30
- La C5a-peptidase.. 30
- La sérine protéase (CspA) 30
- La Résistance aux peptides antimicrobiens de l'hôte 30

c. Facteurs favorisant adhésion et invasion de la surface cellulaire de l'hôte 30
- Les protéines de liaison au fibrinogène (Fibrinogen-binding proteins) 31
- La protéine de liaison à la laminine Lmb (Laminin-binding protein).. 31
- Les protéines répétées riche en sérine (Serine-rich repeat proteins) 32
- L'adhésine bactérienne immunogénique. 32

d. Autres facteurs contribuant à la pathogénie de *S. agalactiae* 33

***Streptococcus agalactiae* et la période périnatale 34**

1. Colonisation et transmission 34
2. Incidence des infections materno-fœtales 34
   a. Les infections chez le nouveau-né 35
   b. Les infections chez la femme enceinte 36
3. Sérotype des souches responsables d'infections materno-fœtales 37
4. Diagnostic 37
5. Prophylaxie et traitement 38
6. Vaccination 38

***Streptococcus agalactiae* chez l'adulte en dehors de la grossesse 39**

1. Prévalence de la colonisation 39
2. Incidence et émergence des infections 39
3. Sérotype des souches des infections invasives de l'adulte. 40
4. Mortalité 41
5. Conditions prédisposantes et facteurs de risque 41

6. Les manifestations cliniques 42
7. Les infections récurrentes 46
8. Les infections polymicrobiennes 46
Caractérisation des souches de *S. agalactiae* 48
1. Sérotypage 48
2. Lysotypie 48
3. Sensibilité aux antibiotiques 48
4. Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) 48
5. Analyse des plasmides 49
6. Restriction Digest Pattern typing (RDP) 49
7. Analyse du polymorphisme de taille des fragments de restriction de l'ADN 49
8. Macrorestriction de l'AND génomique et électrophorèse en champ pulsé 50
9. Multilocus Sequence Typing (MLST) 50
10. Les méthodes basées sur la PCR 51
Les bactériophages 53
1. Structure et Taxonomie 53
2. Le cycle de vie des phages 54
3. La génomique des phages et des prophages 57
   a. Organisation du génome des phages tempérés 57
   b. Évolution du génome des phages 57
   c. Évolution du prophage au sein de la bactérie 59
4. Le rôle des phages dans l'évolution bactérienne 59
   - La transduction 60
   - La conversion lysogène. 60
5. Le rôle des phages dans l'émergence de nouveaux clones 60
6. La lysogénie et *S. agalactiae* 60

Travail personnel **62**
Matériels et méthodes **65**
1. Les souches 65
2. Méthodes 65
a) Caractérisation des souches de *S. agalactiae* 65
- Extraction de l'ADN. 66
- Sérotypage.. 66
- Multilocus sequence typing (MLST). 66
- Profil de macrorestriction de l'ADN (PFGE).. 66
- Détermination du continu en prophages des souches de *S. agalactiae* 66

b) Caractérisation des phages 66
- Isolement, sélection, propagation des phages. 66
- Détermination du spectre lytique. 67
- Microscopie électronique 67
- Extraction de l'ADN phagique.. 67
- Restriction enzymatique de l'ADN phagique.. 67
- Etude de la diversité génétique des phages par Amplification PCR de 18 fragments d'ADN prophagique.. 67

c) Analyse statistique 67
Première partie Etude des souches de *S. agalactiae* isolées d'infections invasives chez l'adulte **68**
1. Sérotype des souches 68
2. Caractérisation des souches par MLST 69
3. Macrorestriction de l'ADN et PFGE 69
4. Analyse du contenu prophagique des souches invasives 75
Deuxième partie Isolement de 7 bactériophages à partir de souches isolées d'infections cutanées et ostéoarticulaires chez l'adulte **82**
1. Caractérisation des phages 82
a. Analyse des phages en microscopie électronique 82

b. Restriction enzymatique de l'ADN phagique 83
c. Etude du spectre lytique 85
d. Etude du contenu prophagique des phages isolés 85
2. Susceptibilité des 261 souches aux 7 phages 88
3. Regroupement des souches en fonction des réactions lytiques 89
4. Caractéristiques des souches lysogènes des 7 phages 91
Discussion et conclusion générale et perspectifs 93
Publications 98
Bibliographie 99
Annexes 119

Liste des tableaux

Tableau 1. Infections nosocomiales à *S. agalactiae* diagnostiquées chez l'adulte. 41
Tableau 2. Taux de mortalité associé aux infections invasives de l'adulte. 42
Tableau 3. Fréquence des facteurs de risque favorisant l'infection chez l'adulte.....43
Tableau 4. Infections invasives à *S. agalactiae* chez l'adulte en dehors de la grossesse.....46
Tableau 5. Fréquence des infections polymicrobiennes invasives chez l'adulte. 47
Tableau 6. Sérotypes des souches des 7 populations de souches.....68
Tableau 7. Distribution des souches en fonction du ST pour les différentes populations. 70
Tableau 8. Diversité des profils PFGE en fonction des populations de souches et des CCs. 72
Tableau 9. Diversité du contenu prophagique en fonction des populations de souches et des CCs. 75
Tableau 10. Amplification de 18 fragments d'ADN prophagique avec les 7 ADN phagiques. ...86
Tableau 11. Fréquence de lyse des souches en fonction de la population. 88
Tableau 12. Distribution des souches dans les 5 groupes lytiques en fonction de la population..90
Tableau 13. Distribution des 49 souches dans les 5 groupes lytiques en fonction de leur sérotype 90
Tableau 14. Distribution des souches et groupes lytiques en fonction des principaux CCs.....90
Tableau 15. Résultats de la lysotypie et corrélation avec les complexes clonaux. 91
Tableau 16. Sérotypage des souches de *S. agalactiae* : amorces utilisées pour les PCR et taille des amplicons. 125
Tableau 17. Les amorces pour MLST et la taille des fragments séquencés. 130
Tableau 18. Les fragments d'ADN prophagique amplifiés : gènes cibles, souches références, amorces, Température d'hybridation, et taille de l'amplicon. 136
Tableau 19. Site de restriction et température d'incubation des enzymes de restriction. 146
Tableau 20. Huit fragments d'ADN prophagique amplifiés : gènes cibles, souches réfeérences, amorces, température d'hybridation, et taille de l'amplicon.....149

Liste des figures

Figure 1. *S. agalactiae*, pathogène du nouveau-né, d'après Rajagopal, 2009.....36
Figure 2. Incidence des infections chez l'adulte aux États-Unis entre 1983 et 2007.....40
Figure 3. Distribution des principaux STs selon l'origine clinique des souches.....51
Figure 4. Représentation schématique d'une particule infectieuse d'un phage caudé.....54
Figure 5. Représentation schématique du cycle du bactériophage Lambda.....55
Figure 6. Alignement des prophages rlt-like identifiés chez *S. pyogènes*.....58
Figure 7. Distribution des souches isolées des différentes pathologies chez l'adulte et le nouveau-né dans les différents complexes clonaux qui constituent l'espèce *S. agalactiae*.....71
Figure 8. La diversité génétique des souches de CC23 obtenue à partir des profils de restriction des ADN bactériens par *Sma*I. 72
Figure 9. La diversité génétique des souches de CC1 obtenue à partir des profils de restriction des ADN bactériens par *Sma*I. 73
Figure 10. La diversité génétique des souches de CC23 obtenue à partir des profils de restriction des ADN bactériens par *Sma*I. 74
Figure 11. Contenu prophagique des souches de CC1 de *S. agalactiae* isolées de l'adulte et du nouveau-né.. 76
Figure 12. Contenu prophagique des souches de CC17 de *S. agalactiae* isolées de l'adulte et du nouveau-né.. 77
Figure 13. Contenu prophagique des souches de CC23 de *S. agalactiae* isolées de l'adulte et du nouveau-né.. 78
Figure 14. Détermination de la morphologie des bactériophages isolés de souches de S. agalactiae d'infections cutanées et ostéoarticulaires de l'adulte. 83
Figure 15. Restriction des ADN phagiques avec *Hind*III. 84
Figure 16. Restriction des ADN phagiques avec *Eco*RI. 84
Figure 17. Restriction des ADN phagiques avec *Cla*I. 84
Figure 18. Activité lytique de 7 phages isolés de souches d'infections cutanées et ostéo-articulaires de l'adulte sur une collection de 58 souches de même origine clinique.....85
Figure 19. Caractéristiques des 7 phages et contenu en fragments prophagiques.....86

Figure 20. Analyse comparée des résultats obtenus par amplification par PCR multilocus de 36 phages isolés de souches d'origine matérno-fœtale (Domelier *et al.*, 2009) et des 7 phages isolés de souches d'infections cutanées et ostéoarticulaires. 87
Figure 21. Analyse du spectre lytique obtenu avec les 7 phages sur 49 souches de *S. agalactiae* 89

Liste des annexes

Annexe 1. Extraction d'ADN bactérien par méthode phénol / chlorophorme / alcool isoamylique. 120
Annexe 2. Sérotypage de *S. agalactiae* par PCR. 123
Annexe 3. Multilocus sequence typing (MLST). 126
Annexe 4. Profils de macrorestriction de l'AND en cham pulse (PFGE). 131
Annexe 5. Amplification par PCR en temps réel de 10 fragments d'ADN prophagique chez *S. agalactiae*. 134
Annexe 6. Isolement, propagation des bactériophages de *S. agalactiae*. 137
Annexe 7. Détermination du spectre lytique des bactériophages. 140
Annexe 8. Microscopie électronique des bactériophages 142
Annexe 9. Extraction d'ADN phagique. 144
Annexe 10. Restriction enzymatique d'ADN phagique 146
Annexe 11. PCR en temps réel de gènes prophagiques de *S. agalactiae* sur l'ADN phagique. .148

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Alp	Alpha-like protein
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	Acide ribonucléique de tranfert
β-H/C	Hémolysine/cytolysine β
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CAMP	Christie-Atkins-Munch-Peterson
CC	Complexe clonal
dNTP	Désoxyribonucléotide 5' triphosphate
DRO	Dérivé réactif de l'oxygène
EGM	Elément génétique mobile
ET	Electrophorétype
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GBS	Le streptocoque du groupe B
G + C	Guanine et Cytosine
iagA	Gène associé à l'invasion
ICTV	International Commitee on Taxonomy of Viruses
Ig	Immunoglobuline
IHF	Integration host factor
Int	Intégrase
IS	Séquence d'insertion
Kb	Kilobase
LCR	Liquide céphalo-rachidien
Lmb	Laminine binding protein
Mg	Milligramme
min	Minute
µL	Microlitre
mL	Millilitre
MLEE	Multilocus enzyme electrophoresis
MLST	Multilocus sequence typing
MLVA	Multiple-locus variant-repeat assay
µm	Micrométre
mm	Millimétre
mTH	Todd Hewitt modifié
MU	Million d'unités
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
ng	Nanogramme
nm	Nanométre
NN	Nouveau-né
NT	Non typable
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
PLP	Protéine de liaison aux pénicillines
pb	Paire de base
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
RDP	Restriction digest pattern

RFLP	Restriction fragment length polymorfisms
Sec	Seconde
SodA	Superoxide dismutase
Srr	serine-rich repeat
Srt	Sortase
ST	Sequence type
STSS	Syndrome de choc toxique streptococcique
TCS	Two-component systems
Tm	Température d'hybridation
tr/min	nombre de tours par minute
TSA	Antigène spécifique de type
UI	Unité internationale
UV	Ultraviolet
Xis	Excisionase

Introduction

Streptococcus agalactiae ou streptocoque du groupe B (GBS) est un germe commensal de l'homme. En France, environ un tiers des adultes sont colonisés (van der Mee-Marquet *et al.*, 2008), le plus souvent au niveau des voies génito-urinaires, du tube digestif, et plus rarement de la flore oro-pharyngée et de la peau.

Streptococcus agalactiae a tout d'abord été décrit comme agent pathogène animal responsable de la mammite bovine (Nocard et Mollereau, 1887).

Les premiers cas d'infections humaines ont été rapportées dans les années 1930s (Fry, 1938 ; Hill et Butler, 1940 ; Rantz et Kirby, 1942).

Les infections néonatales à *S. agalactiae* ont été rapportées au début des années 1960s (Eickhoff *et al.,* 1964 ; Harper, 1971 ; Hood *et al.,* 1961), et depuis les années 1970s, *S. agalactiae* est le principal agent pathogène pour le nouveau-né (Allardice *et al.,* 1982 ; Anthony et Okada, 1977 ; Lloyd et Reid, 1976 ; Mayon-White, 1985 ; McCracken, 1973). Les souches responsables des infections invasives chez le nouveau-né appartiennent à des clones particuliers caractérisées par le sérotype III, l'appartenance à la division phylogénétique I en MLEE (Musser *et al.,* 1989 ; Quentin *et al.,* 1995) et au ST17 en MLST (Jones *et al.,* 2003b).

Depuis le début des années 2000s, ont émergé des souches responsables d'infections invasives chez l'adulte en dehors de la grossesse (Blancas *et al.,* 2004 ; Phares *et al.,* 2008). Ces infections sont majoritairement des bactériémies, des infections cutanées et ostéoarticulaires (Sendi *et al.,* 2008), diagnostiquées chez le sujet âgé présentant des facteurs de risque d'infection. Les caractéristiques des souches responsables des infections chez l'adulte sont encore mal connues.

Les souches de *S. agalactiae* hébergent fréquemment des phages (Stringer, 1980), et des phages ont été isolés à partir de souches de *S. agalactiae* d'origine bovine (Russell *et al.,* 1969) puis d'origine humaine (Haug *et al.,* 1983 ; Stringer, 1980). Plus récemment, de nombreux éléments génétiques mobiles, et en particulier des prophages, ont été identifiés au niveau du «core génome» des souches séquencées de *S. agalactiae* (Glaser *et al.,* 2002 ; Tettelin *et al.,* 2005).

Les travaux réalisés dans notre équipe (Domelier *et al.,* 2009 ; van der Mee-Marquet *et*

al., 2006) ont montré que des mécanismes de transduction et la lysogénie pourraient avoir participé à l'évolution adaptative de *S. agalactiae* et avoir joué un rôle important dans l'émergence de souches aptes à franchir la barrière hémato-méningée chez le nouveau-né. A ce jour, les souches responsables d'infections invasives chez l'adulte n'ont fait l'objet d'aucune étude portant sur leur contenu prophagique, et l'impact éventuel des transferts horizontaux dans leur émergence et leur virulence.

Revue de la littérature

Streptococcus agalactiae

1. Caractères généraux

a. Taxonomie

Streptococcus agalactiae appartient à la famille des STREPTOCOCCAE et au genre *Streptococcus*, qui regroupe actuellement 55 espèces (Facklam, 2002). Avec la classification des streptocoques de Rebecca Lancefield en 1933, basée sur les caractères antigéniques portés par le polyoside C et les acides teichoïques, *Streptococcus agalactiae* est classé au sein du groupe B (Lancefield, 1933).

b. Caractères morphologiques et culturaux

Les streptocoques sont des cocci à Gram positif, immobiles et asporulés. *S. agalactiae* se présente sous forme sphérique ou ovoïde, de diamètre mesurant 0,6 à 1,2 micromètres (µm), et groupé en diplocoques ou en chaînettes de longueur variable.

Après 24 heures d'incubation à 37° C sur un milieu nutritif gélosé additionné de sang de cheval ou de mouton, *S. agalactiae* se présente sous forme de petites colonies rondes à bords nets, d'environ 3 à 5 mm de diamètre, blanchâtres, translucides, plates et muqueuses. Les colonies de *S. agalactiae* masquent une zone étroite d'hémolyse totale ou β-hémolyse. Ces colonies peuvent produire un pigment jaune à rouge brique (Fallon, 1974).

c. Caractères biochimiques et métabolisme

S. agalactiae est une bactérie anaérobie, aéro-tolérante, dépourvue d'oxydase et de catalase, qui ne réduit pas les nitrates. Les principaux caractères d'identification de cette espèce sont les tests de résistance à la bacitracine, au triméthoprime-sulfaméthoxazole, l'hydrolyse de l'hippurate. Le « CAMP test » (Christie-Atkins-Munch-Peterson) (Christie *et al.*, 1944) met en évidence une hémolyse synergique sur gélose au sang de mouton en présence de la ß-toxine de *Staphylococcus aureus*.

S. agalactiae met en jeu un métabolisme fermentatif du glucose avec une production

d’acides lactique, acétique, et formique, d’éthanol et de dioxyde de carbone.

d. Caractères génomiques

L’analyse du génome des souches séquencées de *S. agalactiae* a mis en évidence un génome mesurant environ 2, 220, 000 paires de bases (pb), constitué d’un «core-genome» représentant environ 80 % du génome, et d’un génome dispensable constitué de gènes partiellement communs ou spécifiques à la souche (Tettelin *et al.*, 2005). *S. agalactiae* a un contenu faible en bases guanine et cytosine (G + C), représentant environ 35,5 % de son génome.

e. Sensibilité aux agents antimicrobiens

S. agalactiae est naturellement sensible aux ß-lactamines telles que la pénicilline G, l’amoxicilline, ou le céfotaxime. Un phénomène de tolérance à la pénicilline a été décrit (Kimura *et al.*, 2008), associé à une modification des protéines de liaison aux pénicillines (PLP).

S. agalactiae est le plus souvent sensible à l’érythromycine, mais une augmentation de l’incidence de la résistance a été observée au cours de la dernière décennie (Murdoch et Reller, 2001 ; Uh *et al.*, 2001). La prévalence de la résistance aux macrolides en France est estimée à environ 17 % (Domelier *et al.*, 2008).

La résistance à la tétracycline est fréquente. Deux mécanismes de résistance acquise à la tétracycline sont décrits : l’efflux, porté par les gènes *tet*(K) et *tet*(L) et la protection ribosomale, portée par les gènes *tet*(M), *tet*(O), et *tet*(T) codant des protéines cytoplasmiques inductibles (Culebras *et al*. 2002 ; Speer *et al.*, 1992).

Des résistances de haut niveau aux aminosides ont été décrites pour deux souches de *S. agalactiae* (Buu-Hoi *et al.*, 1990 ; Liddy et Holliman, 2002).

2. Ultrastructure bactérienne

S. agalactiae présente la structure cellulaire classique des bactéries à Gram positif : elle comprend un cytoplasme délimité par une membrane plasmique, une paroi et une capsule.

a. La paroi

La structure de la paroi cellulaire repose principalement sur la présence du

peptidoglycane, associé à des polymères accessoires tels que les protéines de paroi, le polyoside C, et les acides teichoïques.

- **Le peptidoglycane** est un squelette carboné constitué d'unités disacharidiques répétitives (acide N-acétyleglucosamine, acide N-acétylmuramique) liées par des liaisons β(1-4) et d'un pentapeptide (L-alanine, D-glucose, L-lysine, D-alanine, D-alanine) attaché à l'acide N-acétylmuramique.
- **Les protéines de paroi** peuvent être classées en deux familles principales : les protéines à motifs LPXTG, exposées à la surface, et les lipoprotéines non accessibles en surface et masquées par d'autres composants de l'enveloppe cellulaire (Lindahl *et al.*, 2005). Les fonctions de ces protéines sont diverses (adhésines, nucléases, peptidases, protéases, enzymes, système de transport) et parfois encore inconnues.

Les protéines de surface à motif LPXTG comprennent

- les protéines de la famille Alp dont l'expression est associée aux sérotypes et aux génotypes (Gherardi *et al.*, 2007 ; Lindahl *et al.*, 2005 ; Persson *et al.*, 2008 ; Springman *et al.*, 2009),
- la C5a-peptidase, sérine protéase de 126 kDa codée par le gène *scpB* (Dmitriev *et al.*, 1999 ; Franken *et al.*, 2001),
- la protéine CspA, sérine protéase de 153 kDa codée par le gène *cspA* (Harris *et al.*, 2003),
- la protéine Spb1 de 53 kDa, codée par le gène *spb*1, identifiée chez le clone hypervirulent RDP III-3 ou ST-17, et jouant un rôle dans l'internalisation cellulaire (Adderson *et al.*, 2003),
- la protéine BibA, adhésine immunogénique de 630 acides aminés, codée par le gène *bibA* (Santi *et al.*, 2007),
- les protéines Srr-1 et Srr-2 (serine-rich repeat proteins) (Seifert *et al.*, 2006),
- des pili codés par un opéron comprenant des gènes (*pilA*, *pilB*, et *pilC*) codant les trois protéines formant le pili et deux sortases de type C (SrtC3 et SrtC4) permettant l'assemblage du pili (Dramsi *et al.*, 2006 ; Konto-Ghiorghi *et al.*, 2009 ; Rosini *et al.*, 2006),
- la protéine FbsA, codée par le gène *fbsA*, protéine de surface à motif LPKTG dont l'extrémité N-terminale présente un nombre variable d'unités répétitives (3 à 30) de 16 acides-aminés (Schubert *et al.*, 2002).

Les lipoprotéines sont des protéines de paroi ancrées à la membrane cytoplasmique par des acides gras, comprenant

- la protéine de liaison à la laminine Lmb (laminin binding protein) (Lindahl *et al.*, 2005 ; Spellerberg *et al.*, 1999),
- des transporteurs de type ABC,
- des carboxypeptidases,
- des isomérases,
- des protéases,
- les protéines Blr (Waldemarsson *et al.*, 2006) et LrrG (Seepersaud *et al.*, 2005).

Le polyoside C (ou antigène C) est l'antigène spécifique de *S. agalactiae* dans la classification de Lancefield. Ancré au niveau de l'acide N-acétylmuramique du peptidoglycane, il est constitué de quatre oligosaccharides différents (I, II, III, et IV), composés d'unités répétitives de L-rhamnose, de D-galactose, de 2-acétamido-2-déoxy-D-glucose, et de D-glucitol (Michon *et al.*, 1988).

Les acides teichoïques sont des polymères de glycérol ou de ribitol reliés à des groupements phosphates, liés directement au peptidoglycane ou aux lipides de membrane.

b. La capsule

La capsule de *S. agalactiae* se compose principalement d'eau et d'un composé hétéropolysaccharidique, l'acide hyaluronique.

La capsule présente des structures antigéniques de type TSA, polymères de haut poids moléculaire constitués d'unités répétitives dont la composition variable permet de décrire dix sérotypes (Ia, Ib, II à IX). La structure comporte glucose, galactose, et acide N-acétylneuraminique (acide sialique) pour les neuf sérotypes, ainsi que le N-acétylglucosamine à l'exception des sérotypes VI et VIII. L'unité répétitive du sérotype VIII contient le rhamnose (Cieslewicz *et al.*, 2005).

À l'exception du sérotype II pour lequel le sucre terminal est le galactose, l'acide sialique est en position terminale. L'acide sialique terminal est identique à un épitope sucré très largement réparti à la surface des cellules mammifères (Angata et Varki, 2002).

c. Le cytoplasme et la membrane plasmique

Le cytoplasme comporte les molécules nécessaires à la machinerie moléculaire de la bactérie, soit l'acide nucléique et des enzymes telles que la superoxide dismutase, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) codée par le gène *gapC*, et qui module la réponse immunitaire de l'hôte en induisant la synthèse d'IL-10, cytokine immunosuppresseur (Madureira *et al.*, 2007).

La membrane plasmique, à l'interface du cytoplasme et des structures externes de la cellule bactérienne, se compose de protéines (72 %), de lipides (26 %), et de polyosides (2 %). Des protéines membranaires interviennent dans les échanges inter-membranaires, les mécanismes respiratoires, et la production d'énergie, telles que la protéine de liaison aux pénicillines PBP1a codée par le gène *PonA*, de haut poids moléculaire de 735 acides aminés, ancrée dans la membrane cytoplasmique, et ayant une activité enzymatique de type transglycosylase et transpeptidase (Jones *et al.*, 2003a).

d. Les substances produites

Les souches de *S. agalactiae* excrètent près de 70 produits (Glaser *et al.*, 2002), dont certains sont impliqués dans la virulence tels qu'une hémolysine, un pigment caroténoïde, le facteur CAMP, une hippuricase, des protéases, collagénases, peptidases, et nucléases (Ferrieri, 1985 ; Herbert *et al.*, 2004 ; Spellerberg, 2000), les protéines FbsB liant le fibrinogène, la hyaluronate lyase, l'exotoxine CM101, et la protéine BibA.

3. Identification de *Streptococcus agalactiae*

L'identification de *S. agalactiae* repose sur les caractères morphologiques observés à l'examen direct, les caractères culturaux, les caractères antigéniques, et les caractères biochimiques.

a. Examen direct des cocci à Gram positif à partir des prélèvements biologiques

b. Recherche d'antigènes solubles à partir des prélèvements biologiques

Basée sur la détection d'antigènes du polysaccharide spécifique de *S. agalactiae* grâce à des antisérums monoclonaux, la mise en évidence directe des antigènes bactériens permet d'établir un diagnostique rapide. Différentes techniques ont été élaborées pour détecter les antigènes, telles que la technique immunoenzymatique (Morrow *et al.,* 1984), la contre-immunoélectrophorèse (Baker *et al.,* 1980), ou l'agglutination utilisant des particules de latex sensibilisées.

c. L'isolement du germe

S. agalactiae est un germe anaérobie aéro-tolérant qui cultive sur des milieux enrichis par du sang défibriné de cheval ou de mouton. L'observation d'une β-hémolyse après incubation des milieux gélosés pendant 24 heures à 37° C oriente le diagnostic.

Des milieux de dépistage sélectif pour la détection de *S. agalactiae* facilitent la détection de *S. agalactiae* dans des prélèvements plurimicrobiens (Bou *et al.*, 2005 ; Overman *et al.,* 2002 ; Perry *et al.,* 2006 ; Rosa-Fraile *et al.,* 1999 ; Tazi *et al.,* 2009). Deux types de milieux ont été développés. Le milieu de type Granada qui utilise la propriété de *S. agalactiae* à synthétiser un pigment isoprénoïde orange induit par réduction du méthotrexate entrant dans la composition de la gélose. Le développement en 18 à 24 heures d'anaérobiose orangées est spécifique de *S. agalactiae*. Le second type de milieu correspond à un milieu chromogène, qui permet la détection spécifique d'enzyme en utilisant un substrat chromogène. Ces milieux présentent une sensibilité et spécificité équivalentes à la gélose au sang mais permettent une détection plus rapide et facile (Tazi *et al.,* 2009).

d. Caractérisation de *S. agalactiae*

- **Sérogroupage.** Basé sur l'identification du polysaccharide antigénique spécifique de l'espèce, le sérogroupage est réalisé par l'utilisation de « kits » d'agglutination : après extraction par traitement enzymatique (pronase, pepsine, ou trypsine), les antigènes de surface sont mis en contact avec des particules de latex recouvertes d'anticorps spécifiques.
- **CAMP-test.**
- **Identification biochimique.** L'identification présomptive de *S. agalactiae* peut être obtenue par le test de l'hydrolase de l'hypurate de sodium présent dans les galeries d'identification

des streptocoques d'intérêt médical.

4. Facteurs de virulence et régulation

La pathogénie des infections associées à *S. agalactiae* est associée d'une part à un défaut des mécanismes immunitaires de défense de l'hôte, et d'autre part, à l'action de différents produits élaborés par la bactérie et des antigènes cellulaires.

Nombreux systèmes de signalisation et de régulation de la transcription sont codés dans le génome de *S. agalactiae* (Glaser *et al.,* 2002 ; Tettelin *et al.,* 2005 ; Tettelin *et al.,* 2002).

Le séquençage du génome de *S. agalactiae* a montré la présence de 17 à 20 TCS (Two-component systems) sensibles aux changements de l'environnement externe (Glaser *et al.,* 2002 ; Tettelin *et al.,* 2005 ; Tettelin *et al.,* 2002), et parmi lesquels quatre (TCS CovR/CovS, DltR/DltS, RgfC/RgfA et CiaR/CiaH) sont bien étudiés (Jiang *et al.,* 2005 ; Jiang *et al.,* 2008 ; Lamy *et al.,* 2004 ; Poyart *et al.,* 2001a ; Quach *et al.,* 2009 ; Spellerberg *et al.,* 2002).

S. agalactiae encode au moins six régulateurs de transcription autonomes ou à un seul composant, modulant l'expression génétique en réponse à des changements dans le cytosol ou dans l'environnement extérieur grâce à des capteurs non encore identifiés (Kreikemeyer *et al.,* 2003 ; Ulrich *et al.,* 2005). Les fonctions de trois de ces six régulateurs, appelés MtaR, RogB et RovS, ont été étudiées (Bryan *et al.,* 2008 ; Gutekunst *et al.,* 2003 ; Samen *et al.,* 2006 ; Shelver *et al.,* 2003).

De plus, toutes les souches séquencées de *S. agalactiae* codent des enzymes de signalisation généralement présentes chez les eucaryotes, telles que

- une sérine/thréonine kinase Stk1 et la phosphatase apparentée Stp1,
- une tyrosine kinase CpsD et la phosphatase apparentée CpsB (Lin *et al.,* 2009 ; Rajagopal *et al.,* 2003 ; Rajagopal *et al.,* 2005 ; Rajagopal *et al.,* 2006).

Ci-dessous une présentation des principaux facteurs de virulence et les systèmes impliqués dans leur régulation.

a. Les toxines porogènes : l'hémolysine/cytolysine β (β-H/C) ou CylE, et le facteur CAMP (Christie Atkins Munch Peterson).

Les toxines facilitent l'entrée de *S. agalactiae* dans les cellules de l'hôte, la survie intracellulaire et la diffusion systémique. Leur expression est activée via le système CovR/CovS et réprimée via la sérine/thréonine kinase Stk1 à travers CovR (Jiang *et al.,* 2005 ; Lamy *et al.,* 2004 ; Rajagopal, 2009 ; Rajagopal *et al.,* 2006).

- L'hémolysine/cytolysine β (β-H/C) favorise l'invasion des barrières cellulaires de l'hôte, telles les cellules épithéliales et endothéliales du poumon et la barrière hémato-encéphalique (BHE), et contribue au développement de la méningite (Doran *et al.,* 2002 ; Doran *et al.,* 2003 ; Gibson *et al.,* 1999 ; Nizet *et al.,* 1996). De plus, la β-H/C altère la fonction cardiaque, favorise l'insuffisance hépatique, et induit des réponses inflammatoires qui contribuent aux séquelles neurologiques (Doran *et al.,* 2003 ; Hensler *et al.,* 2008 ; Ring *et al.,* 2000 ; Ring *et al.,* 2002). La biosynthèse de la β-H/C est associée à la production d'un pigment orange (Spellerberg *et al.,* 2000 ; Tapsall, 1986), dont le rôle dans la pathogénicité de *S. agalactiae* a été suggéré par l'inhibition de la défense phagocytaire en association avec la β-H/C (Liu *et al.,* 2004).
- Le facteur CAMP est une protéine codée par le gène *cfb* (Lang et Palmer, 2003 ; Podbielski *et al.,* 1994).

b. Les facteurs favorisant l'échappement immunitaire

S. agalactiae code pour des facteurs qui empêchent sa reconnaissance par l'hôte ou offrent une résistance aux mécanismes de défense de l'hôte.

- **La capsule polysaccharidique riche en acide sialique.** L'analyse de la virulence de souches mutantes acapsulées ou asialysées a montré une diminution de la virulence associée à la perte du polysaccharide capsulaire ou de l'acide sialique (Rubens *et al.,* 1987 ; Wessels *et al.,* 1989). Du plus, la quantité d'acide sialique produite chez des souches isolées d'infections invasives à *S. agalactiae* est 3 fois plus élevée que chez des souches commensales (Teixeira *et al.,* 1993). La transcription des gènes *cps*, qui code pour la synthèse de la capsule, est

réprimée via le régulateur RogB et activée via le système CovR/CovS, de façon dépendante de la souche (Gutekunst *et al.,* 2003 ; Lamy *et al.,* 2004 ; Rajagopal, 2009).

- **La superoxide dismutase.** La superoxide dismutase SodA, une enzyme codée par le gène *sodA*, a un rôle dans la résistance aux dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et l'échappement immunitaire. Cette enzyme permet à la bactérie de lutter contre le stress oxydatif au cours de l'infection. Les souches mutantes pour *sodA* sont plus sensibles aux macrophages et montrent une moindre survie dans le sang et le cerveau de la souris (Poyart *et al.,* 2001b) ; toutefois, la survie des mutants n'est pas modifiée dans le foie ou la rate de la souris. La transcription du gène *sodA* est activée via le régulateur RovS (Rajagopal, 2009 ; Samen *et al.,* 2006).
- **La C5a-peptidase.** La plupart des souches possèdent une sérine peptidase, la C5a-peptidase, associée à la surface bactérienne, et capable de cliver et inactiver spécifiquement la molécule C5a, l'agent attracteur des polynucléaires neutrophiles humains au site de l'infection (Takahashi *et al.,* 1995). Le gène *scpB* code la C5a-peptidase. Les deux systèmes RgfC/RgfA et CovR/CovS répriment l'expression du gène *scpB* (Jiang *et al.,* 2005 ; Rajagopal, 2009 ; Spellerberg *et al.,* 2002).
- **La sérine protéase (CspA),** associée à la surface cellulaire, entraine le clivage des chaines alpha du fibrinogène de la matrice extracellulaire humaine (Harris *et al.,* 2003), et empêche la reconnaissance de *S. agalactiae* par les phagocytes. CspA clive également des chemokines et abolit leur capacité à activer les neutrophiles (Bryan *et al.,* 2008). Bryan *et al.* ont montré une diminution de la résistance à l'opsonophagocytose et une diminution de la virulence des mutants CspA(-) dans un modèle animal (Bryan et Shelver, 2009 ; Harris *et al.,* 2003).
- **La Résistance aux peptides antimicrobiens de l'hôte.** Les peptides antimicrobiens cationiques sont des composants du système immunitaire jouant un rôle dans la lutte contre les infections bactériennes (Hancock et Diamond, 2000). Divers mécanismes sont employés par *S. agalactiae* pour résister à l'action de ces peptides, comme le changement de la charge de surface (Peschel, 2002) par un mécanisme activé via le système DltR/DltS (Poyart *et al.,* 2001a ; Poyart *et al.,* 2003 ; Rajagopal, 2009), les protéines de liaison aux pénicillines (PLP), et les pili.

c. Facteurs favorisant adhésion et invasion de la surface cellulaire de l'hôte

L'adhésion de *S. agalactiae* aux surfaces des cellules de l'hôte est importante pour la

colonisation de la muqueuse et l'invasion. *S. agalactiae* adhère et envahit les cellules épithéliales vaginales, les cellules épithéliales et endothéliales du poumon, et de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ces interactions impliquent la consolidation initiale de *S. agalactiae* aux protéines de la matrice extracellulaire tels que le fibrinogène, la fibronectine, et la laminine, facilitant alors les interactions avec les intégrines de la surface cellulaire de l'hôte et l'entrée dans la cellule (Maisey *et al.,* 2008).

- **Les protéines de liaison au fibrinogène (Fibrinogen-binding proteins).** L'attachement de *S. agalactiae* au fibrinogène de la matrice extracellulaire est médié par les deux protéines FbsA et FbsB (Jacobsson, 2003 ; Schubert *et al.,* 2002).
- FbsA est une protéine associée à la surface de certaines souches de *S. agalactiae* telles que la souche A909 du sérotype Ia, et les souches NEM316, 6313 du sérotype III FbsA est impliquée dans l'adhésion aux cellules épithéliales et aux cellules endothéliales par sa capacité de liaison au fibrinogène. L'affinité de la protéine FbsA pour le fibrinogène varie en fonction du nombre d'unités répétitives (de 16 acides-aminés) à son extrémité N-terminale (Lindahl *et al.,* 2005 ; Rosenau *et al.,* 2007 ; Schubert *et al.,* 2002). Les souches ayant la plus grande capacité à adhérer au fibrinogène sont les souches ayant 4 à 7 répétitions. La protéine FbsA jouerait également un rôle dans la résistance à la phagocytose en interférant avec l'activation du complément. La transcription du gène *fbsA* est réprimée via le régulateur RovS, et activée via le système CovR/CovS et le régulateur RogB.
- FbsB se trouve dans toutes les souches de *S. agalactiae* séquencés à ce jour (Tettelin *et al.,* 2005). FbsB ne semble pas jouer un rôle dans la fixation au fibrinogène, mais dans l'invasion des cellules épithéliales du poumon (Gutekunst *et al.,* 2004). L'expression du gène *fbsB* est réprimée via le régulateur MtaR (Gutekunst *et al.,* 2003 ; Lamy *et al.,* 2004 ; Rajagopal, 2009 ; Samen *et al.,* 2006).
- **La protéine de liaison à la laminine Lmb (Laminin-binding protein).** L'adhésion de *S. agalactiae* à la laminine est associée à la Lmb. Cette protéine présente une homologie avec des protéines de la famille Lra1, impliquées dans l'adhésion et le transport de métaux chez les bactéries à Gram positif (Spellerberg *et al.,* 1999). Les souches mutantes pour gène *lmb* montrent une diminution de l'adhésion à la laminine humaine et aux cellules endothéliales micro-vasculaires du cerveau, suggérant le rôle de la Lmb dans la colonisation et/ou

l'invasion des épithéliums endommagés, et la translocation de *S. agalactiae* dans la circulation sanguine (Spellerberg *et al.,* 1999 ; Tenenbaum *et al.*, 2007).

- Le gène *lmb* est localisé sur un transposon composite en aval du gène *scpB* et en amont d'un ORF (Open Reading Frame) codant une protéine de fonction inconnue. Des éléments génétique mobiles (EGM) peuvent s'insérer dans cette région, notamment l'intron de groupe II GBSi1 (88 pb en amont de *lmb*) et la séquence d'insertion IS*1549* (9pb en amont du gène lmb) (Broker et Spellerberg, 2004). La présence de l'intron GBSi1 entre *ScpB* et *lmb* est un marqueur du clone hyper virulent de sérotype III (Luan *et al.,* 2005).

  Les souches humaines de *S. agalactiae* possèdent les gènes *scpB* et *lmb,* tandis que les souches d'origine bovine ne possèdent pas ces deux gènes, suggérant leur acquisition ou leur perte par transfert horizontal (Franken *et al.,* 2001).
- **Les protéines répétées riche en sérine (Serine-rich repeat proteins).** Les protéines Srr-1 et Srr-2, récemment identifiées chez *S. agalactiae*, sont des protéines glycosylées, localisées à la surface, ayant des fonctions d'adhésion (Siboo *et al.,* 2005 ; Takamatsu *et al.*, 2005).
- **L'adhésine bactérienne immunogénique.** L'adhésion de *S. agalactiae* aux cellules de l'hôte est facilitée par l'adhésine bactérienne immunogénique Bib A située à la surface de *S. agalactiae* sous le contrôle du régulateur transcriptionnel covR/S (Santi *et al.,* 2007). Quatre formes différentes de l'adhésine sont codées par des souches de sérotypes différents.

  Pour les souches de sérotype V, BibA favorise l'adhésion aux cellules épithéliales cervicales et pulmonaires humaines, se lie à un régulateur de la voie classique du complément, et est associée à une résistance à la phagocytose (Santi *et al.,* 2007).
- **La protéine αC** est exprimée le plus souvent à la surface des souches de sérotype Ia, Ib, et II, et rarement chez les souches de sérotype III (Johnson et Ferrieri, 1984 ; Michel *et al.,* 1991). La protéine αC facilite l'internalisation de *S. agalactiae* dans les cellules de l'hôte grâce à son interaction avec la glycosaminoglycane de la cellule (Baron *et al.,* 2004), et en se liant aux intégrines $\alpha_1\beta_1$ situées à la surface des cellules épithéliales (Bolduc et Madoff, 2007).
- **Le gène associé à l'invasion** (invasion-associated gene), *iagA*, a été identifié comme le facteur de virulence le plus important pour la méningite à *S. agalactiae* car associé à un plus fort ancrage membranaire de l'acide lipotéichoïque (Doran *et al.,* 2005).

d. Autres facteurs contribuant à la pathogénie de *S. agalactiae*

- **La hyaluronate lyase** est une protéine secrétée encodée par le gène *hylB,* de poids moléculaire de 111-kDa (Gase *et al.,* 1998 ; Lin *et al.,* 1994), clivant les hyaluronates, composants majeurs du tissu humain et présents dans le placenta, le liquide amniotique, et le poumon (Akhtar *et al.,* 2006 ; Laurent et Fraser, 1992 ; Li et Jedrzejas, 2001 ; Lindahl et Hook, 1978 ; Pritchard *et al.,* 1994) ; l'action enzymatique est associée à la dissémination de la bactérie au cours de l'infection.
- **La toxine CM101.** L'étude des produits extracellulaires de souches de *S. agalaciae* de sérotype III isolées de méningites néo-natales a montré la production d'une exotoxine polysaccharidique de 200 kDa (Hellerqvist *et al.,* 1981 ; Yan *et al.,* 1998). La susceptibilité humaine à cette toxine est limitée aux premiers jours suivant la naissance suggérant l'implication de structures embryonnaires encore exprimées chez le nouveau-né au niveau de l'endothélium pulmonaire en développement, dans le mécanisme de liaison de la toxine aux récepteurs cibles de l'endothélium (Hellerqvist *et al.,* 1993).
- **La Skizzle (SkzL),** protéine de séquence apparentée à celle de la streptokinase et la staphylokinase, se lie au plasminogène et à la plasmine (Wiles *et al.,* 2010) et active le système fibrinolytique induisant l'augmentation de la production de la plasmine, qui détruit la fibrine et la matrice extracellulaire en facilitant la dissémination de la bactérie dans les tissus mous.

Streptococcus agalactiae et la période périnatale

1. Colonisation et transmission

S. agalactiae est un germe commensal des voies gastro-intestinales et génito-urinaires chez la femme enceinte. Le taux de colonisation maternelle varie de 1,6 % à 36 % selon les études (Ohlsson et Shah, 2009 ; Barcaite *et al.*, 2008). La colonisation vaginale à *S. agalactiae* est intermittente et transitoire : seules 30 à 40 % des femmes colonisées en début de grossesse le sont encore à l'accouchement (Dillon *et al.*, 1982).

Chez les nouveau-nés, deux sources de contamination ont été démontrées : la transmission verticale lors de l'accouchement, et la transmission horizontale après la naissance.

À la naissance, 50 à 65 % des nouveau-nés dont les mères sont colonisées par *S. agalactiae* présentent des cultures positives pour ce germe au niveau des muqueuses et de la peau (conduit auditif externe, gorge, ombilic, et site ano-rectal) (Ferrieri *et al.*, 1977 ; Hoogkamp-Korstanje *et al.*, 1982). Environ 98 % des nouveau-nés colonisés restent asymptomatiques, mais 1 à 2 % d'entre eux développent une infection invasive à *S. agalactiae* (Spellerberg, 2000).

La transmission horizontale du nouveau-né après la naissance, à partir de la mère (manuportage maternel, ou transmission par le lait) (Bingen *et al.*, 1992 ; Gajdos *et al.*, 2008), ou à partir d'autres nouveau-nés par l'intermédiaire du personnel soignant (Christensen *et al.*, 1981 ; Paredes *et al.*, 1977) concerne entre 1,2 et 41 % des nouveau-nés colonisés.

2. Incidence des infections materno-fœtales

S. agalactiae est rapporté comme agent pathogène chez l'homme pour la première fois en 1938, avec trois cas d'infections fatales chez des femmes en *post-partum* (Fry, 1938).

Depuis les années 70s, *S. agalactiae* est devenu un agent pathogène important pour la

période périnatale aux États-Unis et en Europe avec un taux de mortalité élevé (Anthony et Okada, 1977). Les infections périnatales à *S. agalactiae* concernent à la fois les nouveau-nés et les femmes enceintes.

a. Les infections chez le nouveau-né

Deux syndromes cliniquement distincts ont été définis.

- **La forme précoce**

Survenant durant les sept premiers jours de vie du nouveau-né, principalement au cours des 24 premières heures de vie (Garland, 1991 ; Yagupsky *et al.*, 1991), cette forme représente 80 à 85 % de l'ensemble des infections néonatales (Mckenna et Iams, 1998), et correspond essentiellement à des infections respiratoires (54 %), des septicémies sans source identifiée (27 %), et des méningites (15 %) (Yagupsky *et al.*, 1991). Cette infection résulte généralement d'une transmission verticale *in utero* à partir du tractus génital maternel ou lors du passage de la filière génitale au cours de l'accouchement (Figure 1).

Chez les femmes enceintes colonisées, plusieurs facteurs sont associés à une augmentation du risque d'infection précoce : un inoculum bactérien élevé au niveau vaginal, un antécédent de contamination materno-fœtale, une infection urinaire à *S. agalactiae* pendant la grossesse, une rupture prématurée et/ou prolongée des membranes (≥ 18 heures), des manœuvres d'extraction instrumentales, une chorioamniotite, une fièvre maternelle pendant l'accouchement, un faible taux d'anticorps maternels, et un faible poids de naissance (< 2500 g) (Blond *et al.*, 1997).

La mortalité peut représenter jusqu'à 55 % des nouveau-nés infectés, et concerne plus particulièrement les nouveau-nés prématurés ou de faible poids pour lesquels le taux de mortalité est estimé respectivement à 42 % et 36 % versus 6 % pour un enfant né à terme (Lim *et al.*, 1997).

- **La forme tardive**

Cette forme est observée entre le 7ème jour et le 3ème mois de vie du nouveau-né. Elle revêt un aspect clinique polymorphe : septicémie (46 %), méningite (37 %), et plus rarement infections urinaires, ostéite, arthrite, cellulite, ou infections pulmonaires (Yagupsky *et al.*, 1991). L'origine du germe responsable de l'infection est incertaine ; une transmission horizontale par

l'intermédiaire de la mère ou du personnel hospitalier et/ou une transmission materno-fœtale périnatale ont été décrites (Dillon *et al.*, 1987 ; Greatrex, 1997). Contrairement à l'infection précoce, aucun facteur de risque n'est clairement défini pour la forme tardive de l'infection à *S. agalactiae*.

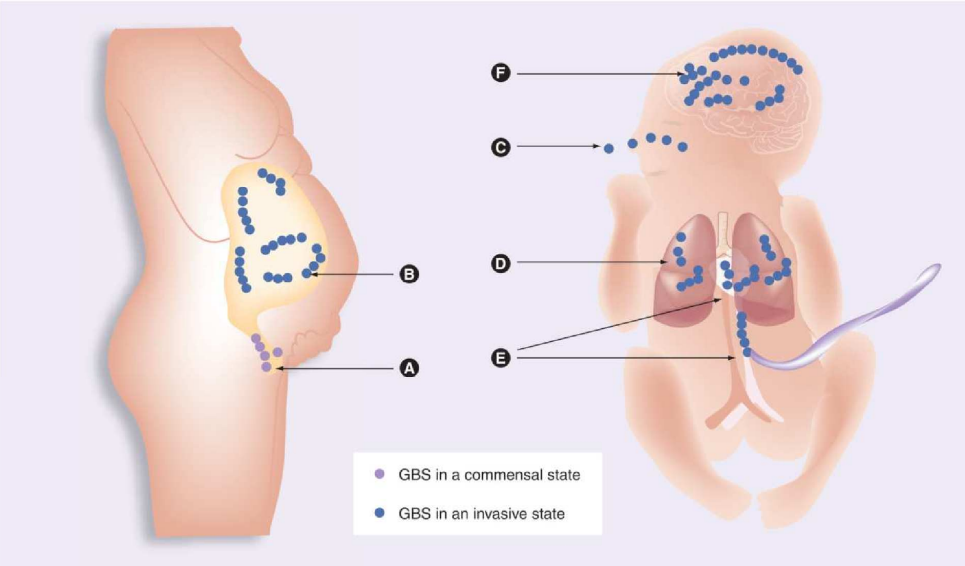


Figure 1. *S. agalactiae*, pathogène du nouveau-né, d'après Rajagopal, 2009.
(A) *S. agalactiae* réside en tant que commensal dans le tractus génital et gastro-intestinal inférieur de la femme. (B) *S. agalactiae* peut s'infiltrer dans le compartiment intra-utérine de la mère enceinte qui est un porteur asymptomatique. (C) Le nouveau-né aspire *S. agalactiae* dans l'utérus ou pendant l'accouchement. (D) *S. agalactiae* envahit les poumons du nouveau-né provoquant la pneumonie. (E) à partir des poumons, *S. agalactiae* accède à la circulation sanguine du nouveau-né provoquant la septicémie, et envahit de multiple organes néonataux, y compris le cœur. (F) *S. agalactiae* pénètre la barrière hémato-encéphalique, provoquant la méningite.

La mortalité de cette forme de l'infection est moindre que celle observée pour la forme précoce (2 à 6 %) (Baker, 1997), mais les séquelles neurosensorielles majeures sont fréquentes (50 %), en particulier après une méningite (Edwards et Baker, 2001).

b. Les infections chez la femme enceinte

L'étude réalisée aux États-Unis en 1989-1990 a montré que 15 % des infections invasives à *S. agalactiae* concernent les femmes enceintes (Farley *et al.*, 1993).

Chez la femme enceinte, *S. agalactiae* est responsable de manifestations cliniques variant

de l'infection urinaire aux formes septicémiques et méningées potentiellement mortelles. La septicémie est la manifestation la plus représentative des infections invasives, mais d'autres infections ont été décrites (ostéomyélite, endocardite, ou méningite) (Braun *et al.,* 1995 ; George *et al.,* 2008 ; Lischke et McCreight, 1990 ; Sexton *et al.,* 1985). Les infections maternelles non invasives à *S. agalactiae* incluent des infections urinaires (Moller *et al.,* 1984 ; Thomsen *et al.,* 1987 ; Wood et Dillon, 1981), des amnionites, des endométrites, des chorioamniotites, des cystites, des pyélonéphrites, des infections de plaie (*post-césarienne* et *post-épisiotomie*), des cellulites, et des fasciites (Minkoff *et al.,* 1982 ; Schuchat, 1998 ; Sutton *et al.,* 1985 ; Yancey *et al.,* 1994). *S. agalactiae* peut également entrainer une rupture prématurée des membranes et/ou un avortement, ou une stérilité (Baker, 1997). La réalisation d'un accouchement par césarienne semble être un facteur de risque pour l'endométrite de *post-partum* (Minkoff *et al.,* 1982).

3. Sérotype des souches responsables d'infections materno-fœtales

Chez les femmes enceintes, les souches de colonisation se distribuent principalement dans les quatre sérotypes Ia, II, III, et V, avec une prédominance du sérotype III en Europe (Brimil *et al.,* 2006 ; Jones *et al.,* 2006a ; Kieran *et al.,* 1998 ; Motlova *et al.,* 2004 ; Savoia *et al.,* 2008 ; Tsolia *et al.,* 2003), et du sérotype Ia aux Etats-Unis (Campbell *et al.,* 2000).

Les souches responsables d'infections néonatales précoces aux Etats-Unis se distribuent de façon similaire avec un tiers des souches de sérotype Ia, un tiers de sérotype III, et en augmentation depuis les années 90s, 14 à 19 % de sérotype V, 9 % de sérotype Ib, et 9 % de sérotype II (Schuchat, 1998 ; Shet et Ferrieri, 2004).

Pour les souches isolées d'infections néonatales tardives, le moitié des souches sont de sérotype III, 27 % de sérotype Ia, 14 % de sérotype V, 5 % de sérotype Ib, et 3 % de sérotype II (Schuchat, 1998 ; Shet et Ferrieri, 2004).

4. Diagnostic

Pour le diagnostic de l'infection néonatale, les cultures sont effectuées à partir du sang, de la cavité buccale, de l'aspiration gastrique, du conduit auditif externe, de l'ombilic et de l'aisne, en complément de l'examen clinique, du dosage de la protéine C réactive, et de la numération formule sanguine (Andersen *et al.,* 2004).

5. Prophylaxie et traitement

La prévention de la transmission verticale de *S. agalactiae* repose sur l'administration d'antibiotiques à la mère colonisée juste avant l'accouchement. Pour une détection optimale de la colonisation maternelle, un prélèvement de la partie basse du vagin est recommandé, suivi par celui du rectum. Des milieux sélectifs sont utilisés afin d'optimiser l'isolement de *S. agalactiae* à partir de la flore génitale (Easmon et Hastings, 1985). Plusieurs tests rapides de détection à l'accouchement ont été évalués, reposant sur l'hybridation fluorescente in situ, la PCR en temps réel et le latex d'agglutination (Artz *et al.,* 2003 ; Bergeron et Ke, 2001 ; Bergh *et al.,* 2004 ; Das *et al.,* 2003). A ce jour, les données de sensibilité et spécificité de ces tests ne permettent pas de remplacer la culture.

La pénicilline G est l'antibiotique de choix pour la prophylaxie ; une dose initiale de 5 MU, puis 2,5 MU en intraveineuse toutes les 4 heures jusqu'à l'accouchement (Gibbs *et al.,* 2004). En cas d'allergie à la Pénicilline, l'érythromycine ou la clindamycine sont recommandées. Néanmoins, l'augmentation de la résistance à ces antibiotiques a été signalée depuis 10 ans (Decoster *et al.,* 2005 ; Edwards, 2006 ; Schoening *et al.,* 2005), nécessitant la réalisation de l'antibiogramme pour les souches. Si la sensibilité à la clindamycine est vérifiée, cet antibiotique est recommandé. Dans les cas d'une résistance à l'érythromycine et à la clindamycine, la vancomycine constitue une alternative (Edwards, 2006).

6. Vaccination

L'immunisation des femmes pourrait être une alternative pour prévenir les infections néonatales précoces et tardives par le transfert transplacentaire des anticorps IgG (Berg *et al.,* 2000 ; Gilbert, 2004). Cette stratégie pourrait également être efficace pour la diminution de la mortinatalité et de l'infection maternelle (Pettersson, 2007 ; Sinha *et al.*, 2005).

La difficulté principale dans l'élaboration de vaccins efficaces pour la prévention des infections materno-fœtales à *S. agalactiae* est l'existence de plusieurs sérotypes. Deux types d'antigènes ont été considérés comme candidats pour un vaccin : les polysaccharides capsulaires et les protéines de surface.

Streptococcus agalactiae
chez l'adulte en dehors de la grossesse

1. Prévalence de la colonisation

Le taux de colonisation varie de 16 à 35 % (Brimil *et al.,* 2006 ; Easmon *et al.,* 1981b ; Edwards *et al.,* 2005 ; Manning *et al.,* 2004 ; Manning *et al.,* 2002 ; Meyn *et al.,* 2002 ; sendi *et al.,* 2008 ; van der Mee-Marquet *et al.,* 2008).

La colonisation est le plus souvent retrouvée au niveau rectum, de la zone périanale, du vagin, du col de l'utérus, de l'urètre, et moins fréquemment, à partir des cultures de la peau, de la gorge ou du pharynx.

La prévalence est plus élevée chez les personnes actives sexuellement et celles qui ont de multiples partenaires sexuels, suggérant une acquisition associée à des contacts intimes (Manning *et al.,* 2000 ; Meyn *et al.,* 2002). Cette suggestion est affirmée par une étude montrant des souches identiques pour les partenaires sexuels co-colonisés (Manning *et al.,* 2002).

2. Incidence et émergence des infections

L'incidence des infections chez l'adulte augmente régulièrement. Compte tenu de la baisse des infections néonatales, plus des deux tiers des infections à *S. agalactiae* aux États-Unis sont diagnostiquées chez l'adulte, le plus souvent en dehors de la grossesse (Farley, 2001).

Aux États-Unis, au cours des années 90s, trois grandes études épidémiologiques ont montré une augmentation significative de l'incidence annuelle des infections invasives chez l'adulte en dehors de la grossesse variant de 2,4 à 5,9 cas / 100,000 habitants entre 1982-1983 et 1992-1993 (Blumberg *et al.,* 1996 ; Farley *et al.,* 1993 ; Schwartz *et al.,* 1991), pour atteindre 7,3 cas / 100, 000 habitants en 2007 (Phares *et al.,* 2008 ; Skoff *et al.,* 2009 ; Figure 2), et 22 cas / 100, 000 habitants aujourd'hui (Skoff *et al.,* 2009).

En Espagne, les données d'incidence présentent la même tendance, avec une augmentation de 0,53 à 0,96 cas / 1000 admissions entre 1993-1994 et 1999-2000, ainsi qu'une augmentation dans l'incidence de la bactériémie de 0,08 à 0,3 cas / 1000 admissions entre 1985 et

1994, et de 0,15 à 0,42 cas / 1000 admissions entre 1993-1994 et 1999-2000 (Blancas *et al.*, 2004 ; Munoz *et al.*, 1997).

Au Japon, une étude récente a montré que les infections chez l'adulte en dehors de la grossesse représentent près de 90 % des infections à *S. agalactiae* entre 1998 et 2007 dans un centre hospitalier (Matsubara et Yamamoto, 2009).

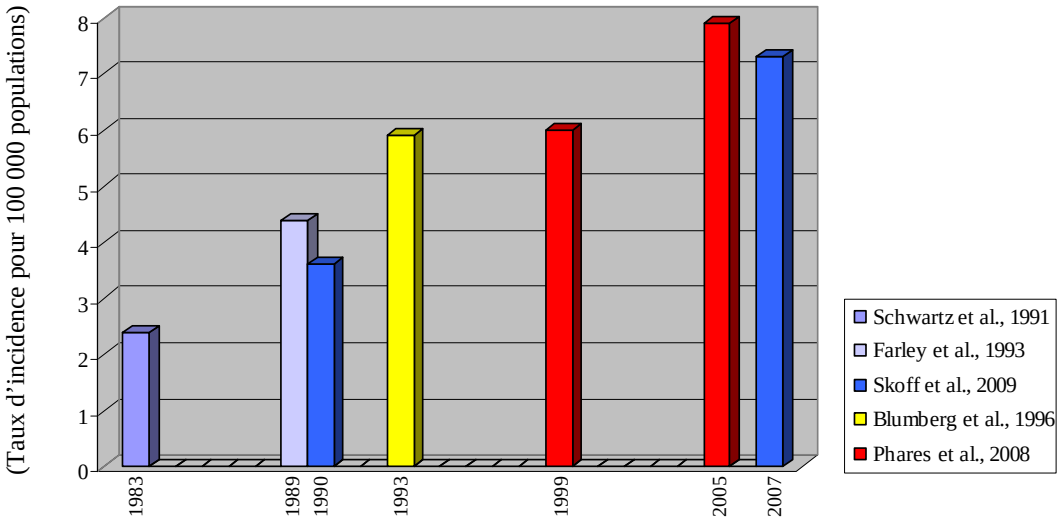


Figure 2. Incidence des infections chez l'adulte aux États-Unis entre 1983 et 2007.

Les infections invasives de l'adulte sont le plus souvent extrahospitalières (communautaires), plus rarement d'origine nosocomiale (entre 6 et 52 % selon les études ; tableau 1) (Blancas *et al.*, 2004 ; Bolanos *et al.*, 2001 ; Falagas *et al.*, 2006 ; Ho *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2001 ; Larppanichpoonphol et Watanakunakorn, 2001 ; Liu *et al.*, 1997 ; Matsubara et Yamamoto, 2009 ; Perovic *et al.*, 1999 ; Skoff *et al.*, 2009 ; Trivalle *et al.*, 1998 ; Tyrrell *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2002).

3. Sérotype des souches des infections invasives de l'adulte.

Chez l'adulte, près de 70 % des infections à *S. agalactiae* aux États-Unis et au Canada, sont associées à des souches de sérotypes Ia, III, et V (Blumberg *et al.*, 1996 ; Farley, 2001 ; Harrison *et al.*, 1998 ; Phares *et al.*, 2008 ; Skoff *et al.*, 2009 ; Tyrrell *et al.*, 2000). Le sérotype VI a une importance notable en Asie (Karunakaran *et al.*, 2009). Les trois sérotypes Ia, III, et V prédominent aussi parmi les souches isolées de colonisation asymptomatique (Edwards *et al.*,

2005 ; van der Mee-Marquet *et al.,* 2008).

Tableau 1. Infections nosocomiales à *S. agalactiae* diagnostiquées chez l'adulte.

% des infections nosocomiales	Pays de l'étude	Références
52	Grèce	Falagas et al., 2006
30,3	France	Trivalle *et al*., 1998
28	Espagne	Bolanos *et al*., 2001
26,7	Taiwan	Ho *et al*., 2006
25,4	Corée	Kim *et al*., 2001
25	Afrique du sud	Perovic *et al*., 1999
24	Taiwan	Liu *et al*., 1997
12,8	Hong Kong	Wang *et al*., 2002
12,1	Canada	Tyrrell *et al*., 2000
9,3	Espagne	Blancas *et al*., 2004
8,3	États-Unis	Skoff *et al*., 2009
7,7	Japon	Matsubara *et al*., 2009
6	États-Unis	Larppanichpoonphol *et al*., 2001

4. Mortalité

Le taux de mortalité des infections invasives de l'adulte est élevé, estimé à 18 % et variant entre 6 et 35 % selon les études, vraisemblablement en lien avec les facteurs de risque associés que présentent les sujets adultes infectés (Tableau 2) (Blancas *et al.,* 2004 ; Bolanos *et al.,* 2001 ; Cooper et Morganelli, 1998 ; Farley *et al.,* 1993 ; Ho *et al.,* 2006 ; huang *et al.,* 2006 ; Jackson *et al.,* 1995 ; Kim *et al.,* 2001 ; Larppanichpoonphol et Watanakunakorn, 2001 ; Liu *et al.,* 1997 ; Matsubara et Yamamoto, 2009 ; Perovic *et al.,* 1999 ; Schrag *et al.,* 2000 ; Schwartz *et al.,* 1991 ; Skoff *et al.,* 2009 ; Trivalle *et al.,* 1998 ; Tyrrell *et al.,* 2000 ; Wang *et al.,* 2002).

La moitié de la mortalité attribuable à ces infections survient chez les patients de plus de 65 ans (Edwards et Baker, 2005 ; Larppanichpoonphol et Watanakunakorn, 2001). D'autres facteurs ont été rapportés comme favorisant la mortalité attribuable à ces infections, tels que le choc, la thrombocytopénie, le cancer, et la bactériémie polymicrobienne (Blancas *et al.,* 2004 ; huang *et al.,* 2006).

5. Conditions prédisposantes et facteurs de risque

Les études portant sur les infections à *S. agalactiae* chez l'adulte (Blancas *et al.,* 2004 ; Bolanos *et al.,* 2001 ; Falagas *et al.,* 2006 ; Farley *et al.,* 1993 ; Ho *et al.,* 2006 ; Huang *et al.,*

2006 ; Jackson *et al.,* 1995 ; Lefebvre *et al.,* 2007 ; Perovic *et al.,* 1999 ; Schrag *et al.,* 2000 ; Skoff *et al.,* 2009 ; Trivalle *et al.,* 1998 ; Tyrrell *et al.,* 2000 ; Wang *et al.,* 2002) permettent de définir les facteurs les plus souvent associés à l'infection (tableau 3).

Tableau 2. Taux de mortalité associé aux infections invasives de l'adulte.

Taux de mortalité (%)	Pays de l'étude	Référence
35	Afrique du sud	Perovic *et al*., 1999
32	Etats-Unis	Schwartz *et al*., 1991
31	Espagne	Bolanos *et al*., 2001
27,3	France	Trivalle *et al*., 1998
21	Etats-Unis	Jackson *et al*., 1995
21	Etats-Unis	Farley *et al*., 1993
20,2	Taiwan	Huang *et al*., 2006
18,9	Taiwan	Ho *et al*., 2006
18	Taiwan	Liu *et al*., 1997
16,7	Etats-Unis	Larppanichpoonphol *et al*., 2001
15,3	Etats-Unis	Cooper et Morganelli, 1998
15	Japon	Matsubara *et al*., 2009
12	Etats-Unis	Schrag *et al*., 2000
10,6	Hong Kong	Wang *et al*., 2002
9,8	Corée	Kim *et al*., 2001
9,3	Espagne	Blancas *et al*., 2004
7,5	Etats-Unis	Skoff *et al*., 2009
5,5	Canada	Tyrrell *et al*., 2000

Les principaux facteurs de risque sont le diabète, le cancer, les maladies cardio-vasculaires, les pathologies sous jascentes hépatiques, urologiques, respiratoires et neurologiques, l'alcoolisme et l'immunodépression, (rapportées aussi comme immunodépression, immunosuppression. Au moins un des facteurs principaux est présent dans plus de 70 % des cas d'infection. Néanmoins, 30 % de ces infections sont diagnostiquées chez des adultes n'ayant aucun facteur de risque connu.

6. Les manifestations cliniques

Les infections invasives sont polymorphes. Aussi, *S. agalactiae* étant un germe commensal occasionnel de la peau, du tube digestif, de la gorge, et des voies génito-urinaires chez l'adulte, la distinction entre souches commensales et souches pathogènes est parfois complexe. *S. agalactiae* peut être isolé de sites infectés avec d'autres organismes virulents, et son rôle dans la pathogénicité est parfois contesté.

Tableau 3. Fréquence des facteurs de risque favorisant l'infection chez l'adulte.

Facteur de risque	% (IQR)
Diabète	33 (20-63)
Cancer (souvent rapporté comme malignité ou néoplasie)	22 (0-44)
Maladies cardio-vasculaires	16 (0-35)
Maladies hépatiques (notamment la cirrhose)	10 (0-26)
Maladies neurologiques	9 (0-40)
Alcoolisme	7 (0-22)
Maladies rénales (notamment l'insuffisance rénale)	5 (0-18)
Maladies urologiques	4 (0-22)
Maladies respiratoires ou pulmonaires	4 (0-14)
Troubles immunitaires (Immunosuppression ou SIDA)	4 (0-13)
Trauma antérieur du site infecté	2 (0-25)
Cas grabataire	2 (0-18)
Chirurgie	2 (0-17)
Autres facteurs	≤ 1 (0-17)

Cependant, les études des infections invasives pour lesquelles *S. agalactiae* est isolé de sites normalement stériles comme le sang ou le liquide céphalorachidien fournissent une preuve directe que *S. agalactiae* est l'agent étiologique de nombreux syndromes cliniques (Bayer *et al.,* 1976 ; Blancas *et al.,* 2004 ; Bolanos *et al.,* 2001 ; Colford *et al.,* 1995 ; Falagas *et al.,* 2006 ; Farley *et al.,* 1993 ; Gallagher et Watanakunakorn, 1985 ; Ho *et al.,* 2006 ; Huang *et al.,* 2006 ; Jackson *et al.,* 1995 ; Kim *et al.,* 2001 ; Larppanichpoonphol et Watanakunakorn, 2001 ; Lefebvre *et al.,* 2007 ; Lerner *et al.,* 1977 ; Munoz *et al.,* 1997 ; Opal *et al.,* 1988 ; Schugk *et al.,* 1997 ; Schwartz *et al.,* 1991 ; Skoff *et al.,* 2009 ; Skogberg *et al.,* 1988 ; Trivalle *et al.,* 1998 ; Tyrrell *et al.,* 2000 ; Verghese *et al.,* 1986 ; Wang *et al.,* 2002).

Les principales formes cliniques des infections invasives de l'adulte en dehors de la grossesse sont les suivantes (tableau 4) :

- **Bactériémies sans porte d'entrée retrouvée**. C'est la forme clinique la plus fréquemment associée aux infections invasives, avec environ 24 % des infections. La recherche de l'atteinte d'un organe profond, comme en cas d'endocardite ou d'ostéoarthrite (Edwards et Baker, 2005) doit être mise en œuvre.
- **Infections de la peau et des tissus mous.** Représentant un quart des infections, elles regroupent le plus souvent érysipèles, cellulites, plaies infectées et ulcères, et plus rarement myosite, fasciite nécrosante, syndrome de choc toxique, et abcès intramusculaires.

  La cellulite est l'infection de la peau et des tissus mous la plus fréquente (Edwards et Baker,

2005 ; Lee *et al.,* 2005). Elle est diagnostiquée chez des patients ayant des conditions prédisposantes locales ou régionales comme une insuffisance lymphatique ou vasculaire, un antécédent de radiothérapie, ou une dermatite chronique (Bisno et Stevens, 1996 ; Farley *et al.,* 1993 ; Semel et Goldin, 1996). En particulier, un antécédent de cancer de sein, une mastectomie, une chirurgie de conservation de sein prédisposent à une cellulite du bras et la paroi thoracique (Farley *et al.,* 1993 ; Jackson *et al.,* 1995 ; Mertz *et al.,* 1998).

Chez le diabétique présentant des ulcères de pied, *S. agalactiae* est le pathogène le plus fréquemment impliqué parmi les bactéries à Gram positif isolées après *Staphylococcus* aureus (Raja, 2007). De plus, la présence d'escarre est associée à un risque plus important d'infection invasive à *S. agalactiae* (Jackson *et al.,* 1995).

La fasciite nécrosante à *S. agaalctiae* est une infection grave souvent polymicrobienne (Type I) associée à un antécédent chirurgical, le diabète ou une pathologie vasculaire, se manifestant cliniquement par la destruction des graisses et du fascia. Plus rarement, la fasciite est monomicrobienne (type II), et se présente avec une douleur locale intense, une extension rapide de la nécrose du tissus sous-cutané, et une toxicité systémique. Le nombre de cas rapportés dans la littérature (type I et II) est en augmentation constante (Akita *et al.,* 2006 ; Blancas *et al.,* 2004 ; Chang *et al.,* 2006 ; Crum et Wallace, 2003 ; Gardam *et al.,* 1998 ; Holmstrom et Grimsley, 2000 ; Lee *et al.,* 2005 ; Riefler *et al.,* 1988 ; Tang *et al.,* 2000 ; Wang *et al.,* 2002 ; Wong *et al.,* 2004), y compris chez des patients sans facteurs de risque (Akita *et al.,* 2006 ; Wong *et al.,* 2004).

Le syndrome de choc toxique streptococcique (STSS) est une maladie aiguë et fébrile classiquement associée à *S. pyogenes,* débutant avec un syndrome viral bénin progressant rapidement vers un choc et une défaillance multiorgane. Les cas de STSS à *S. agalactiae* sont souvent associés aux infections cutanées graves (Chang *et al.,* 2006 ; Crum et Wallace, 2003 ; Gardam *et al.,* 1998 ; Holmstrom et Grimsley, 2000 ; Reich *et al.,* 2004 ; Wong *et al.,* 2004).

- **Infections respiratoires.** Ces infections représentent environ 11 % des infections. La pneumonie est la forme la plus fréquente. Elle se produit souvent chez l'adulte âgé souffrant de troubles neurologiques (Farley, 2001).
- **Infections génito-urinaires**. Elles représentent 10 % des infections. Les infections des voies urinaires sont plus fréquentes chez les sujets âgés (âge moyen 71 ans) (Bayer *et al.,* 1976 ; Farley, 1995 ; Farley, 2001 ; Farley *et al.,* 1993 ; Opal *et al.,* 1988 ; Trivalle *et al.,* 1998 ;

Verghese *et al.,* 1986).

- **Infections ostéoarticulaires.** Les infections ostéoarticulaires représentent environ 9 % des infections. L'ostéomyélite survient le plus souvent par la dissémination adjacente ou l'inoculation directe (Garcia-Lechuz *et al.*, 1999). Les os du pied sont souvent en cause; cette implication est liée à une insuffisance vasculaire et des ulcères du dessus et la dissémination de l'infection de la peau ou des tissus mous adjacents. L'ostéomyélite vertébrale, habituellement dans la région lombo-sacrée, est aussi décrite; la dissémination hématogène est le mécanisme le plus probable de l'infection, et la destruction vertébrale est minime (Farley, 2001). L'arthrite septique à *S. agalactiae* est généralement monoarticulaire, impliquant le plus souvent le genou, la hanche, l'épaule ou les articulations (Garcia-Lechuz *et al.*, 1999). L'infection tardive de la prothèse articulaire avec *S. agalactiae* peut résulter du semis septicémique au cours d'une procédure invasive (par exemple, sigmoïdoscopie), ou en présence d'un foyer lointain d'infection (par exemple, une endocardite). Les conditions les plus souvent associées à l'infection ostéoarticulaire sont l'histoire de la chirurgie osseuse, les articulations prothétiques implantées de la hanche, et le diabète (Garcia-Lechuz *et al.*, 1999).
- **Infections abdominales.** Elles représentent environ 5 % des infections. La péritonite est la plus fréquente. Elle survient chez des patients présentant une pathologie gastro-intestinale ou hépatique, ou chez les sujets dialysés (Blancas *et al.*, 2004 ; Farley *et al.*, 1993).
- **Endocardite**. L'endocardite représente 4 % des infections. Elle peut être compliquée par une péricardite, une myocardite, l'endophtalmie, et des anévrismes mycosiques. Parfois méconnue, l'endocardite était présente chez plus d'un quart des patients adultes présentant un épisode récurrent d'infection invasive à *S. agalactiae* (Harrison *et al.*, 1995a). La mortalité liée à l'endocardite est élevée, proche de 50 % (Edwards et Baker, 2005 ; Farley, 2001).
- **Infections du système nerveux central**. La méningite est une manifestation importante mais rare de l'infection à *S. agalactiae*; elle représente 4 % de ces infections. L'apparition des symptômes est généralement brutale, et la bactériémie associée dans près de 80 % des cas (Domingo *et al.*, 1997 ; Dunne et Quagliarello, 1993). Un foyer à distance, tel qu'une endométrite ou une endocardite, est fréquent. Le taux de mortalité est élevé (27 à 34 %) et étroitement lié à la présence d'affections sous-jacentes. La perte permanente de l'audition est une séquelle fréquente (7 %) (Farley, 2001).
- Plus rarement *S. agalactiae* est responsable d'infections sur cathéter ou de prothèse

vasculaire, d'abcès hépatique, de l'œil, l'oreille, nez, ou gorge, d'infections gastro-intestinales ou biliaires, de lymphadénite, mastite, ou pancréatite.

Tableau 4. Infections invasives à *S. agalactiae* chez l'adulte en dehors de la grossesse.

Type d'Infection	**% (IQR)**
Bactériémie sans source retrouvée	24 (3-40)
Infections cutanées (Infections de la peau ou des tissus mous)	23 (12-42)
Infections respiratoires (notamment la pneumonie)	11 (0-19)
Infections génito-urinaires	10 (0-33)
Infections ostéoarticulaires	9 (3-26)
Infections abdominales	5 (0-10)
Endocardite	4 (0-13)
Infections du système nerveux central (notamment la méningite)	4 (0-7)
Autres infections	< 1 (0-12)

7. Les infections récurrentes

Environ 5 % des adultes infectés par *S. agalactiae* en dehors de la grossesse, présentent au moins un deuxième épisode (Harrison *et al.,* 1995a ; Sendi *et al.,* 2008). Dans plus d'un tiers des cas, les patients présentent des infections profondes telles une endocardite ou une ostéomyélite vraisemblablement présentes mais non diagnostiquées au cours du premier épisode (Farley, 2001).

Le portage gastro-intestinal ou génito-urinaire d'une souche particulière de *S. agalactiae*, à laquelle l'hôte est sensible (une souche virulente, ou un hôte immunodéficient, ou les deux), peut constituer un réservoir pour l'infection invasive récurrente (Del Giudice *et al.,* 2006 ; Sendi *et al.,* 2007). L'acquisition répétée de la souche par contact intime avec un porteur de *S. agalactiae* doit aussi être envisagée.

8. Les infections polymicrobiennes

Dans près d'un tiers des cas d'infections, et notamment pour les infections de la peau et des tissus mous et les bactériémies, *S. agalactiae* est associé à d'autres germes (tableau 5) (Blancas *et al.,* 2004 ; Farley *et al.,* 1993 ; Ho *et al.,* 2006 ; Jackson *et al.,* 1995 ; Karunakaran *et al.,* 2009 ; Kim *et al.,* 2001 ; Lee *et al,* 2005 ; Matsubara et Yamamoto, 2009 ; Perovic *et al.,* 1999 ; Skoff *et al.,* 2009 ; Verghese *et al.,* 1986). *Staphylococcus aureus* est souvent en cause,

moins fréquemment *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, ainsi que des staphylocoques à coagulase négative, et des Entérobactéries.

Tableau 5. Fréquence des infections polymicrobiennes invasives chez l'adulte.

% des infections polymicrobiennes	Pays de l'étude	Référence
26,9	Japon	Matsubara *et al*., 2009
7.6	États-Unis	Skoff *et al*., 2009
55	Malaisie	Karunakaran *et al*., 2009
8,9	Taiwan	Ho *et al*., 2006
35,2	Taiwan	Lee *et al*., 2005
29.3	Espagne	Blancas *et al*., 2004
11.9	Corée	Kim *et al*., 2001
35	Afrique du sud	Perovic *et al*., 1999
26	États-Unis	Jackson *et al*., 1995
30	États-Unis	Farley *et al*., 1993
43		Verghese *et al*., 1986

Caractérisation des souches de *S. agalactiae*

On distingue des méthodes phénotypiques et génotypiques pour caractériser les souches de *S. agalactiae*.

1. Sérotypage

La sérotypie est la méthode phénotypique la plus utilisée, avec 10 sérotypes sont actuellement décrits : Ia, Ib, et II-IX. La détermination des sérotypes peut être réalisée par PCR (Imperi *et al.*, 2010 ; Kong *et al.*, 2002).

2. Lysotypie

Un système de lysotypie (Stringer, 1980) a été utilisé au début des années 1980s en combinaison avec la sérotypie pour étudier les souches de *S. agalactiae* au cours d'investigations épidémiologiques (Band *et al.*, 1981 ; Boyer *et al.*, 1980 ; Easmon *et al.*, 1981a ; Noya *et al.*, 1987 ; Stringer, 1980).

3. Sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été utilisée pour caractériser les souches de *S. agalactiae* (Borchardt *et al.*, 2006 ; Correa *et al.*, 2009 ; Florindo *et al.*, 2009 ; Lin *et al.*, 2000 ; Rouse *et al.*, 1998 ; Trijbels-Smeulders *et al.*, 2006).

4. Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)

La méthode est basée sur l'analyse des variations de la mobilité de protéines dues à des différences de charge reflétant les substitutions d'acides aminés dans les gènes chromosomiques qui les codent. Cette méthode a permit d'établir la structure clonale de l'espèce (Helmig *et al.*, 1993 ; Musser *et al.*, 1989 ; Quentin *et al.*, 1995), et l'existence de deux grandes divisions désignées MLEE I et MLEE II au sein de l'espèce ; la division MLEE I est très homogène et comporte un nombre très limité d'électrophorétypes, dominé par l'électrophorétype ET1. La division MLEE II est plus hétérogène et comporte un nombre élevé d'électrophorétypes

La répartition des souches invasives de *S. agalactiae* dans ces deux divisions est particulière : les souches responsables d'infections invasives néonatales se distribuent essentiellement dans la division MLEE I (85 % aux Etats-Unis, 50 % en France) et dans un nombre limité d'électrophorétypes de la division MLEE II (ET11 et ET12).

Une méthode de PCR amplifiant un cluster de gènes codant des ARNt en aval de l'ARNr distingue les souches appartenant au groupe MLEE I ou à l'électrophorétype ET11 des souches appartenant au groupe MLEE II (Rolland *et al.*, 2002).

5. Analyse des plasmides

L'analyse des plasmides a été le premier outil d'épidémiologie moléculaire utilisé pour étudier les caractéristiques génotypiques de *S. agalactiae* (El-solh *et al.*, 1978). La prévalence faible des plasmides chez *S. agalactiae* (Denning *et al.*, 1989) limite l'intérêt de la méthode.

6. Restriction Digest Pattern typing (RDP)

Cette méthode est basée sur la restriction de l'ADN chromosomique avec l'utilisation d'enzymes ayant une forte fréquence de sites de coupure telles que *Hind*III et *Sse*83871.

Les souches de sérotype III se distribuent en trois groupes : RDP III-1, RDP III-2, et RDP III-3). Les souches invasives isolées néonatales sont principalement dans le groupe RDP III-3 (Takahashi *et al.*, 1998). Le groupe RDP III-3 est caractérisé par la présence de l'intron de groupe II GBSi1.

Parmi les souches du RDP III-2, certaines sont caractérisées par la présence de l'*IS*1548 dans le gène *hylB* (Bohnsack *et al.*, 2002).

7. Analyse du polymorphisme de taille des fragments de restriction de l'ADN

Différentes méthodes associant la restriction à des procédures d'hybridation de l'ADN ou de l'ARNr, permettent la mise en évidence de fragments spécifiques de longueur variable (restriction fragment length polymorfisms ou RFLP).

La ribotypie permet de mettre en évidence deux fragments caractérisant 81 % des souches responsables d'infections néonatales sévères (Chatellier *et al.*, 1996).

8. Macrorestriction de l'AND génomique et électrophorèse en champ pulsé

Basée sur la macrorestriction de l'ADN par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) utilisant des enzymes à un faible nombre de sites de coupure (*Sma*I) (Rolland *et al.*, 1999), reproductible et hautement discriminante (Sader *et al.*, 1995), c'est la méthode de choix pour les études épidémiologiques de *S. agalactiae* (Green *et al.*, 1994 ; Manning, 2003). L'utilisation du PFGE a montré la grande diversité génétique des souches au sein de l'espèce *S. agalactiae*, en particulier dans la division MLEE II (Rolland *et al.*, 1999).

9. Multilocus Sequence Typing (MLST)

Méthode récente, basée sur le séquençage de sept gènes de ménage, permettant d'étudier la structure de la population et la comparaison des résultats à ceux d'une banque de données internationale via internet (http://sagalactiae.mlst.net/).

Cinq séquence types (ST1, ST8, ST17, ST19, et ST23) représentent plus de la moitié des souches isolées chez l'homme. Ces cinq STs sont les STs fondateurs de cinq complexes clonaux, définis par le logiciel eBURST, et désignés complexes clonaux CC1, CC8, CC17, CC19, et CC23. Chaque complexe clonal regroupe les STs différant du ST fondateur par un ou deux des sept allèles composant un ST. Les cinq complexes clonaux CC1, CC8, CC17, CC19, et CC23 (ou clones) regroupent plus de 80 % de la population selon les études (Bergseng *et al.*, 2009 ; Bisharat *et al.*, 2004 ; Bisharat *et al.*, 2005 ; Bohnsack *et al.*, 2008 ; Brochet *et al.*, 2009 ; davies *et al.*, 2004 ; Hery-Arnaud *et al.*, 2005 ; Jones *et al.*, 2003b ; Jones *et al.*, 2006b ; Luan *et al.*, 2005 ; Manning *et al.*, 2009).

Les STs varient en fonction de l'origine clinique des souches (Figure 3).

- Les souches isolées d'infections néonatales sont majoritairement de ST17, et plus rarement ST19, ST1, ou ST23. CC17 est le clone le plus impliqué dans des infections néonatales tardives, alors que CC1 et CC23 sont les clones majeurs dans les infections néonatales précoces (Bergseng *et al.*, 2009 ; Bohnsack *et al.*, 2008).
- Les souches isolées de colonisation maternelle sont majoritairement de ST1, ST19, ou ST23.
- Les souches isolées de colonisation néonatale sont majoritairement de CC23, CC19, ou CC1 respectivement.
- Les souches isolées d'infections chez l'adulte en dehors de la grossesse sont majoritairement de ST19, ST1, ou ST23 et de CC1, CC8, ou CC19 respectivement.

- Les souches isolées de colonisation chez l'adulte en dehors de la grossesse sont majoritairement de ST19, ST1, ou ST17.

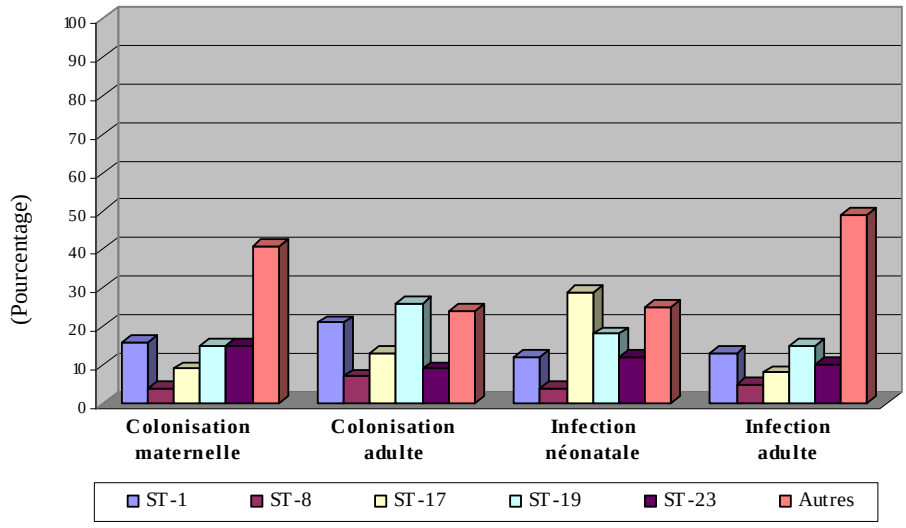


Figure 3. Distribution des principaux STs selon l'origine clinique des souches.

Les cinq principaux STs sont chacun associés à un sérotype majeur : 76 % des souches de ST1 sont de sérotype V, 95 % des souches de ST8 sont de sérotype Ib, 100 % des souches de ST17 sont de sérotype III, 93 % des souches de ST19 sont de sérotype III, et 84 % des souches de ST23 sont de sérotype Ia.

Ainsi, des concordances entre les clones définis par MLST, RDP et MLEE ont été établies : le ST19 correspond au RDP III-2 défini par Bohnsack *et al.*, 2002 le ST17 correspond au RDP III-3 ou ET-1, le ST-23 correspond au RDP III-1, et le ST-7 correspond au RDP III-4. Une concordance a été aussi observée entre les complexes clonaux définis par MLST et les groupes définis par PFGE (Gherardi *et al.*, 2007 ; Martins *et al.*, 2007).

10. Les méthodes basées sur la PCR

Le RAPD (Random amplified polymorphic DNA) est une méthode de typage utilisant de courtes séquences nucléotidiques arbitraires comme amorce afin de discriminer les souches (Welsh et McClelland 1990 ; Williams *et al.*, 1990 ; Zhang *et al.*, 2002), associé à un fort pouvoir discriminant au sein de l'espèce (Chatellier *et al.*, 1997 ; Dabrowska-Szponar et kubielas, 2006).

L’utilisation de la méthode a permis d’identifier trois fragments prophagiques plus prévalent chez les souches à haut risque infectieux pour le nouveau-né (van der Mee-Marquet *et al.*, 2006).

Une méthode rapide appelée multiple-locus variant-repeat assay (MLVA), basée sur la PCR multiplex pour l’amplification de cinq loci identifiés *in silico* sur le génome de *S. agalactiae*, suivie d’une analyse des fragments obtenus par électrophorèse capillaire, a été mise au point récemment pour le typage moléculaire de *S. agalactiae* (Radtke *et al.*, 2010).

Les bactériophages

Découverts par Frederick Twort en 1915 et Félix d'Hérelle, en 1917 (d'Hérelle, 1917 ; Twort, 1915), les bactériophages sont des virus qui infectent uniquement les bactéries. La première observation microscopique des phages a eu lieu en 1940 (Parmelle *et al*., 1948).

La lysogénie a été décrite par J. Bordet en 1921 constatant la production de phages à partir de la bactérie après induction liée à un changement de l'état métabolique de la bactérie.

Dès les années 1920s, les phages ont été utilisés en thérapeutique (Bruynoghe et Maisin, 1921).

Nombreuses études ont depuis établi les liens entre virulence bactérienne et les phages de lysogénie (Brussow *et al.*, 2004). En 1951, Freeman a montré la production de la toxine diphtérique par des souches non virulentes de *Corynebacterium diphtheriae* après infection par le bactériophage *corynephage beta*. Zabriskie a démontré que l'agent qui induit la production de l'exotoxine pyrogène streptococcique (responsable de la scarlatine) par les streptocoques non toxinogènes, est un bactériophage tempéré (Zabriskie, 1964). Un autre exemple est la Shiga-toxine d'*Escherichia coli* (entérohémorragique), dont le pouvoir toxinogène est transférable par un bactériophage (O'Brien *et al.*, 1984). Plus récemment, Waldor et Mekalanos ont démontré que la toxine cholérique est codée par un bactériophage filamenteux, CTX-phi (Waldor et Mekalanos, 1996).

1. Structure et Taxonomie

Les phages présentent un chromosome entouré d'une capside, prolongée parfois par une queue (Figure 4). L'acide nucléique (ARN ou un ADN double ou simple brin) encode pour la production de la plupart des produits nécessaires pour la production du phage.

La nomenclature des phages est basée sur la nature de leur acide nucléique et sur leur morphologie : type de symétrie de la capside, présence ou absence d'une enveloppe, présence ou absence d'une queue. L'organisme responsable de la nomenclature et de la taxonomie des virus, l'International Commitee on Taxonomy of Viruses (ICTV) dénombre 20 familles, regroupées en quatre grands groupes morphologiques : les phages caudés, phages pléiomorphiques, filamenteux, et polyédriques.

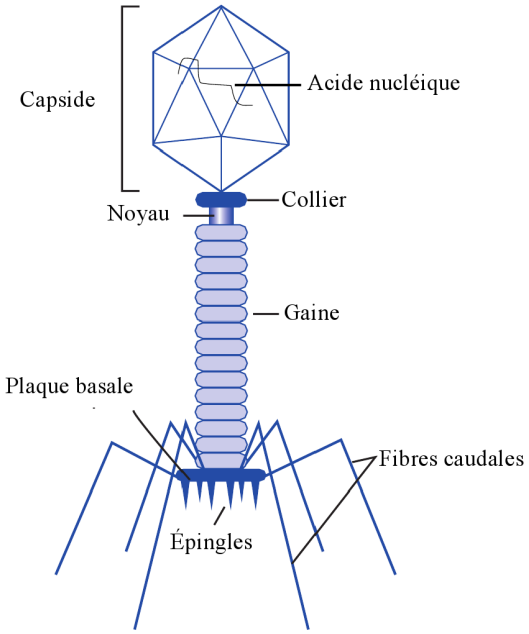


Figure 4. Représentation schématique d'une particule infectieuse d'un phage caudé.

2. Le cycle de vie des phages

Les phages sont des parasites obligatoires, possédant l'information génétique pour leur multiplication mais ne possédant pas la machinerie nécessaire pour la synthèse de protéines ni de système de production d'énergie. Le processus infectieux se déroule en plusieurs étapes programmées, présentés au niveau de la figure 5.

- **La première étape est l'adsorption du phage sur la bactérie** au niveau des molécules de surface spécifiques. Le récepteur phagique est situé au niveau des fibres et de la queue. L'adsorption nécessite un récepteur spécifique présent en quantité importante au niveau de la surface bactérienne. Chez les bactéries à gram positif, ces récepteurs sont associés au N-acétylglucosamine, au rhamnose, aux acides teichoïques ou lipoteichoïques, ou à des protéines de surface (Quiberoni *et al.*, 2000 ; Raisanen *et al.*, 2007 ; Tran *et al.*, 1999 ; Wendlinger *et al.*, 1996).
- **L'injection de l'ADN.** Une fois le phage lié à la bactérie, son génome traverse la queue et est injecté dans la cellule bactérienne après action d'une protéine de la queue possédant une activité enzymatique sur le peptidoglycane (Kenny *et al.*, 2004 ; Moak et Molineux, 2004).

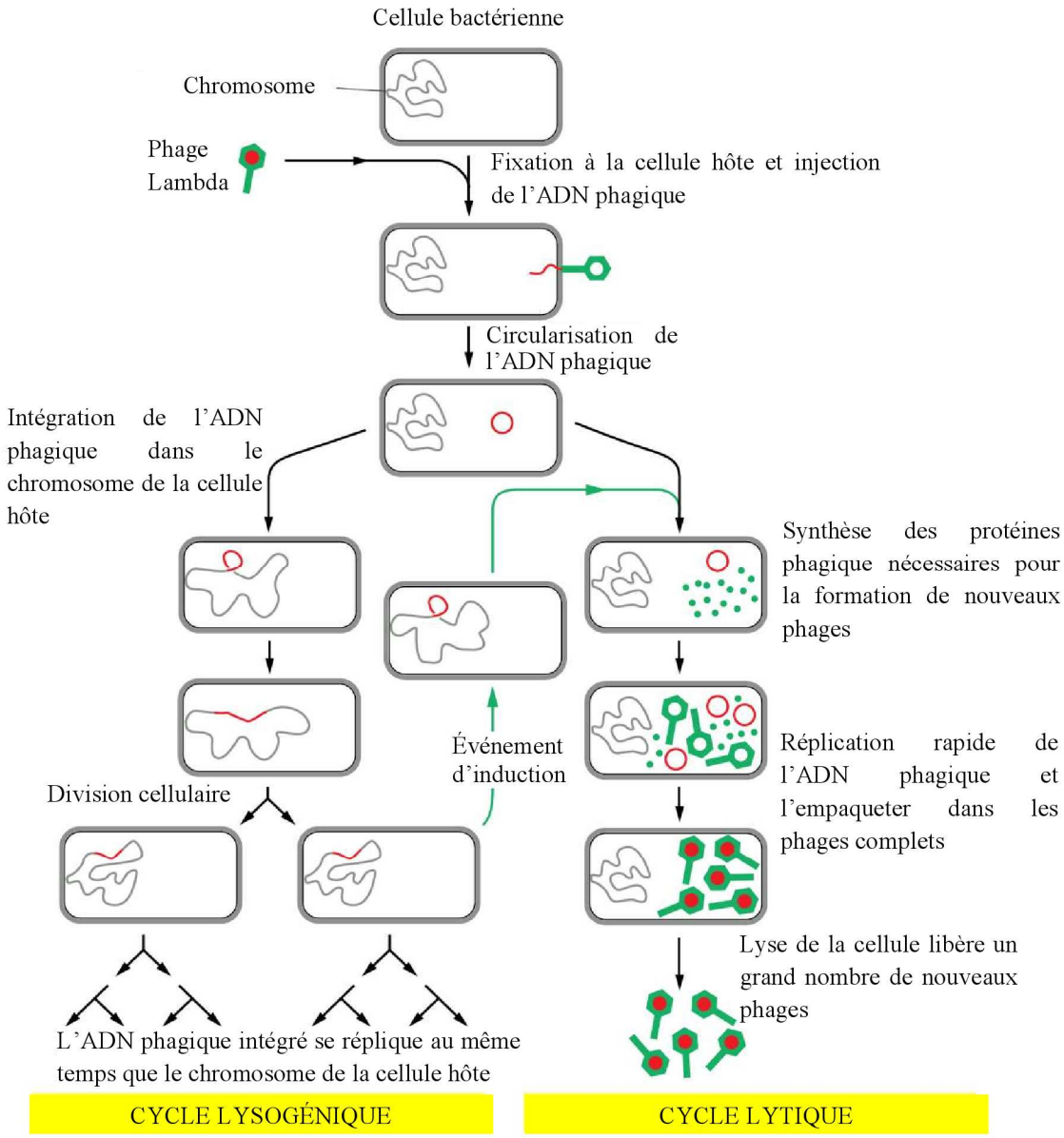


Figure 5. Représentation schématique du cycle du bactériophage Lambda.

L'ADN phagique est alors exposé aux exonucléases bactériennes. L'ADN phagique se circularise grâce à des séquences terminales inversées répétées et l'action d'une ligase bactérienne, et inhibe les enzymes bactériennes. L'injection de l'ADN phagique est très rapide, pouvant atteindre 3000 pb par seconde (Letellier *et al.*, 2004).

- **Cycle lytique et synthèse de nouveaux virions.** L'infection de la cellule conduit à une réorganisation de l'activité métabolique, et la machinerie cellulaire est détournée au seul

profit des synthèses virales. Les mécanismes moléculaires du cycle lytique ont été bien décrits pour le phage lambda d'*E. coli* (Oppenheim *et al.*, 2005). Dans un premier temps, un régulateur lytique, appelé Cro, et des gènes codant les protéines de réplication sont transcrits. Ensuite, les gènes codants les protéines de la morphogénèse et de la lyse sont transcrits. Une fois les protéines de la capside synthétisées, elles sont assemblées, et l'ADN est empaqueté. Les virions néoformés s'accumulent dans le cytoplasme et sont libérés à la suite de la lyse bactérienne, provoquée par le phage. Les phages utilisent un système à deux composants pour la lyse bactérienne : une lysine, enzyme lysant le peptidoglycane, et une holine associée à la formation de pores dans la membrane interne bactérienne.

- **Lysogénie.** Le génome du phage, dit tempéré, est intégré au niveau du génome bactérien (chromosome ou plasmide). Le génome intégré est désigné comme un prophage et la bactérie est dite lysogène.

  La part du développement lytique et de la lysogénie dépend de signaux environnementaux cellulaires et du nombre de phages infectants par cellule.

  La lysogénie est associée à l'absence d'expression des gènes phagiques impliqués dans le cycle productif, et à la protection vis-à-vis de l'infection par un phage homologue. Ces deux caractéristiques sont liées à des répresseurs codés par le génome du phage tempéré bloquant la majorité des fonctions virales en se fixant sur des opérons phagiques, ainsi que les promoteurs lytiques des phages surinfectants (Coddeville, 2006). L'inactivation de ces répresseurs provoque le cycle lytique.

  L'intégration de l'ADN phagique dans le génome bactérien (lysogénisation) se réalise après reconnaissance d'un site d'attachement chromosomique spécifique. La première étape consiste en la circulation de l'ADN bicaténaire par l'intermédiaire de ses séquences terminales inversées répétées, avec l'aide d'une ligase bactérienne (Landy et Ross, 1977). L'intégration du phage requiert une séquence chromosomique bactérienne de 21 pb, appelée *attB*, interagissant avec une séquence homologue du phage, appelé *attP*. L'intégration chromosomique de l'ADN phagique nécessite l'action de plusieurs protéines, l'intégrase Int codée par le phage et l'Integration host factor IHF d'origine bactérienne (Coddeville, 2006).

  Certains phages peuvent s'intégrer dans une région intergénique du chromosome, comme le phage lambda ; d'autres s'intègrent dans une région codante ORF (Open Reading Frame), entrainant une duplication de la séquence avec maintien de l'intégrité du gène sans altération

de son expression, ou une interruption de la transcription du gène avec perte de la fonction du gène (Brussow *et al.,* 2004 ; Canchaya *et al.,* 2004). Des gènes impliqués dans le métabolisme, la recombinaison, la réparation, ou la virulence bactériennes peuvent constituer des sites d'intégration (Campbell, 1992 ; Canchaya *et al.,* 2002 ; Ferretti *et al.,* 2001 ; Mason et Allen, 1975 ; Nakagawa *et al.,* 2003 ; Shimizu-Kadota *et al.,* 2000).

L'excision du génome du phage se fait selon le même mécanisme que celui décrit pour l'intégration, avec l'aide d'une protéine phagique supplémentaire Xis. Le maintien du prophage et du cycle lysogénique est réalisé via un régulateur codé par le phage, appelé CI, dont l'inactivation aboutit à l'expression des gènes lytiques du prophage et le passage au cycle lytique. Différentes molécules peuvent inactiver le régulateur CI et induire le cycle lytique tel que le pyroxide d'hydrogène produit par les phagocytes, la mitomycine C, les β-lactamines et les fluoroquinolones (Comeau *et al.,* 2007 ; Goerke *et al.,* 2006 ; Zhang *et al.,* 2000).

3. La génomique des phages et des prophages

a. Organisation du génome des phages tempérés

Le génome du phage φX174 a été séquencé en 1977 (Sanger *et al.,* 1977). Aujourd'hui, les génomes entiers de plus de 500 phages sont séquencés. Ces génomes varient considérablement en taille de 2435 bp (le phage L5) à 316 674 bp (le phage 201phi2-1).

La génomique comparative des phages tempérés a permis de décrire de nombreux gènes et leur organisation. Le génome phagique est organisé en modules fonctionnels, c'est-à-dire en unités génétiques et fonctionnelles indépendantes (figure 6). Dix modules se distinguent principalement (Brussow et Desiere, 2001 ; Desiere *et al.,* 2002 ; Levesque *et al.,* 2005), regroupant chacun les gènes impliqués dans l'empaquetage de l'ADN, la morphogénèse de la tête, l'assemblage de la tête et de la queue, la morphogénèse de la queue, les fibres caudales, la lyse bactérienne, la conversion lysogénique, la commutation cycle lytique-lysogénique, la réplication de l'acide nucléique, et la régulation de la transcription.

b. Évolution du génome des phages

Si l'ordre des modules sur la carte génomique du phage est relativement conservé, les

différents allèles des modules sont librement assortis, générant une diversité génétique importante des phages (Brussow *et al.*, 2004).

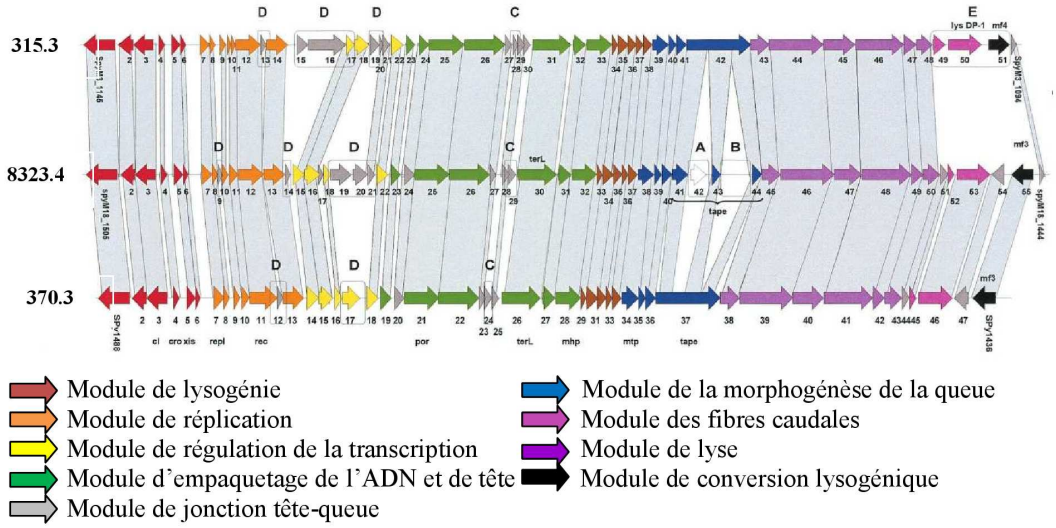


Figure 6. Alignement des prophages rlt-like identifiés chez *S. pyogènes* (Canchaya *et al.*, 2003).
Les modules, comme identifiés par analyse informatique, sont encodés par des couleurs.

Selon la théorie des modules, deux mécanismes génétiques ont été décrits pour l'échange des modules entre les phages.

- **La recombinaison illégitime**, au niveau de sites aléatoires entre les différents phages, mais le plus souvent au niveau des ORFs (Open Reading Frame). Le phage recombinant est souvent non fonctionnel. Seul un petit nombre d'événements de recombinaison aboutissent à des phages viables (Hendrix, 2002 ; Juhala *et al.*, 2000 ; Pedulla *et al.*, 2003).
- **La recombinaison homologue**, soutenue par la présence de séquences de liaison conservées entre les modules des phages (Clark *et al.*, 2001). Les enzymes impliquées dans la recombinaison homologue sont d'origine bactérienne (RecA), ou codées par le phage (Brussow *et al.*, 2004).

D'autres mécanismes d'évolution des phages ont été décrits, comme la délétion de fragments d'ADN, les mutations ou l'acquisition par transduction de « moron genes » (Brussow *et al.*, 2004) qui sont des gènes non impliqués dans le cycle de vie du phage mais qui influencent le « fitness » du phage. Lors de la transduction, les « moron genes » sont acquis par le phage lors de l'excision à partir du génome bactérien (excision imparfaite). La génomique comparative des

phages montre que ces gènes sont localisés près du site d'attachement phagique *attp* et du module de lyse, et présentent un GC % indiquant une origine bactérienne. Les « moron genes » sont transcriptionnellement autonomes et indépendants des gènes impliqués dans la lysogénie et le cycle lytique (Juhala *et al.*, 2000).

c. Évolution du prophage au sein de la bactérie

L'intégration du phage dans le génome bactérien présente deux inconvénients majeurs pour la bactérie. Tout d'abord, le prophage peut à tout moment entrainer la lyse et la mort de la bactérie. De plus, le phage entraine une surcharge métabolique pour la bactérie. A l'inverse, le prophage apporte de nouveaux gènes à la bactérie lui permettant d'augmenter son « fitness » (Brussow *et al.*, 2004).

Intégré dans le génome bactérien, l'avenir à long terme du prophage est le plus souvent éphémère (Brussow *et al.*, 2004). L'analyse *in silico* des génomes bactériens montre un grand nombre de reliquats de prophages non fonctionnels ayant perdu une partie de leur génome.

4. Le rôle des phages dans l'évolution bactérienne

Une part de l'évolution microbienne est associée à des événements de transfert horizontal, avec acquisition de gènes par transduction, transposition, transformation, et lysogénisation.

Les événements de transfert horizontal peuvent apporter de nouvelles fonctions ou modifier des fonctions existantes chez les bactéries réceptrices. Ces événements participent à l'évolution des bactéries par l'acquisition de facteurs de virulence ou d'adaptation écologique (Boyd et Brussow, 2002 ; Boyd *et al.*, 2001 ; Brussow *et al.*, 2004 ; Wagner et Waldor, 2002). Ils participent également à la diversité génétique au sein d'une espèce bactérienne (Canchaya *et al.*, 2004).

Le séquençage de nombreux génomes bactériens a montré la présence de prophages dans leur chromosome. Certaines bactéries en contiennent de multiples, constituant alors une partie importante du total de l'ADN bactérien. Ainsi, *Escherichia coli* O157: H7 contient 18 prophages représentant jusqu'à 16 % de son génome, et *Streptococcus pyogenes* contient quatre à six prophages représentant jusqu'à 12 % de son génome (Canchaya *et al.*, 2003).

Le transfert horizontal de gènes associé aux bactériophages repose principalement sur la

transduction et la conversion lysogénique.

- **La transduction.** Observée avec de nombreux bactériophages (Burke *et al.*, 2001 ; Hodgson, 2000 ; Schicklmaier et Schmieger, 1995), la transduction repose sur l'empaquetage d'une part de l'ADN bactérien avec l'ADN du phage. Lors de l'infection bactérienne par des particules de phagiques, l'ADN bactérien empaqueté peut s'insérer dans le génome bactérien.
- **La conversion lysogène.** Le prophage comporte au niveau de son génome un gène encodant une toxine, un facteur d'invasion tissulaire, un facteur de défense contre la réponse immunitaire de l'hôte, ou un nouveau facteur permettant à la bactérie de s'adapter à une nouvelle niche écologique ou améliorant son « fitness » (Vojtek *et al.*, 2008).

  La lysogénie peut être associée à la perte d'une fonction lorsque le phage s'intègre de façon perturbatrice dans les gènes de l'hôte (phénotype de conversion lysogène négative).

5. Le rôle des phages dans l'émergence de nouveaux clones

La comparaison des souches de *S. pyogenes* de sérotype M3 isolées en 1920, 1940, et 1990 (Banks *et al.*, 2002 ; Beres *et al.*, 2002) suggère que les souches isolées récemment soient issues des souches de 1940 après acquisition de Φ315.4 codant l'exotoxine SpeK et une phospholipase A2 ; les souches de 1940, s'étant développées à partir des souches les plus anciennes avec acquisition de Φ315.2 codant le superantigène SSA.

L'émergence du clone épidémique M1 de *S. pyogenes* dans les années 1980s serait liée à l'acquisition de prophages codant l'exotoxine A (SpeA) et la DNase (SdaD2), suivie d'une recombinaison d'un fragment génomique de 36 kb entrainant l'augmentation de la production de facteurs de virulence (NAD glycohydrolase et streptolysine O) (Sumby *et al.*, 2005).

6. La lysogénie et *S. agalactiae*

La lysogénie joue un rôle important dans la virulence bactérienne et la diversification des streptocoques (Banks *et al.*, 2002 ; Brussow *et al.*, 2004). Chez *S. agalactiae*, la lysogénie a été décrite pour la première fois en 1969 ; des phages tempérés à ADN double brin ont été isolés et caractérisés à partir de souches isolées de lait de vache (Russell *et al.*, 1969).

Le séquençage des souches de *S. agalactiae* a montré l'existence de régions abondantes d'origine prophagique (Tettelin *et al.*, 2005 ; Tettelin *et al.*, 2002). Deux prophages, SA1 et SA2,

ont été retrouvés au niveau du génome de la souche 2603 V/R. Ces prophages présentent des homologies avec les prophages 315,6 de *S. pyogenes* et O1205 de *S. thermophilus* (pour SA1), ou le virulent phage bIL170 de *L. lactis* (pour SA2) (Canchaya *et al.*, 2003).

Trois fragments prophagiques (désignés F5, F7, F10) ont été identifiés à partir du génome de souches responsables d'infections invasives néonatales (van der Mee-Marquet *et al.*, 2006), et sont retrouvées au niveau du génome de souches récentes, suggérant l'importance de leur rôle pour les souches invasives.

En 2009, à partir d'une population de 114 souches de *S. agalactiae* représentative de la diversité au sein de l'espèce, Domelier a isolé et caractérisé 36 phages de lysogénie de la famille des S*IPHOVIRIDAE* (Domelier *et al.*, 2009). La caractérisation moléculaire de ces phages, ainsi que des souches bactériennes lysogènes et lysées a permis d'identifier plusieurs groupes de phages aux caractéristiques lytiques particulières. En particulier, les souches responsables d'infections invasives néonatales ont été associées à des phages tempérés dont le spectre lytique est étendu à l'ensemble des souches *intra-species* (Domelier *et al.*, 2009), suggérant un rôle potentiel dans les compétitions entre populations bactériennes.

Travail personnel

Compte tenu de la place grandissante de *S. agalactiae* comme agent étiologique de pathologies infectieuses de l'adulte, les connaissances concernant la nature des souches impliquées dans ces infections est actuellement parcellaire. Notre premier travail a donc été de caractériser ces souches : leur sérotype capsulaire, leur position phylogénétique, et leur diversité génétique. Pour comparaison, nous avons parallèlement caractérisé des souches colonisant les muqueuses chez des sujets sains et des souches responsables d'infections invasives chez le nouveau-né.

Compte tenu de l'abondance des éléments prophagiques dans le génome des souches séquencées de *S. agalactiae* et de l'importance de la lysogénie chez les souches impliquées dans les infections chez le nouveau-né, notre deuxième travail a consisté à :

- Déterminer la richesse en éléments prophagiques des souches isolées chez l'adulte,
- Induire et caractériser les phages produits par les principaux clones responsables de ces infections adultes.

Ici aussi, pour comparaison, nous avons étudié ces mêmes caractéristiques chez les souches colonisant les muqueuses et celle responsables d'infections néonatales.

Les objectifs de ce travail étaient :

- premièrement, de rechercher d'éventuelles spécificités des souches infectantes chez l'adulte par rapport aux souches colonisant les muqueuses et aux souches d'infections néonatales.
- deuxièmement, de rechercher des arguments suggérant un éventuel lien entre évolution/lysogénie/capacités pathogènes des isolats
- troisièmement, d'isoler et caractériser des phages présumés être impliqués dans l'évolution de l'espèce vers la pathogénicité chez le patient adulte afin de pouvoir sélectionner ceux qui, ultérieurement, pourront faire l'objet d'une étude des modifications cellulaires induites par la lysogénie.

Les travaux présentés de cette thèse ont été réalisés dans le département de Microbiologie Médicale et Moléculaire de la Faculté de Médecine de Tours, au sein de l'équipe de recherche

IFR 136-EA3854 **«** Bactéries et risque materno-fœtal **».**

Matériels et méthodes

1. Les souches

Deux cents soixante et une souches de *S. agalactiae* isolées dans 55 hôpitaux français (et en ville pour les souches de colonisation) entre 2002 et 2007 ont été utilisées dans notre étude.

Ces souches comprenaient constituent 7 populations de souches :

- 24 souches isolées d'infections cutanées chez l'adulte (désignées SKI) : panaris (n=7), mal perforant plantaire (n=7), abcès cutané (n=5), érysipèle (n=3), et cellulite (n=2).
- 34 souches isolées d'infections ostéoarticulaires chez l'adulte (désignées OAI) isolées de liquide articulaire (n=26) et d'échantillons de biopsie d'os (n=8).
- 67 souches isolées de bactériémies (AB) chez l'adulte ne présentant pas d'autre infection
- 8 souches isolées de cultures de liquide céphalo-rachidien chez l'adulte (ACSF) atteint de méningite.
- 20 souches isolées de bactériémies chez le nouveau-né (NB)
- 47 souches isolées de cultures de liquide céphalo-rachidien chez des nouveau-nés (NCSF) atteints de méningite.
- 61 souches isolées de différents sites anatomiques (voie génitale, peau, gorge, ou marge anale) chez des adultes asymptomatiques (HCol).

2. Méthodes

a) Caractérisation des souches de *S. agalactiae*

L'isolement et la mise en culture ont été réalisés sur gélose trypcase-soja additionnée de 5 % de sang de cheval (réf. 43061, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) incubée à 37° C pendant 18 heures. L'identification au niveau de l'espèce a été réalisée par la détection d'antigènes du polysaccharide spécifique de type de *S. agalactiae*, par agglutination utilisant des particules de latex sensibilisées Pastorex^{TM} Strep (réf. 61721, Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) et par identification biochimique par galerie rapide ID 32 Strep (réf. 32600, BioMérieux, Marcy

l'Etoile, France). La conservation des souches a été réalisée en milieu cryo-billes (réf. AEB400100, AES Laboratoire, Combourg, France) à -80°C.

- **Extraction de l'ADN.** La méthode d'extraction utilisant un mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique a été utilisée dans notre étude (annexe 1).
- **Sérotypage.** La détermination des sérotypes a été réalisée par agglutination de particules de latex sensibilisées (Bio-Rad, Hercules, Calif.) et par PCR pour la détermination des sérotypes Ia, Ib, III, IV, V, et VI (annexe 2).
- **Multilocus sequence typing (MLST).** La détermination des Sequence Types (ST) des souches a été réalisée selon la méthode décrite par Jones *et al*., (Jones *et al*., 2003b) (annexe 3).

  Les STs obtenus ont été regroupés en complexes clonaux (CC) avec le logiciel eBURST v3 disponible en ligne (http://eburst.mlst.net/). Un arbre phylogénétique a été construit à partir des données des profils alléliques avec phylodendron utilisant la méthode Neighbor-Joining (http://pubmlst.org/). Un neighbor-net algorithm a été également appliqué sur les séquences concaténées des 7 gènes étudiés utilisant le logiciel SplitsTree4 V4.11.3 (Huson et Bryant, 2006) disponible en ligne (http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/software/splitstree4/download/welcome.html).
- **Profil de macrorestriction de l'ADN (PFGE).** Les profils de macrorestriction de l'ADN ont été obtenus avec l'enzyme de restriction *Sma*I selon le protocole présenté en annexe 4. Les profils de restriction ont été analysés à l'aide de Taxotron package (Taxolab ; Institut Pasteur, Paris, France). L'indice numérique de discrimination (D) de PFGE a été évalué utilisant la formule de Hunter-Gaston (Hunter et Gaston, 1988).
- **Détermination du continu en prophages des souches de *S. agalactiae.*** Le continu en prophages a été déterminé par une méthode amplification PCR de 18 fragments d'ADN prophagique identifiés récemment chez *S. agalactiae* (Domelier *et al.*, 2009 ; van der Mee-Marquet *et al.*, 2006) (annexe 5).

b) Caractérisation des phages

- **Isolement, sélection, propagation des phages.** L'induction des phages a été réalisée par la mitomycine C selon la méthode de Stringer (annexe 6) à partir des 58 souches isolées

d'infections cutanées et ostéoarticulaires. Chaque phage obtenu a été multiplié sur sa souche de propagation par la méthode de gélose semi-molle.

- **Détermination du spectre lytique.** La lysotypie a été effectué avec les 7 phages isolés, selon la procédure décrite en annexe 7.
- **Microscopie électronique** (annexe 8). La préparation des particules phagiques a été réalisée selon les recommandations de l'ICTV (Ref). Les suspensions de phages ont été centrifugées sur gradient de sucrose à 20 %. Les particules phagiques ont été marquées avec 2 % d'acétate d'uranyle et examinées avec un microscope à transmission électronique JEOL 1230 sous un voltage accélérant de 120 kV.
- **Extraction de l'ADN phagique.** L'extraction de l'ADN phagique (annexe 9) a été réalisée à l'aide du kit Lambda Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant, à partir d'une suspension phagique titrée à 10^9/mL.
- **Restriction enzymatique de l'ADN phagique.** L'ADN phagique a été restreint en utilisant les trois enzymes de restriction *Eco*RI, *Hind*III, et *Cla*I (Roche Diagnostic, Meylan, France) (annexe 10).
- **Etude de la diversité génétique des phages par Amplification PCR de 18 fragments d'ADN prophagique.** L'amplification PCR de 18 fragments d'ADN prophagique identifiés chez *S. agalactiae* a été réalisée sur l'ADN phagique extrait. Les conditions de PCR sont présentées au niveau de l'annexe 11.

c) Analyse statistique

Les comparaisons des populations ont été faites en utilisant le test du Chi2 avec les logiciels STATITCF et SYSTAT (DeltaSoft, France).

Première partie

Etude des souches de *S. agalactiae* isolées d'infections invasives chez l'adulte

Les caractéristiques des 7 populations de souches (souches responsables de méningites et de bactériémies néonatales, souches colonisantes et souches responsables d'infections bactériémiques, méningées, cutanées et ostéo-articulaires chez l'adulte) ont été comparées afin de préciser les particularités éventuelles des souches invasives chez l'adulte.

1. Sérotype des souches

La distribution des souches en fonction du sérotype a été différente en fonction des populations ($P < 0,001$) (tableau 6) : les souches néonatales ont été significativement associées au sérotype III (79 %), alors que les souches isolées des cas d'infections chez l'adulte se sont distribuées dans les quatre principaux sérotypes V (33 %), Ia (26 %), III (20 %), et Ib (14 %). La distribution des souches de colonisation a été équilibrée dans les différents sérotypes.

Tableau 6. Sérotypes des souches des 7 populations de souches

Sérotype	No. de souches (%) de *S. agalactiae* isolées de						
	Infection chez l'adulte				Infection chez le nouveau-né		Colonisation
	cutanée	ostéoarticulaire	bactériémie	méningite	bactériémie	méningite	chez l'adulte
Ia	9 (38)	8 (24)	15 (22)	2 (25)	4 (20)	4 (9)	11 (18)
Ib	2 (8)	2 (6)	12 (18)	2 (25)		3 (6)	11 (18)
II	1 (4)		4 (6)				3 (5)
III	3 (13)	10 (29)	12 (18)	2 (25)	15 (75)	38 (81)	13 (21)
IV	1 (4)	1 (3)	2 (3)				4 (7)
V	8 (33)	13 (38)	21 (31)	2 (25)	1 (5)	2 (4)	12 (20)
NT			1 (1)				7 (11)

Les souches des infections invasives de l'adulte diffèrent par le sérotype des souches des infections néonatales. Pour les souches des infections invasives de l'adulte, les sérotypes majeurs sont les sérotypes V et Ia.

2. Caractérisation des souches par MLST

Quarante-quatre STs ont été obtenus après étude des 261 souches testées (tableau 7). À l'aide du logiciel eBURST, 252 souches appartenant à 39 STs ont été regroupées en 7 complexes clonaux (CC) : CC1, CC7, CC8, CC17, CC19, CC23, et CC388. L'analyse neighbor-net des 52 sites informatifs en parcimonie (PI) retenus sur les 3456 nucléotides du supergène, a été réalisée par le logiciel SplitsTree4 (figure 7).

La diversité des souches a différé en fonction des populations de souches étudiées. La diversité a été la plus élevée pour les souches de colonisation (23 STs pour les 61 souches), et inférieure pour les souches isolées d'infections cutanées (10 STs pour 24 souches) et les souches isolées d'infections ostéoarticulaires (14 STs pour 34 souches). Les souches isolées d'infections néonatales invasives ont été les moins diverses (11 STs pour 67 souches).

La distribution des souches responsables d'infections invasives au sein des principaux complexes clonaux a différé en fonction de leur origine ($P < 0,001$). Les souches isolées d'infections néonatales invasives ont été significativement associées au ST17 (44/67, 66 % versus 5/75, 7 % pour les souches isolées de l'adulte) ; à l'opposé, les souches isolées de l'adulte ont été associées au ST1 (19/75; 25 % versus 3/67, 4 % pour les souches néonatales et 15 % pour les souches de colonisation) et au ST23 (14/75; 19 % versus 8/67, 12 % pour les souches néonatales et 5/61, 8 % pour les souches de colonisation).

Les souches responsables d'infections invasives de l'adulte appartiennent à des clones distincts de celui associé aux infections invasives néonatales. Les souches responsables d'infections invasives de l'adulte appartiennent aux clones ST1 et ST23.

3. Macrorestriction de l'ADN et PFGE

Cent quatre-vingt trois profils électrophorétiques ont été obtenus avec les 259 souches étudiées. Deux souches n'ont pas été restreintes par l'enzyme *Sma*I. La diversité a varié en fonction des populations de souches (tableau 8). La diversité des souches a été la plus faible chez l'adulte pour les souches isolées d'infections ostéo-articulaires et de bactériémies, et chez le nouveau-né, pour les souches isolées de méningites. La macrorestriction n'a pas permis de distinguer de profils associés à des souches particulières.

Tableau 7. Distribution des souches en fonction du ST pour les différentes populations.

Complexe clonal (No. de souches)	ST	No. (%) des souches isolées de						
		SKI	OAI	AB	ACSF	NB	NCSF	HCol
CC1 (68)		8 (33)	14 (41)	23 (34)	2 (25)	1 (5)	2 (4)	18 (29)
	1 (49)	7 (29)	11 (32)	18 (27)	1 (13)	1 (5)	2 (4)	9 (15)
	2 (8)		2 (6)		1 (13)			5 (8)
	153 (1)			1 (1)				
	173 (1)			1 (1)				
	196 (7)	1 (4)	1 (3)	2 (3)				3 (5)
	370 (1)							1 (2)
	383 (1)			1 (1)				
CC7 (10)		1 (4)	1 (3)	3 (4)			2 (4)	3 (5)
	6 (2)		1 (3)				1 (2)	
	7 (3)			1 (1)			1 (2)	1 (2)
	41 (3)	1 (4)						2 (3)
	51 (1)			1 (1)				
	255 (1)			1 (1)				
CC8 (36)		2 (8)	2 (6)	14 (21)	2 (25)		2 (4)	14 (23)
	8 (17)	2 (8)		6 (9)			2 (4)	7 (11)
	10 (10)		1 (3)	4 (6)	1 (13)			4 (7)
	12 (7)			4 (6)	1 (13)			2 (3)
	381 (1)		1 (3)					
	390 (1)							1 (2)
CC17 (58)			1 (3)	5 (7)	1 (13)	13 (65)	32 (68)	6 (10)
	17 (55)		1 (3)	4 (6)	1 (13)	12 (60)	32 (68)	5 (8)
	291 (1)							1 (2)
	384 (1)			1 (1)				
	482 (1)					1 (5)		
CC19 (23)		2 (8)	4 (12)	7 (10)	1 (13)		4 (9)	5 (8)
	19 (18)	1 (4)	4 (12)	5 (7)	1 (13)		4 (9)	3 (5)
	28 (2)	1 (4)						1 (2)
	382 (1)			1 (1)				
	386 (1)			1 (1)				
	389 (1)							1 (2)
CC23 (54)		11 (46)	7 (21)	13 (19)	2 (25)	5 (25)	4 (9)	12 (20)
	23 (40)	7 (29)	6 (18)	12 (18)	2 (25)	4 (20)	4 (9)	5 (8)
	88 (2)	2 (8)						
	144 (2)	1 (4)						1 (4)
	220 (2)							2 (3)
	223 (2)							2 (3)
	280 (1)		1 (3)					
	305 (1)							1 (2)
	380 (1)	1 (4)						
	385 (1)			1 (1)				
	391 (1)							1 (2)
	481 (1)					1 (5)		
CC388 (3)			1 (3)					2 (3)
	26 (1)		1 (3)					
	388 (2)							2 (3)
Singletons (9)			4 (12)	2 (3)		1 (5)	1 (2)	1 (2)
	4 (2)		1 (3)	1 (1)				
	22 (2)			1 (1)		1 (5)		
	24 (1)						1 (2)	
	130 (2)		1 (3)					1 (2)
	283 (2)		2 (6)					
Total (261)		24	34	67	8	20	47	61

SKI, infections cutanées ; OAI, infections ostéoarticulaires ; AB, bactériémie chez l'adulte ; ACSF, culture de liquide céphalo-rachidien chez l'adulte ; NB, bactériémie néonatale ; NCSF, culture de liquide céphalo-rachidien chez le nouveau-né ; HCol, colonisation asymptomatique chez l'adulte.

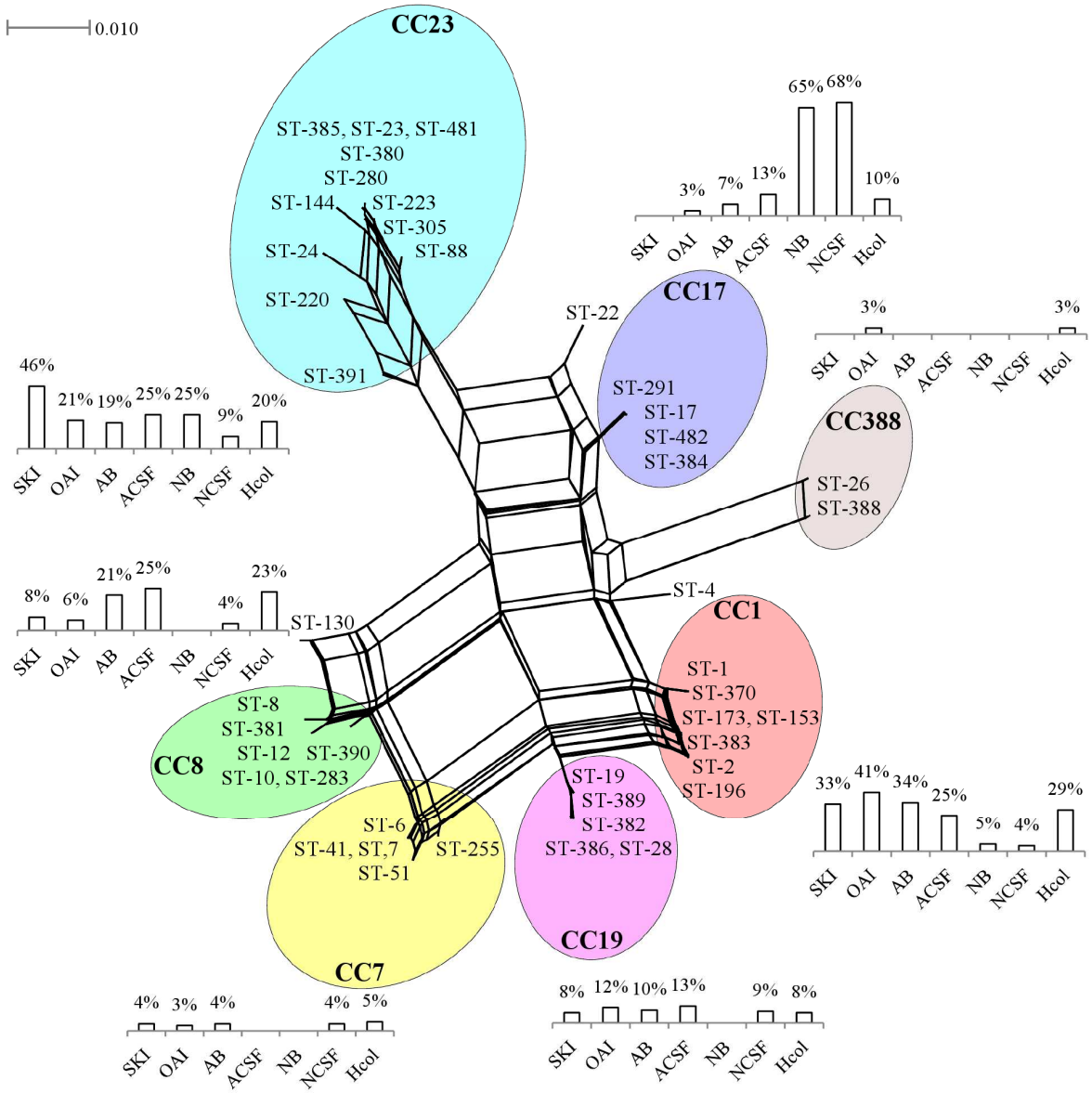


Figure 7. Distribution des souches isolées des différentes pathologies chez l'adulte et le nouveau-né dans les différents complexes clonaux qui constituent l'espèce *S. agalactiae*.
SKI, infections cutanées ; OAI, infections ostéoarticulaires ; AB, bactériémie chez l'adulte ; ACSF, culture de liquide céphalo-rachidien chez l'adulte ; NB, bactériémie néonatale ; NCSF, culture de liquide céphalo-rachidien chez le nouveau-né ; HCol, colonisation asymptomatique chez l'adulte.

La diversité génétique basée sur le PFGE a été étudiée au sein des complexes clonaux associés aux souches responsables d'infections invasives, chez le nouveau-né (CC17) et chez l'adulte (CC1 et CC23).

Tableau 8. Diversité des profils PFGE en fonction des populations de souches et des CCs.

CC	Infection chez l'adulte				Infection chez le nouveau-né		Colonisation	ID
	cutanée	ostéoarticulaire	bactériémie	méningite	bactériémie	méningite	chez l'adulte	(Total)
1	0,86	0,86	0,84	0,0	nc	0,0	0.84	0.83
17	nc	nc	0,90	nc	0.92	0.80	0.87	0.91
23	0.89	0.81	0.77	0	0,90	0.50	0.77	0.83

*nc non calculable

Les 54 souches de CC23 ont été typables en PFGE ; 36 profils ont été obtenus (ID = 0.83) (figure 8). La diversité a été faible pour les souches des méningites néonatales (ID = 0,50), et légèrement supérieure pour les souches isolées de bactériémies chez l'adulte (ID = 0,77), d'infections ostéo-articulaires (ID = 0.81), et de colonisation (ID = 0,77). Les souches isolées d'infections cutanées ont présenté la diversité génétique la plus élevée (ID = 0.89).

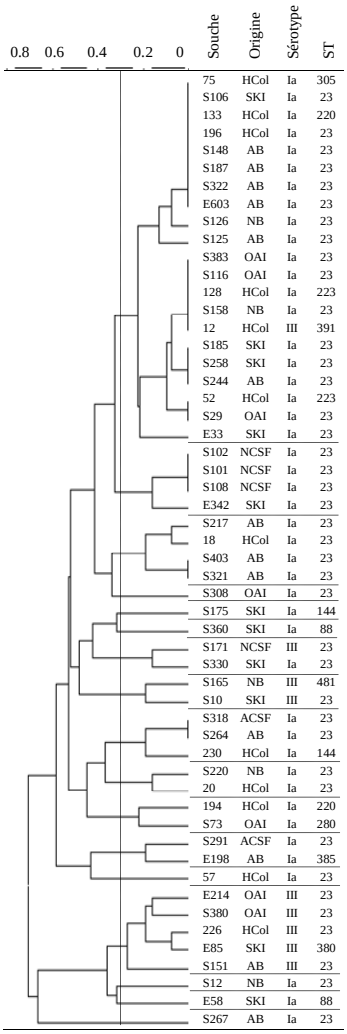
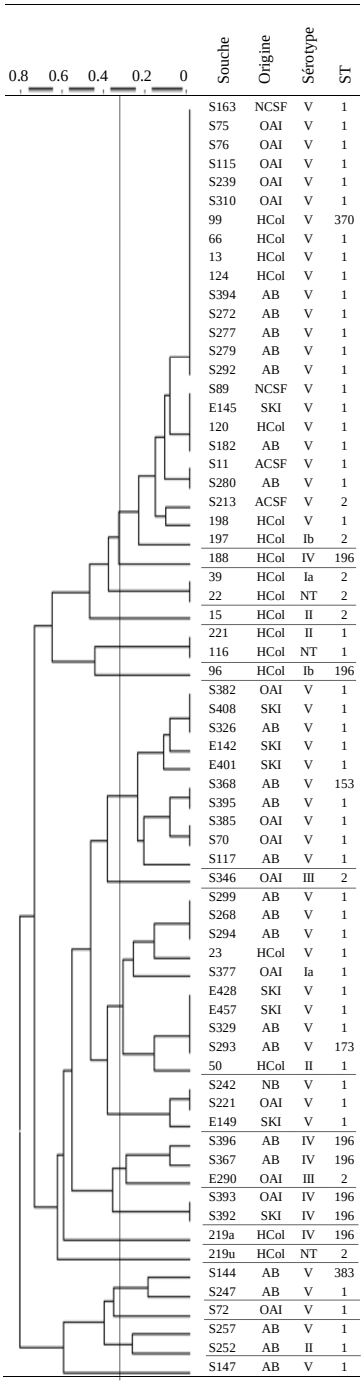


Figure 8. La diversité génétique des souches de CC23 obtenue à partir des profils de restriction des ADN bactériens par *Sma*I. Le lien et la diversité génétique entre les souches ont été déterminés par UPGMA

Les 68 souches de CC1 ont été typables en PFGE ; 37 profils ont été obtenus (ID = 0.83). L'ID n'a pas varié (de 0.84 à 0.86) en fonction des 7 populations de souches (figure 9)



Souche	Origine	Sérotype	ST
S163	NCSF	V	1
S75	OAI	V	1
S76	OAI	V	1
S115	OAI	V	1
S239	OAI	V	1
S310	OAI	V	1
99	HCol	V	370
66	HCol	V	1
13	HCol	V	1
124	HCol	V	1
S394	AB	V	1
S272	AB	V	1
S277	AB	V	1
S279	AB	V	1
S292	AB	V	1
S89	NCSF	V	1
E145	SKI	V	1
120	HCol	V	1
S182	AB	V	1
S11	ACSF	V	1
S280	AB	V	1
S213	ACSF	V	2
198	HCol	V	1
197	HCol	Ib	2
188	HCol	IV	196
39	HCol	Ia	2
22	HCol	NT	2
15	HCol	II	2
221	HCol	II	1
116	HCol	NT	1
96	HCol	Ib	196
S382	OAI	V	1
S408	SKI	V	1
S326	AB	V	1
E142	SKI	V	1
E401	SKI	V	1
S368	AB	V	153
S395	AB	V	1
S385	OAI	V	1
S70	OAI	V	1
S117	AB	V	1
S346	OAI	III	2
S299	AB	V	1
S268	AB	V	1
S294	AB	V	1
23	HCol	V	1
S377	OAI	Ia	1
E428	SKI	V	1
E457	SKI	V	1
S329	AB	V	1
S293	AB	V	173
50	HCol	II	1
S242	NB	V	1
S221	OAI	V	1
E149	SKI	V	1
S396	AB	IV	196
S367	AB	IV	196
E290	OAI	III	2
S393	OAI	IV	196
S392	SKI	IV	196
219a	HCol	IV	196
219u	HCol	NT	2
S144	AB	V	383
S247	AB	V	1
S72	OAI	V	1
S257	AB	V	1
S252	AB	II	1
S147	AB	V	1

Figure 9. La diversité génétique des souches de CC1 obtenue à partir des profils de restriction des ADN bactériens par *Sma*I. Le lien et la diversité génétique entre les souches ont été déterminés par UPGMA

Les 58 souches de CC17 ont été typables en PFGE ; 47 profils ont été obtenus (ID = 0,91)

(figure 10). Les souches isolées de méningites néonatales ont été les plus homogènes (ID = 0,80). La diversité génétique a été légèrement supérieure pour les souches isolées de bactériémies chez l'adulte (ID = 0,90), de bactériémies néonatales (ID = 92), et de colonisation (ID = 0,87).

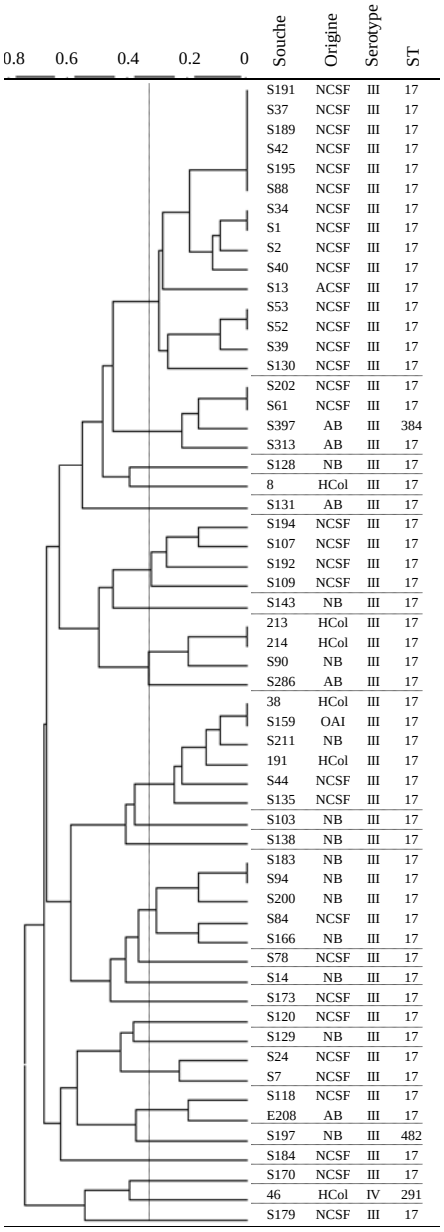


Figure 10. La diversité génétique des souches de CC23 obtenue à partir des profils de restriction des ADN bactériens par *Sma*I. Le lien et la diversité génétique entre les souches ont été déterminés par UPGMA

Le couplage des résultats de la macrorestriction de l'ADN (PFGE) à ceux du MLST apporte des informations complémentaires. Alors que le MLST montre une diversité génétique limitée des souches invasives (CC17 pour les souches néonatales, CC1 et CC23 pour les

souches de l'adulte), le PFGE permet d'identifier au sein de chacun de ces complexes clonaux, des sous-groupes de souches associées à des infections invasives particulières et se distinguant des souches colonisantes appartenant à ces mêmes complexes clonaux. En particulier, au sein du CC23, le PFGE permet à identifier des clones associés aux bactériémies de l'adulte et aux méningites néonatales.

4. Analyse du contenu prophagique des souches invasives

La recherche par PCR de 10 fragments prophagiques décrits récemment (Domelier *et al.*, 2009), a été réalisé pour l'ensemble des souches des 7 populations afin d'évaluer leur contenu prophagique. La diversité génétique basée sur le contenu prophagique des souches a été étudiée pour les complexes clonaux associés aux souches invasives.

Tableau 9. Diversité du contenu prophagique en fonction des populations de souches et des CCs.

CC	Infection chez l'adulte				Infection chez le nouveau-né		Colonisation	ID
	cutanée	ostéoarticulaire	bactériémie	méningite	bactériémie	méningite	chez l'adulte	(Total)
1	0,61	0,59	0,38	1	nc	1	0.85	0.66
17	nc	nc	0,90	nc	0.92	0.92	0.80	0.92
23	0.93	0.95	0.94	1	1	0.50	0.91	0.94

*nc non calculable

Les 68 souches de CC1 (100 %) ont amplifié au moins un fragment prophagique. L'analyse Jaccard a généré un dendrogramme de similarité du contenu prophagique des souches (figure 11). La diversité génétique au sein du CC1 a été globalement faible (ID = 0,66). Néanmoins la diversité a varié en fonction des populations de souches, et a été faible pour les souches isolées d'infections cutanées (ID = 0.61), d'infections ostéoarticulaires (ID = 0.59) et de bactériémies chez l'adulte (ID = 0,38) ; à l'opposé, les souches isolées de colonisation ont présenté une diversité génétique plus élevée (ID = 0.85), ainsi que les souches isolées de méningite chez l'adulte ou chez le nouveau-né (ID = 1).

Aucun des fragments d'ADN prophagique n'a été détecté par PCR chez 2 des 58 souches de CC17. Pour les 56 souches restantes, 1 à 6 fragments ont été amplifiés par PCR. La diversité génétique au sein du CC17 a été élevée globalement (ID=0,92) (figure 12), et pour les

populations de souches concernées avec un ID de 0,80 pour les souches colonisantes, un ID de 0,90 pour les souches de bactériémies chez l'adulte, et de 0,92 pour les souches néonatales.

Aucun des 10 fragments d'ADN prophagique n'a été détecté par PCR chez une des 54 souches de CC23. Pour les 53 souches restantes, 1 à 5 fragments ont été amplifiés par PCR. La diversité génétique au sein du CC23 a été élevée globalement (ID=0,94) (figure 13). Néanmoins la diversité a varié en fonction des populations de souches, et a été faible pour les souches des méningites néonatales (ID = 0,50) ; à l'opposé, la diversité a été plus élevée pour les autres populations de souches (ID variant de 0,91 à 1).

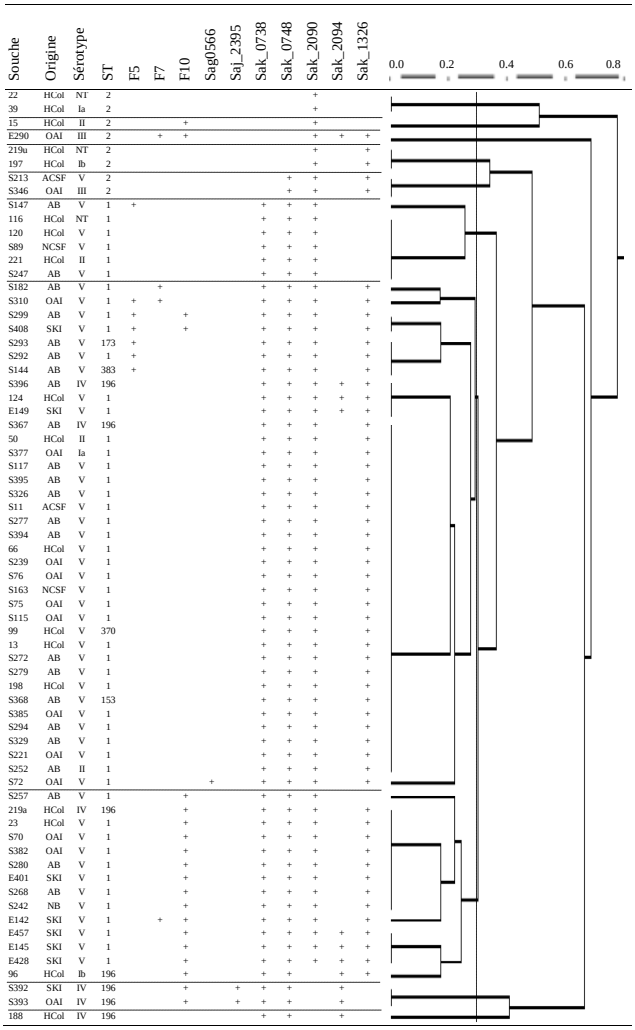


Figure 11. Contenu prophagique des souches de CC1 de *S. agalactiae* isolées de l'adulte et du nouveau-né. Le niveau de similarité entre les regions dADN prophagique étudiées a été établi à l'aide du logiciel SYSTAT utilisant le coéficient de Jacard.

Origine des souches : SKI, infections cutanées ; OAI, infections ostéoarticulaires ; AB, bactériémie chez l'adulte ; ACSF, culture de liquide céphalo-rachidien chez l'adulte ; NB, bactériémie néonatale ; NCSF, culture de liquide céphalo-rachidien chez le nouveau-né ; HCol, colonisation asymptomatique chez l'adulte.

L'analyse du contenu prophagique indique que la plupart des souches présentent des fragments d'ADN prophagique dans leur génome.

Les souches colonisantes sont les plus diverses du point de vue de leur contenu prophagique et sont les souches qui présentent des fragments prophagiques en nombre inférieur lorsqu'on les compare aux souches invasives.

L'analyse distingue les souches en fonction de leur CC. Au sein du CC1, le contenu prophagique des souches est relativement homogène, alors qu'il est très divers dans les CC17 et CC23.

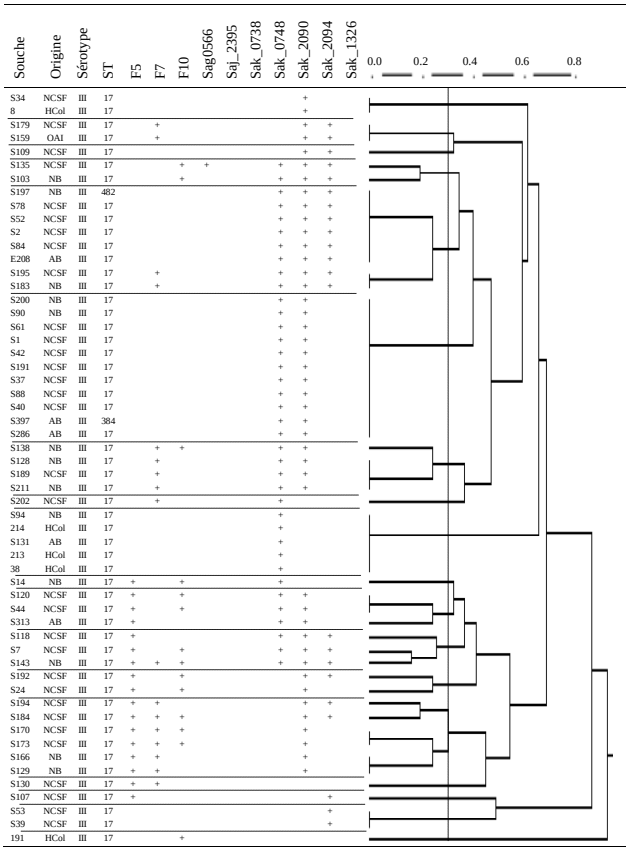


Figure 12. Contenu prophagique des souches de CC17 de *S. agalactiae* isolées de l'adulte et du nouveau-né. Le niveau de similarité entre les regions dADN prophagique étudiées a été établi à l'aide du logiciel SYSTAT utilisant le coéficient de Jacard.
Origine des souches : SKI, infections cutanées ; OAI, infections ostéoarticulaires ; AB, bactériémie chez l'adulte ; ACSF, culture de liquide céphalo-rachidien chez l'adulte ; NB, bactériémie néonatale ; NCSF, culture de liquide céphalo-rachidien chez le nouveau-né ; HCol, colonisation asymptomatique chez l'adulte.

Quatre groupes de souches ont montré une homogénéité de leur contenu prophagique : au sein du CC1, les souches des infections cutanées, des infections ostéo-articulaires et des bactériémies de l'adulte, et au sein du CC23, les souches des méningites néonatales.

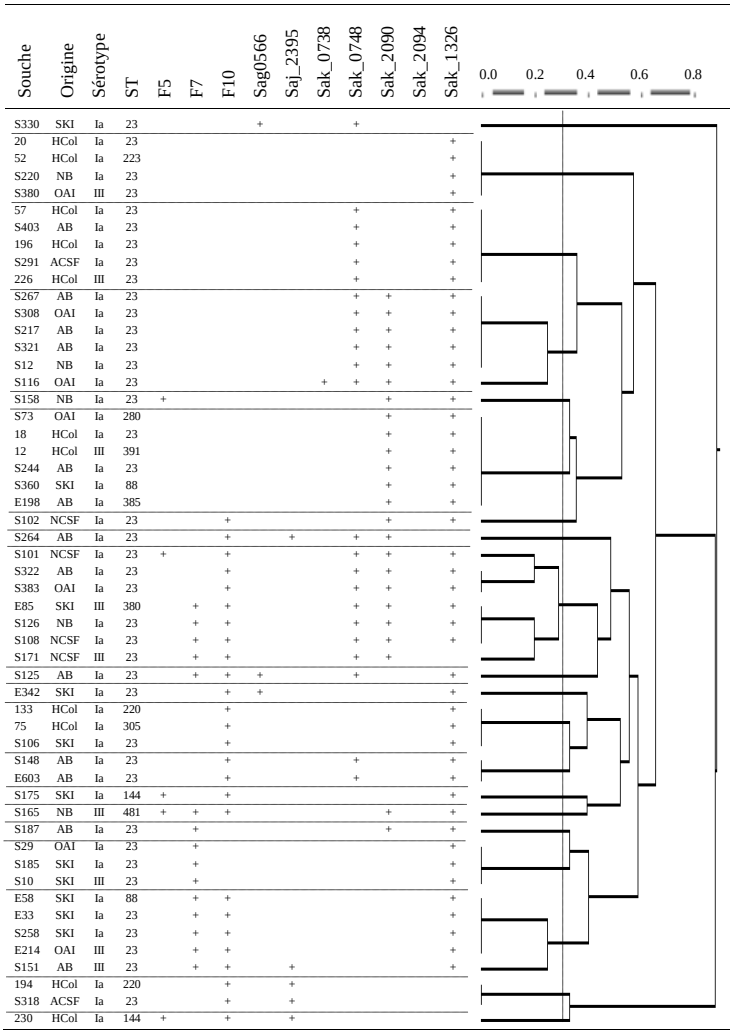


Figure 13. Contenu prophagique des souches de CC23 de *S. agalactiae* isolées de l'adulte et du nouveau-né. Le niveau de similarité entre les regions dADN prophagique étudiées a été établi à l'aide du logiciel SYSTAT utilisant le coéficient de Jacard.

Origine des souches : SKI, infections cutanées ; OAI, infections ostéoarticulaires ; AB, bactériémie chez l'adulte ; ACSF, culture de liquide céphalo-rachidien chez l'adulte ; NB, bactériémie néonatale ; NCSF, culture de liquide céphalo-rachidien chez le nouveau-né ; HCol, colonisation asymptomatique chez l'adulte.

AU TOTAL,

Nos données confirment tout d'abord la prédominance des sérotypes V et Ia dans les infections à *S. agalactiae* chez l'adulte (Blumberg *et al.,* 1996 ; Farley, 2001 ; Harrison *et al.,* 1998 ; Sendi *et al.,* 2008 ; Tyrrell *et al.,* 2000).

Notre étude apporte des données nouvelles de caractérisation moléculaire des souches responsables des infections invasives chez l'adulte.

Alors que le clone ST17 est associé aux infections invasives néonatales (Bisharat *et al.,*

2005 ; Jones *et al.,* 2003b ; Jones *et al.,* 2006b ; Lin *et al.,* 2006 ; Luan *et al.,* 2005), nous montrons que les souches invasives chez l'adulte appartiennent à deux clones particuliers, CC1 et CC23.

Les deux clones CC1 et CC23 sont phylogénétiquement éloignés (Bohnsack *et al.,* 2008 ; Héry-Arnaud *et al.,* 2005 ; Héry-Arnaud *et al.,* 2007 ; Jones *et al.,* 2003b ; Luan *et al.,* 2005 ; Manning *et al.,* 2009 ; Sun *et al.,* 2005). Aussi, il est vraisemblable que ces clones aient acquis leur virulence par des phénomènes génétiques différents, en particulier des mutations comme observées pour les gènes de ménage, et/ou des événements de transfert horizontal de gènes.

Le clone CC23 comporte des souches anciennes d'origine bovine isolées depuis les années 1960s et des souches humaines isolées récemment (Brochet *et al.,* 2006 ; Héry-Arnaud *et al.,* 2007). L'ancienneté du clone et la diversité de ses niches écologiques suggèrent une exposition du clone à des contraintes nutritives et environnementales diverses au cours de son évolution ; ceci pouvant être à l'origine de la diversité génétique remarquable observée en PFGE et par l'étude du contenu prophagique, et confirmant les données de la littérature (Corrêa 2009 ; Oliveira *et al.,* 2005 ; Skjaervold *et al.,* 2004).

A l'opposé, le clone CC1 comporte des souches isolées chez l'homme depuis les années 1990s (Bohnsack *et al.,* 2008 ; Harrison *et al.,* 1995b ; Manning*et al.,* 2009). L'émergence récente de ce clone pourrait en partie expliquer l'homogénéité constatée en terme de contenu en prophages.

L'étude du contenu prophagique apporte des données nouvelles. L'analyse du contenu en prophages montre que les souches invasives isolées chez l'adulte, tout comme celles isolées chez le nouveau-né, sont particulièrement exposées à des événements de lysogénie, lorsqu'on les compare aux souches colonisantes. Ces résultats confirment l'abondance des prophages chez les souches invasives de *S. agalactiae*, tel que cela avait été démontré pour les souches isolées des infections invasives néonatales (Domelier *et al.,* 2009).

Deuxièmement, nous montrons que des souches de CC distincts peuvent présenter un contenu prophagique semblable, suggérant que les souches aient été soumises à la lysogénisation par les mêmes phages.

Troisièmement, nous montrons que les souches du CC1 présentent un contenu

prophagique très homogène, suggérant l'importance de la lysogénie dans la spécialisation de ces souches particulièrement aptes à infecter la peau, les os, et les articulations chez l'adulte, comme cela a été démontré pour d'autres steptocoques (Banks *et al.*, 2002 ; Brussow *et al.* 2004).

Les souches invasives de *S. agalactiae* se distribuent donc actuellement dans trois complexes clonaux. Le CC23, génétiquement hétérogène, et dont les souches sont caractérisées par des contenus prophagiques fréquents et divers, et les complexes CC17 et CC1, génétiquement éloignés mais présentant tous deux une homogénéité génétique remarquable. En effet, le CC1, comme le complexe clonal CC17 qui comporte les souches invasives pour le nouveau-né (Bisharat *et al.*, 2005 ; Jones *et al.*, 2003b ; Jones *et al.*, 2006b ; Lin *et al.*, 2006 ; Luan *et al.*, 2005), présente un nombre limité de STs suggérant une exposition limitée des gènes de ménage aux mutations ou recombinaisons (Manning *et al.*, 2009). De plus, et tel que pour les souches de CC17, notre analyse PFGE a montré une diversité importante des souches en PFGE au sein du clone CC1 avec l'existence de sous-clones dont un nombre limité regroupe la majorité des souches responsables d'infections invasives.

Enfin, nous montrons des caractéristiques moléculaires semblables pour les souches isolées des infections cutanées, des infections ostéo-articulaires, et des bactériémies chez l'adulte. Ces données suggèrent que la peau et les tissus mous puissent être une porte d'entrée possible pour la bactériémie et pour les infections de l'os et des articulations, comme précédemment rapporté (Farley, 2001).

Nous montrons enfin l'apport du PFGE pour distinguer des souches appartenant à un même complexe clonal. La diversité génétique au sein des principaux complexes clonaux identifiés en MLST résultant vraisemblablement d'évènements génétiques en dehors des gènes de ménage. Ces résultats confirment le fort pouvoir discriminant et l'intérêt du PFGE pour le typage des souches de même sérotype (Rolland *et al.*, 1999 ; Moyo *et al.*, 2002) ou au sein des principaux clones identifiés par MLST (van der Mee-Marquet *et al.*, 2006).

Ce travail a fait l'objectif d'une publication dans le Journal of Clinical Microbiology intitulé « Molecular characterization and prophage DNA contents of Streptococcus agalactiae

strains isolated from adult skin and osteoarticular infections ». Salloum M., van der Mee-Marquet N., Domelier AS., Arnault L., and Quentin R. 2010. J. Clin. Microbiol. 48 :1261-69.

Deuxième partie

Isolement de 7 bactériophages à partir de souches isolées d'infections cutanées et ostéoarticulaires chez l'adulte

A partir des 58 souches de *S. agalactiae* isolées d'infections invasives cutanées et ostéo-articulaires chez l'adulte, par traitement à la mitomycine C et selon la méthodologie décrite plus haut, 7 suspensions phagiques (12 %) ont été obtenues.

Trois phages ont été obtenus à partir de souches de CC1 et 4 à partir de souches de CC23, parmi lesquelles 5 souches associées à des infections cutanées et 2 à des infections ostéoarticulaires.

Les sept suspensions phagiques ont été caractérisées par microscopie électronique, restriction enzymatique, caractérisation par PCR, et étude de leur spectre lytique.

1. Caractérisation des phages

a. Analyse des phages en microscopie électronique

Les phages ont présenté les caractéristiques suivantes :

- Les têtes des phages présentent une symétrie icosaédrique, sont non enveloppées, et mesurent 62 nm (± 5).
- Les phages sont caudés avec une queue longue, non contractile, portant des striations perpendiculaires à l'axe principal sur toute la longueur de la queue, et terminée par des courtes fibres terminales.

Ces caractéristiques permettent de classer les 7 phages dans la famille des *SIPHOVIRIDAE*. Selon la longueur de la queue du phage, trois morphotypes ont été définis :

- Le morphotype A, avec une queue mesurant 108 nm de longueur (± 10 nm),
- Le morphotype B, avec une queue mesurant 145 nm de longueur (± 10 nm),
- Le morphotype C, avec une queue mesurant 180 nm de longueur (± 10 nm).

Une suspension phagique, S330E85 (φ6), est de morphotype A ; cinq suspensions, S72S393 (φ1), S70S393 (φ2), S392S360 (φ3), E342S73 (φ4), et S106S73 (φ5), sont de morphotype B ; et une suspension phagique, E58E411 (φ7), est de morphotype C.

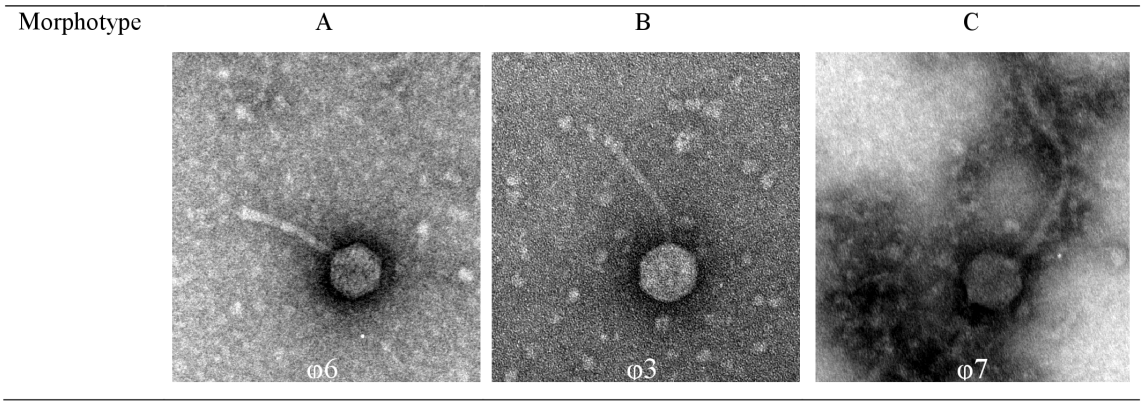


Figure 14. Détermination de la morphologie des bactériophages isolés de souches de S. agalactiae d'infections cutanées et ostéoarticulaires de l'adulte.
Ces bactériophages appartiennent à trois morphotypes qui diffèrent par le langeur de la queue.

b. Restriction enzymatique de l'ADN phagique

Sept profils distincts ont été obtenus avec l'enzyme de restriction *Hind*III (Figure 15). La comparaison des profils a été réalisée avec le logiciel Taxotron Package en utilisant l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method of Averages). Quatre groupes ont été obtenus avec *Hind*III nommés respectivement H1 à H4 (Figure 15).

Six profils distincts ont été obtenus avec l'enzyme de restriction *Eco*RI. L'ADN phagique de la suspension E342S73 a été résistant à *Eco*RI. Le dendrogramme obtenu à partir des profils avec l'enzyme *Eco*RI permet de définir 4 groupes nommés respectivement E1 à E4 (figure 16).

Six profils distincts ont été obtenus avec l'enzyme de restriction *Cla*I. L'ADN phagique de la suspension E342S73 a été résistant à *Cla*I. Quatre groupes de restriction ont été obtenus avec *Cla*I (C1 à C4) (figure 17).

Au total, La restriction enzymatique montre une diversité génétique importante pour les 7 phages isolés.

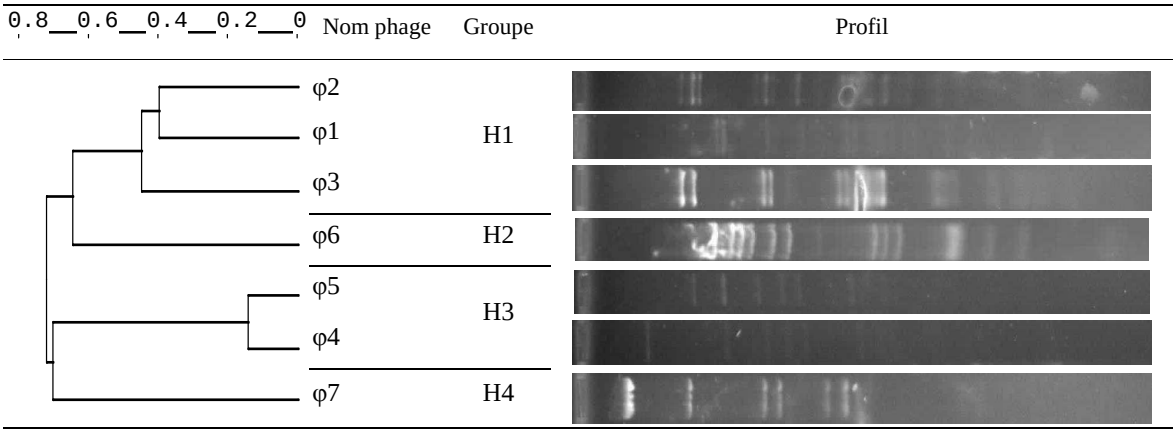


Figure 15. Restriction des ADN phagiques avec *Hind*III.

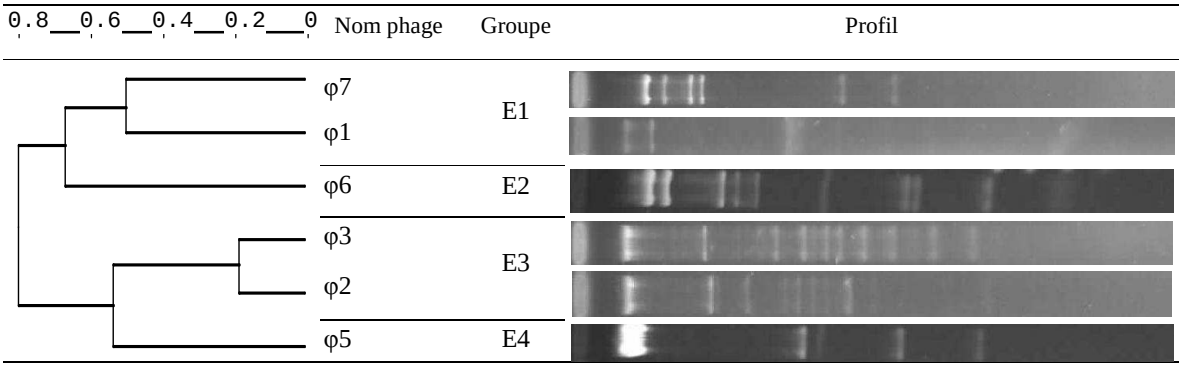


Figure 16. Restriction des ADN phagiques avec *Eco*RI.

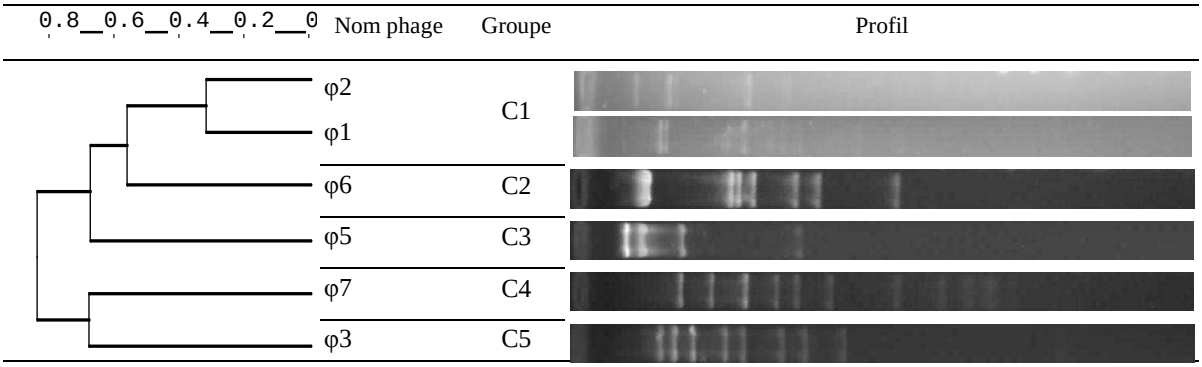


Figure 17. Restriction des ADN phagiques avec *Cla*I.

Figures 15/16/17. Profils de restrictions des ADN de sept phages isolés de souches impliquées dans les infections cutanées et ostéoarticulaires de l'adulte obtenus avec *Hind*III (Figure 15), *Eco*RI (Figure 16), et *Cla*I (Figure 17). L'analyse en UPGMA des profils obtenus montre un certain dégrée de diversité génomique.

c. Etude du spectre lytique

L'activité lytique des phages a été déterminée par l'étude de la sensibilité des 58 souches de *S. agalactiae* isolées d'infections cutanées et ostéoarticulaires aux 7 phages. Vingt-cinq réactions lytiques ont été obtenues. La classification des phages réalisée en fonction de leur spectre lytique en utilisant le coefficient de similitude de Jaccard-Sneath est présentée au niveau de la figure 18. Les résultats suggèrent une grande diversité des phages isolés d'infections cutanées et à l'inverse une homogénéité des deux phages isolées à partir de souches responsables d'infections ostéoarticulaires (φ1 et φ2).

Les phages isolés de souches associées aux infections cutanées présentent tous un spectre lytique particulier ; à l'opposé, les 2 phages isolés de souches associées aux infections ostéo-articulaires présentent un spectre apparenté.

Caractéristique						
Souches donneuse					Phage	
Sérotype	CC	ST	Origine	Souche donneuse	Phage	Type lytique
Ia	23	23	SKI	E342	φ4	L1
Ia	23	23	SKI	S106	φ5	L2
IV	1	196	SKI	S392	φ3	L3
V	1	1	OAI	S70	φ2	L4
V	1	1	OAI	S72	φ1	L5
Ia	23	23	SKI	S330	φ6	L6
Ia	23	88	SKI	E58	φ7	L7

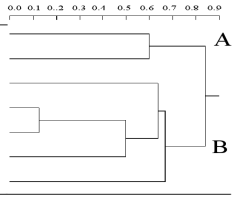


Figure 18. Activité lytique de 7 phages isolés de souches d'infections cutanées et ostéo-articulaires de l'adulte sur une collection de 58 souches de même origine clinique.
Les caractéristiques des souches donneuses des phages (sérotype, complexe clonal, sequence type, et origine) sont rappelées. L'activité fonctionnelle des 7 phages est diverse.

d. Etude du contenu prophagique des phages isolés

Les 18 fragments d'ADN prophagique précédemment décrits ont été recherchés par PCR sur l'ADN des 7 phages (Domelier *et al.*, 2009).

Pour six phages, une amplification pour au moins 2 des 18 fragments a été obtenue (tableau 10) ; seul le phage φ6 isolé d'une souche responsable d'infection cutanée n'a pas présenté d'amplification. Les phages φ5 et φ7 isolés de souches responsables d'infections

cutanées ont montré un nombre plus élevé d'amplification (4 fragments par phage). Deux fragments ont été fréquemment retrouvés : le fragment F10 pour 6 phages, et le fragment SAJ_2357 pour 5 phages.

Tableau 10. Amplification de 18 fragments d'ADN prophagique avec les 7 ADN phagiques.

	F5	F7	F10	SAG0566	SAJ_2395	SAK_0738	SAK_0748	SAK_2090	SAK_2094	SAK_1326	SAK_0646	SAK_2079	SAG0598	SAG0610	SAK_0613	SAL_0666	SAI_0620	SAJ_2357
φ1			+				+											+
φ2			+														+	+
φ3			+															+
φ4			+										+					+
φ5			+										+				+	+
φ6																		
φ7			+											+	+		+	

Une association a été observée entre les morphotypes et le contenu en fragments d'ADN prophagique (figure 19). Les phages de morphotype B présentent un contenu en fragments d'ADN prophagique semblable, alors que le phage de morphotype C comporte des fragments particuliers.

Souche donneuse	Souche propagation	Profils de restriction avec *Cla*I	*Eco*RI	*Hind*III	Morphotype	Type lytique	Phage
E85	S330	C2	E2	H2	A	L6	φ6
S73	E342	-	-	H3	B	L1	φ4
S73	S106	C3	E4	H3	B	L2	φ5
S393	S70	C1	E3	H1	B	L4	φ2
S360	S392	C5	E3	H1	B	L3	φ3
S393	S72	C1	E1	H1	B	L5	φ1
E411	E58	C4	E1	H4	C	L7	φ7

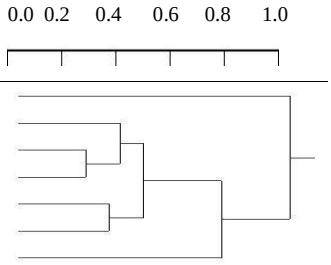


Figure 19. Caractéristiques des 7 phages et contenu en fragments prophagiques.

Au totale, les phages isolés présentent une diversité génétique notable.

L'analyse comparée du contenu prophagique des 7 phages isolés de souches responsables d'infections invasives chez l'adulte et des 36 phages isolés de souches de *S. agalactiae* représentant la diversité des infections materno-fœtales (Domelier *et al.*, 2009) souligne les particularités des phages isolés des infections cutanées et ostéo-articulaires (figure 20) ; en particulier, un cluster unique regroupe les 3 phages isolés de souches de CC1 et 2 phages isolées de souches de CC23.

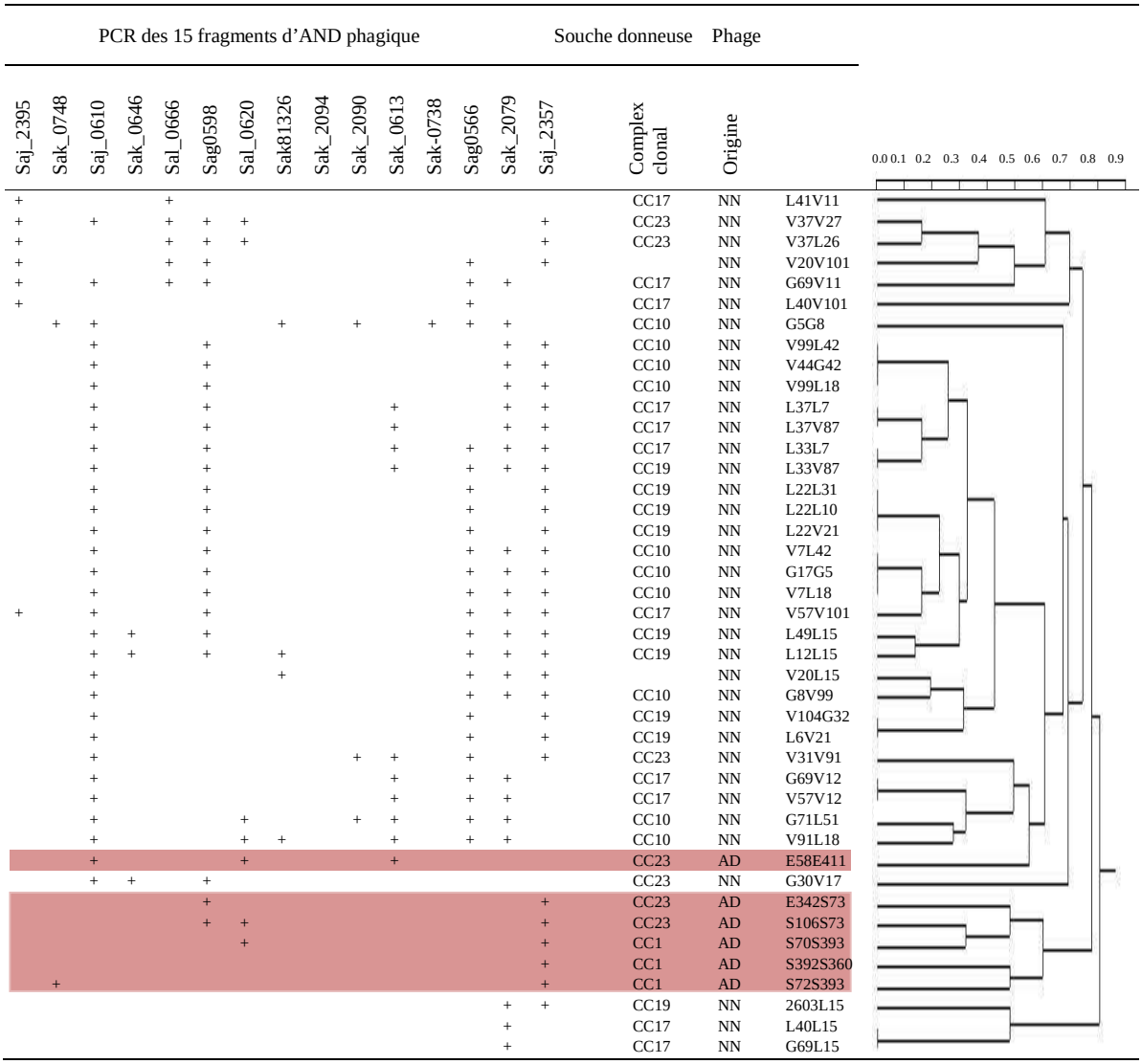


Figure 20. Analyse comparée des résultats obtenus par amplification par PCR multilocus de 36 phages isolés de souches d'origine matérno-fœtale (Domelier *et al.*, 2009) et des 7 phages isolés de souches d'infections cutanées et ostéoarticulaires.
Les phages des souches adultes constituent un groupe spécifique par rapport à ceux produits par les souches maténo-fœtales.

Les souches de S. agalactiae responsables d'infections chez l'adulte, en particulier de la lignée phylogénétique CC1 hébergent des phages distincts des phages décrits par Domelier (2009).

2. Susceptibilité des 261 souches aux 7 phages

L'étude de la susceptibilité aux 7 phages des 261 souches de *S. agalactiae* d'origine diverses précédemment présentées, a procuré 109 réactions lytiques. Quarante-neuf des 261 souches testées (19 %) ont montré au moins une réaction lytique avec un des 7 phages.

Une différence (néanmoins non significative) dans la sensibilité aux 7 phages a été constatée en fonction des populations de souches. La sensibilité aux phages a été plus élevée pour les souches isolées d'infections cutanées (33 %), ostéoarticulaires (21 %), ou de bactériémie (25 %) chez l'adulte, et les souches isolées de bactériémie chez le nouveau-né (20 %) (Tableau 11).

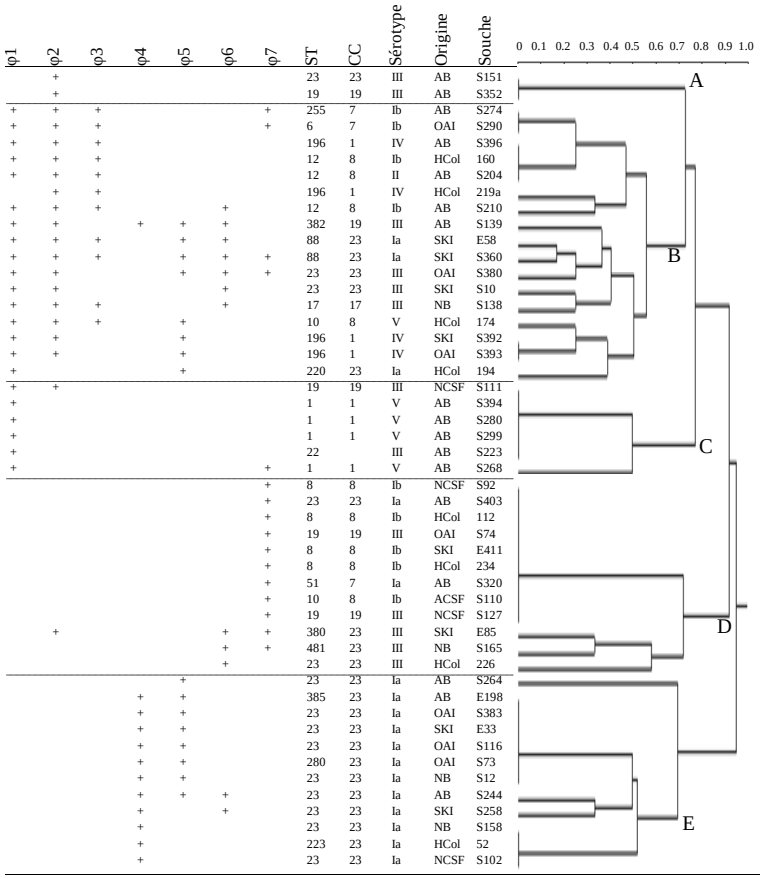
Tableau 11. Fréquence de lyse des souches en fonction de la population.

Origine (no. de souches)	No. (%) de souches	
	lysées	non lysées
Adulte		
infections cutanées (24)	8 (33)	16 (67)
infections ostéoarticulaires (34)	7 (21)	27 (79)
bactériémie (67)	17 (25)	50 (75)
méningite (8)	1 (13)	7 (87)
colonisation asymptomatique (61)	8 (13)	53 (87)
Nouveau-né		
bactériémie (20)	4 (20)	16 (80)
méningite (47)	4 (9)	43 (91)
Total (261)	49 (19)	212 (81)

Au total, les souches de colonisation et les souches isolées de cas de méningites (chez l'adulte et le nouveau-né) sont moins susceptibles aux 7 phages que les souches isolées des autres infections invasives.

3. Regroupement des souches en fonction des réactions lytiques

Les 49 souches typables avec les 7 phages ont été regroupées en fonction des réactions de lyse en 5 lysogroupes désignés de A à E en utilisant le coefficient de similitude de Jaccard-Sneath (figure 21 et tableau 12).



φ1	φ2	φ3	φ4	φ5	φ6	φ7	ST	CC	Sérotype	Origine	Souche
	+						23	23	III	AB	S151
	+						19	19	III	AB	S352
+	+	+				+	255	7	Ib	AB	S274
+	+	+				+	6	7	Ib	OAI	S290
+	+	+					196	1	IV	AB	S396
+	+	+					12	8	Ib	HCol	160
+	+	+					12	8	II	AB	S204
	+	+					196	1	IV	HCol	219a
+	+	+			+		12	8	Ib	AB	S210
+	+		+	+	+		382	19	III	AB	S139
+	+	+		+	+		88	23	Ia	SKI	E58
+	+	+		+	+	+	88	23	Ia	SKI	S360
+	+			+	+	+	23	23	III	OAI	S380
+	+				+		23	23	III	SKI	S10
+	+	+			+		17	17	III	NB	S138
+	+	+		+			10	8	V	HCol	174
+	+			+			196	1	IV	SKI	S392
+	+			+			196	1	IV	OAI	S393
+				+			220	23	Ia	HCol	194
+	+						19	19	III	NCSF	S111
+							1	1	V	AB	S394
+							1	1	V	AB	S280
+							1	1	V	AB	S299
+							22		III	AB	S223
+						+	1	1	V	AB	S268
						+	8	8	Ib	NCSF	S92
						+	23	23	Ia	AB	S403
						+	8	8	Ib	HCol	112
						+	19	19	III	OAI	S74
						+	8	8	Ib	SKI	E411
						+	8	8	Ib	HCol	234
						+	51	7	Ia	AB	S320
						+	10	8	Ib	ACSF	S110
						+	19	19	III	NCSF	S127
	+				+	+	380	23	III	SKI	E85
					+	+	481	23	III	NB	S165
					+		23	23	III	HCol	226
				+			23	23	Ia	AB	S264
			+	+			385	23	Ia	AB	E198
			+	+			23	23	Ia	OAI	S383
			+	+			23	23	Ia	SKI	E33
			+	+			23	23	Ia	OAI	S116
			+	+			280	23	Ia	OAI	S73
			+	+			23	23	Ia	NB	S12
			+	+	+		23	23	Ia	AB	S244
			+		+		23	23	Ia	SKI	S258
			+				23	23	Ia	NB	S158
			+				223	23	Ia	HCol	52
			+				23	23	Ia	NCSF	S102

Figure 21. Analyse du spectre lytique obtenu avec les 7 phages sur 49 souches de *S. agalactiae*. L'activité lytique analysée avec le logiciel SYSTAT varie en fonction de la position phylogénétique de certaines souches sensibles.
Les lignées CC1 et CC23 sont en effet sensibles aux mêmes phages : groupe F pour le CC23 et groupe E pour le CC1. (Origine des souches : SKI, infections cutanées ; OAI, infections ostéoarticulaires ; AB, bactériémie chez l'adulte ; ACSF, culture de liquide céphalo-rachidien chez l'adulte ; NB, bactériémie néonatale ; NCSF, culture de liquide céphalo-rachidien chez le nouveau-né ; HCol, colonisation asymptomatique chez l'adulte).

Les souches isolées d'infections cutanées ont été associées au lysogroupe B ($P = 0.056$) (tableau 12). Les souches de sérotype Ia ont été associées au lysogroupe E, et les souches de sérotype V et lysogroupe C ($P < 0{,}001$) (tableau 13).

Les souches de CC23 ont été les plus sensibles aux phages et ont été associées au lysogroupe E ($P < 0.001$) et les souches de CC1 avec le lysogroupe C ($P < 0{,}001$) (tableau 14).

Tableau 12. Distribution des souches dans les 5 groupes lytiques en fonction de la population.

Origine (no. de souches)	No. de souches (%) pour chaque population					NT*
Adulte	A (2)	B (17)	C (6)	D (12)	E (12)	(212)
infections cutanées (24)		4 (17)		2 (8)	2 (8)	16 (67)
infections ostéoarticulaires (34)		3 (9)		1 (3)	3 (9)	27 (79)
bactériémie (67)	2(3)	5 (7)	5 (7)	2 (3)	3 (4)	50 (75)
méningite (8)				1 (12)		7 (88)
colonisation asymptomatique (61)		4 (7)		3 (5)	1 (2)	53 (87)
Nouveau-né						
bactériémie (20)		1 (5)		1 (5)	2 (10)	16 (80)
méningite (47)			1 (2)	2 (4)	1 (2)	43 (91)

*souches non typables

Tableau 13. Distribution des 49 souches dans les 5 groupes lytiques en fonction de leur sérotype

Sérotype (no. de souches)	No. de souches (%) pour chaque population					NT*
	A (2)	B (17)	C (6)	D (12)	E (12)	(212)
Ia (53)		3 (6)		2 (4)	12 (23)	36 (70)
Ib (32)		4 (13)		5 (16)		23 (72)
II (8)		1 (13)				7 (87)
III (93)	2 (2)	4 (4)	2 (2)	5 (5)		80 (86)
IV (8)		4 (50)				4 (50)
V (59)		1 (2)	4 (7)			54 (92)

*souches non typables

Tableau 14. Distribution des souches et groupes lytiques en fonction des principaux CCs.

CC (no. de souches)	No. de souches (%) pour chaque population					NT*
	A (2)	B (17)	C (6)	D (12)	E (12)	(212)
CC1 (68)		4 (6)	4 (6)			60 (88)
CC17 (58)		1 (2)				56 (97)
CC23 (54)	1 (2)	5 (9)		4 (7)	12 (22)	32 (59)

*souches non typables

Les souches responsables d'infections, et plus particulièrement celles du CC23 (en dehors des souches isolées de cas de méningites) sont sensibles aux phages de lysogénie isolés des souches responsables d'infections cutanées et ostéo-articulaires.

4. Caractéristiques des souches lysogènes des 7 phages

Les résultats de l'analyse des caractéristiques des souches lysées en fonction de celles des souches lysogènes (donneuses) sont présentés au niveau du tableau 15. Les phages isolés des souches de CC1 lysent les souches appartenant à tous les CCs, alors que les phages isolés de souches appartenant au CC23 lysent préférentiellement les souches de CC23 (*P* =0,002).

Tableau 15. Résultats de la lysotypie et corrélation avec les complexes clonaux.

Phage	ST (CC) de la souche donneuse	n° (%) de souches lysées du complexe clonal							Total
		CC1	CC7	CC8	CC17	CC19	CC23	Autres	
φ1	1 (1)	7 (33)	2 (10)	3 (14)	1 (5)	2 (10)	5 (24)	1 (5)	21
φ2	1 (1)	4 (21)	2 (11)	4 (21)	1 (5)	2 (11)	6 (32)		19
φ3	196 (1)	2 (18)	2 (18)	4 (36)	1 (9)		2 (18)		11
φ4	23 (23)					1 (8)	11 (92)		12
φ5	23 (23)	2 (13)		1 (6)		1 (6)	12 (75)		16
φ6	23 (23)			1 (8)	1 (8)	1(8)	9 (75)		12
φ7	88 (23)	1 (6)	3 (19)	5 (31)		2 (13)	5 (31)		16

AU TOTAL,

L'isolement de phages tempérés à partir de souches de *S. agalactiae* associées à des infections cutanées et ostéo-articulaires, confirme l'importance de la lysogénie des souches associées aux infections invasives cutanées et ostéoarticulaires chez l'adulte et appartenant aux clones CC1 et CC23.

Ces phages appartiennent à la famille des *SIPHOVIRIDAE*, comme ceux isolés des souches responsables d'infections materno-fœtales par Domelier (2009).

Les phages isolés de souches appartenant au clone CC1 présentent un spectre étendu à l'ensemble des souches des CCs majeurs ; des résultats similaires avaient été obtenus par Domelier avec des phages isolés de souches appartenant au CC17 et responsables de méningites néonatales (Domelier *et al.*, 2009). Il est vraisemblable que la capacité des phages isolés de souches du complexe clonal CC1 à pouvoir lyser les populations rivales diverses, puisse fournir un avantage sélectif aux souches lysogènes du complexe clonal CC1 en terme de colonisation ou

d’invasion chez l’adulte. Comme cela a été proposé pour le complexe clonal CC17 chez le nouveau-né (Domelier *et al.*, 2009), et démontré pour d’autres espèces bactériennes, les prophages de souches du complexe clonal CC1 pourraient jouer un rôle dans l’adaptation de la bactérie à une niche particulière et contribuer au succès écologique de cette lignée phylogénétique.

A l’opposé, nos résultats montrent que les phages issus de souches donneuses appartenant au CC23 présentent un spectre lytique restreint aux souches de la même lignée phylogénétique. Ces résultats confirment les données obtenues par Domelier avec des phages différents mais isolés de souches appartenant au CC23 (Domelier *et al.*, 2009).

Discussion et conclusion générale et perspectifs

Première conclusion de notre travail : Les souches de *S. agalactiae* responsables d'infections chez l'adulte appartiennent à des lignées phylogénétiques plus restreintes que celles auxquelles appartiennent les souches qui colonisent les muqueuses de l'être humain. Ce résultat suggère que le risque infectieux lié à la colonisation fréquente des muqueuses chez l'homme n'est pas seulement lié aux facteurs de risque de l'hôte mais est aussi dépendant de la nature des souches colonisantes.

Deuxième conclusion de notre travail : les lignées phylogénétiques les plus impliquées dans les infections de l'adulte sont rarement impliquées dans les infections invasives des nouveau-nés qui, pour leur grande majorité, appartiennent à un seul complexe clonal, le CC17. Cette différence peut en partie être expliquée par la capacité de chaque lignée à coloniser plus volontiers certaines muqueuses. En effet, comme montré par van der Mee et coll., la distribution des souches des flores naturelles de l'homme dans les différents complexes clonaux diffèrent sensiblement selon la nature du site anatomique concerné (van der Mee-Marquet *et al.,* 2008). Les souches des trois lignées phylogénétiques infectantes chez l'adulte sont plus particulièrement capables de coloniser le tractus digestif ; en revanche, les souches de CC17 retrouvée dans les infections néonatales sont plus souvent des commensales des voies génitales. Bien que les portes d'entrée des infections invasives chez l'adulte soient peu documentées, il est assez probable que nombre d'infections chez ces patients ait comme porte d'entrée le tractus digestif.

Troisième conclusion de notre travail : Parmi les lignées phylogénétiques impliquées dans les infections de l'adulte, aussi bien locales qu'invasives, les souches de la lignée CC1 ont une place importante. Cette lignée était quasi inexistante avant les années 1990. On peut donc considérer que l'émergence et la diffusion de ses souches n'est pas sans lien avec l'émergence des infections à *S. agalactiae* chez l'adulte observée depuis ces mêmes dates. L'homogénéité génomique d'une part et du contenu prophagique du génome d'autre part sont aussi des indices du peu d'ancienneté de cette lignée.

Contrairement aux souches de autres lignées phylogénétiques isolées chez l'homme, et comme pour les souches du complexe clonal 17 impliqué dans les méningites néonatales, les phages produits par cette lignée CC1 expriment des phages capables de lyser les souches de l'ensemble des autres lignées phylogénétiques. Ce phénomène pourrait donner à ces souches un avantage sélectif qui participe à l'augmentation de la prévalence de ces souches aussi bien dans les flores naturelles que dans les pathologies infectieuses, comme constaté ces dernières années.

Quatrième conclusion de notre travail : A l'intérieur de chaque lignée phylogénétique plus particulièrement responsables d'infections chez l'adulte, l'étude de la diversité génétique montre que les souches infectantes constituent une population particulière au sein des complexes clonaux CC1 et CC8. Ce résultat suggère qu'à l'intérieur de ces lignées le pouvoir invasif des souches peut être relativement variable. Par conséquent, la notion d'appartenance à un complexe clonal donné d'un isolat n'est pas suffisante pour évaluer le risque infectieux. Cet élément est à prendre en compte dans la mise au point d'éventuelles stratégies de dépistage et de prévention. A noter que, dans ce cadre, l'évaluation de la richesse en éléments prophagiques pourrait être un élément supplémentaire d'évaluation du potentiel infectieux, chez les sujets colonisés, dans la mesure où le génome des souches à haut risque est le plus équipé en éléments prophagiques.

Cinquième conclusion de notre travail : Les souches de chaque lignée phylogénétique ont subi de mécanismes de lysogénie spécifiques. La corrélation observée entre distribution phylogénétique des isolats et phénomènes de lysogénie particulier questionne sur le rôle exact de la lysogénie dans la diversification de l'espèce et la spécialisation de certains clones à coloniser certaines niches écologiques. Cette corrélation ne pourrait être que la conséquence de capacités, indépendantes de la lysogénie, de certaines souches à s'installer dans des niches écologiques dont les conditions anatomiques, biologiques, et physico-chimiques sont très différentes, comme la bouche, l'intestin, le vagin, la peau, la mamelle du bovin, le poisson voire les milieux marins. L'adaptation à ces milieux exposerait à des mécanismes de transduction spécifiques du fait du contenu de chaque niche en phages spécifiques. Néanmoins, on ne peut pas exclure que ces transferts génétiques horizontaux participent à l'adaptation de la bactérie et à l'évolution de

l'espèce comme montré par exemple pour les cyanophages qui participent grandement à la structuration des communautés bactériennes dans les océans (Suttle, 2005 ; Suttle, 2007).

Enfin, sixième conclusion de notre travail : parmi les souches isolées chez les adultes, les souches infectantes diffèrent significativement des souches colonisantes par une plus grande richesse en éléments prophagiques dans leur génome. Ce résultat suggère un lien possible entre phénomènes de lysogénie et capacité des souches à induire des pathologies humaines, chez l'adulte comme chez le nouveau-né. Ce lien reste à démontrer. Comme précédemment décrit chez *S. aureus* par Lee et coll. (Lee et Iandolo, 1986) et Coleman et coll. (Coleman *et al.*, 1991) ou chez *E. coli* par Chen et coll. (Chen *et al.*, 2005), la lysogénie pourrait inactiver certains gènes bactériens et ainsi modifier le niveau de transcription et d'expression de certains gènes de virulence. Autre hypothèse, la lysogénie permet l'importation de nouveau gènes de virulence comme décrit dans plusieurs espèces, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *Vibrio cholerae* ou les entérobactéries. Chez *S. agalactiae*, si un lien lysogénie/exacerbation de la virulence suggéré par nos résultats existe, il relève très probablement de mécanismes plus complexes que ceux déjà décrits. En effet, l'analyse *in silico* des génomes des souches séquencées d'une part et les travaux évaluant la prévalence des différents facteurs de virulence connus chez *S. agalactiae* d'autre part ne montrent pas de différence notable quant à l'équipement des souches des différentes lignées phylogénétiques quelles soient colonisantes ou infectantes. En outre, aucun gène de virulence n'a été montré comme associé à des phages dans cette espèce.

Une hypothèse plus probable est que la lysogénie constitue un événement génétique qui optimise l'expression de certains facteurs de virulence préexistants dans le génome. En effet, comme récemment montré dans l'équipe par Al Safadi et Coll., l'intégration d'éléments génétiques mobiles dans certaines régions inter géniques permet d'augmenter notablement l'expression de certains gènes en amont comme le gène d'adhésion à la laminine (Al safadi *et al.*, 2010). Il n'est donc pas impossible d'envisager que des phénomènes de transduction puisse moduler soit directement soit par l'intermédiaire des régulateurs ou du métabolisme l'expression de gènes de virulence. Domelier et Coll. ont en effet récemment démontré que les souches invasives chez le nouveau-né, riches en éléments prophagiques, avaient des pertes cataboliques (Domelier *et al.*, 2006). Les connaissances concernant de telles mécanismes sont actuellement embryonnaires : s'agit-il d'apport de promoteurs additionnels, des conséquences de l'action

d’ARN non codants ou de courtes séquences palindromiques de type CRISPR (*clusters of regularly interspaced short palindromic repeats*) directement liés à la lysogénie. L’exploration de ces phénomènes potentiellement en cause sera l’objet principal de nos travaux futurs.

Avec cet objectif, nos travaux futurs s’attacheront à explorer plus particulier les phages et leur rôle au sein de la lignée phylogénétique CC1.

En effet, comme montré dans nos résultats,

- Cette lignée a une place importante dans les pathologies adultes
- Les souches sont riches en éléments prophagiques qui exposent un contenu homogène
- Les phages issus de cette lignée semblent avoir une activité lytique étendue

Nous envisageons donc :

- De séquencer les 3 phages de cette lignée
- De construire une souche lysogène à partir d’une souche sensible
- De localiser les sites d’insertion au niveau du génome
- D’identifier modifications induite par la lysogénie en termes de métabolisme, de transduction des gènes de virulence, et expression protéique.

Publications

Bibliographie

Adderson, E. E., S. Takahashi, Y. Wang, J. Armstrong, D. V. Miller, and J. F. Bohnsack. Subtractive hybridization identifies a novel predicted protein mediating epithelial cell invasion by virulent serotype III group B *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun.* 2003. **71**:6857-63.

Akhtar, M. S., M. Y. Krishnan, and V. Bhakuni. Insights into the mechanism of action of hyaluronate lyase: role of C-terminal domain and Ca2+ in the functional regulation of enzyme. *J Biol Chem*. 2006. **281**:28336-44.

Akita, S., K. Tanaka, and A. Hirano. Lower extremity reconstruction after necrotising fasciitis and necrotic skin lesions using a porcine-derived skin substitute. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2006. **59**:759-63.

Allardice, J. G., T. F. Baskett, M. M. Seshia, N. Bowman, and R. Malazdrewicz. Perinatal group B streptococcal colonization and infection. *Am J Obstet Gynecol.* 1982. **142**:617-20.

Al Safadi R, Amor S, Hery-Arnaud G, Spellerberg B, Lanotte P, et al. Enhanced expression of *lmb* gene encoding laminin-binding protein in *Streptococcus agalactiae* strains harboring IS*1548* in *scpB-lmb* intergenic region. 2010. PLoS ONE 5(5): e10794.

Andersen, J., R. Christensen, and J. Hertel. Clinical features and epidemiology of septicaemia and meningitis in neonates due to *Streptococcus agalactiae* in Copenhagen County, Denmark: a 10 year survey from 1992 to 2001. *Acta Paediatr*. 2004. **93**:1334-9.

Angata, T., and A. Varki. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev.* 2002. **102**:439-69.

Anthony, B. F., and D. M. Okada. The emergence of group B streptococci in infections of the newborn infant. *Annu Rev Med*. 1977. **28**:355-69.

Artz, L. A., V. A. Kempf, and I. B. Autenrieth. Rapid screening for *Streptococcus agalactiae* in vaginal specimens of pregnant women by fluorescent in situ hybridization. *J Clin Microbiol*. 2003. **41**:2170-3.

Baker, C. J. Group B streptococcal infections. *Clin Perinatol.* 1997. **24**:59-70.

Baker, C. J., B. J. Webb, C. V. Jackson, and M. S. Edwards. Countercurrent immunoelectrophoresis in the evaluation of infants with group B streptococcal disease. *Pediatrics.* 1980. **65**:1110-4.

Band, J. D., H. W. Clegg, 2nd, P. S. Hayes, R. R. Facklam, J. Stringer, and R. E. Dixon. Transmission of group B streptococci. Traced by use of multiple epidemiologic markers. *Am J Dis Child*. 1981. **135**:355-8.

Banks, D. J., S. B. Beres, and J. M. Musser. The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence. *Trends Microbiol*. 2002. **10**:515-21.

Barcaite, E., A. Bartusevicius, R. Tameliene, M. Kliucinskas, L. Maleckiene, and R. Nadisauskiene. Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008. **87**:260-71.

Baron, M. J., G. R. Bolduc, M. B. Goldberg, T. C. Auperin, and L. C. Madoff. Alpha C protein of group B *Streptococcus* binds host cell surface glycosaminoglycan and enters cells by an actin-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2004. **279**:24714-23.

Bayer, A. S., A. W. Chow, B. F. Anthony, and L. B. Guze. Serious infections in adults due to group B streptococci. Clinical and serotypic characterization. *Am J Med.* 1976. **61**:498-503.

Beres, S. B., G. L. Sylva, K. D. Barbian, B. Lei, J. S. Hoff, N. D. Mammarella, M. Y. Liu, J. C. Smoot, S. F. Porcella, L. D. Parkins, D. S. Campbell, T. M. Smith, J. K. McCormick, D. Y. Leung, P. M. Schlievert, and J. M. Musser. Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002. **99**:10078-83.

Berg, S., B. Trollfors, T. Lagergard, G. Zackrisson, and B. A. Claesson. Serotypes and clinical manifestations of group B streptococcal infections in western Sweden. *Clin Microbiol Infect*. 2000. **6**:9-13.

Bergeron, M. G., and D. Ke. New DNA-based PCR approaches for rapid real-time detection and prevention of group B streptococcal infections in newborns and pregnant women. *Expert Rev Mol Med*. 2001. **3**:1-14.

Bergh, K., A. Stoelhaug, K. Loeseth, and L. Bevanger. Detection of group B streptococci (GBS) in vaginal swabs using real-time PCR with TaqMan probe hybridization. *Indian J Med Res*. 2004. **119** Suppl:221-3.

Bergseng, H., J. E. Afset, A. Radtke, K. Loeseth, R. V. Lyng, M. Rygg, and K. Bergh. Molecular and phenotypic characterization of invasive group B *streptococcus* strains from infants in Norway 2006-2007. *Clin Microbiol Infect*. 2009. **15**:1182-5.

Bingen, E., E. Denamur, N. Lambert-Zechovsky, Y. Aujard, N. Brahimi, P. Geslin, and J. Elion. Analysis of DNA restriction fragment length polymorphism extends the evidence for breast milk transmission in *Streptococcus agalactiae* late-onset neonatal infection. *J Infect Dis*. 1992. **165**:569-73.

Bisharat, N., D. W. Crook, J. Leigh, R. M. Harding, P. N. Ward, T. J. Coffey, M. C. Maiden, T. Peto, and N. Jones. Hyperinvasive neonatal group B *streptococcus* has arisen from a bovine ancestor. *J Clin Microbiol*. 2004. **42**:2161-7.

Bisharat, N., N. Jones, D. Marchaim, C. Block, R. M. Harding, P. Yagupsky, T. Peto, and D. W. Crook. Population structure of group B *streptococcus* from a low-incidence region for invasive neonatal disease. *Microbiology*. 2005. **151**:1875-81.

Bisno, A. L., and D. L. Stevens. Streptococcal infections of skin and soft tissues. *N Engl J Med*. 1996. **334**:240-5.

Blancas, D., M. Santin, M. Olmo, F. Alcaide, J. Carratala, and F. Gudiol. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults: incidence, clinical characteristics, and outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004. **23**:168-73.

Blond, M. H., R. Lenclen, P. Poulain, and S. Guillaume. [What are the risks associated with vaginal carriage and lower genital infections for the mother, the fetus and the newborn?]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 1997. **26**:13-28.

Blumberg, H. M., D. S. Stephens, M. Modansky, M. Erwin, J. Elliot, R. R. Facklam, A. Schuchat, W. Baughman, and M. M. Farley. Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. *J Infect Dis*. 1996. **173**:365-73.

Bohnsack, J. F., A. Whiting, M. Gottschalk, D. M. Dunn, R. Weiss, P. H. Azimi, J. B. Philips, 3rd, L. E. Weisman, G. G. Rhoads, and F. Y. Lin. Population structure of invasive and colonizing strains of *Streptococcus agalactiae* from neonates of six U.S. Academic Centers from 1995 to 1999. *J Clin Microbiol*. 2008. **46**:1285-91.

Bohnsack, J. F., A. A. Whiting, R. D. Bradford, B. K. Van Frank, S. Takahashi, and E. E. Adderson. Long-range mapping of the *Streptococcus agalactiae* phylogenetic lineage restriction digest pattern type III-3 reveals clustering of virulence genes. *Infect Immun*. 2002. **70**:134-9.

Bolanos, M., A. Canas, O. E. Santana, J. L. Perez-Arellano, I. de Miguel, and A. M. Martin-Sanchez. Invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001. **20**:837-9.

Bolduc, G. R., and L. C. Madoff. The group B streptococcal alpha C protein binds alpha1beta1-integrin through a novel KTD motif that promotes internalization of GBS within human epithelial cells. *Microbiology*. 2007. **153**:4039-49.

Borchardt, S. M., J. H. DeBusscher, P. A. Tallman, S. D. Manning, C. F. Marrs, T. A. Kurzynski, and B. Foxman. Frequency of antimicrobial resistance among invasive and colonizing Group B streptococcal isolates. *BMC Infect Dis*. 2006. **6**:57.

Bou, G., M. Figueira, D. Canle, M. Cartelle, J. M. Eiros, and R. Villanueva. Evaluation of Group B *Streptococcus* Differential Agar for detection and isolation of *Streptococcus agalactiae*. *Clin Microbiol Infect*. 2005. **11**:676-8.

Boyd, E. F., and H. Brussow. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol*. 2002. **10**:521-9.

Boyd, E. F., B. M. Davis, and B. Hochhut. Bacteriophage-bacteriophage interactions in the evolution of pathogenic bacteria. *Trends Microbiol*. 2001. **9**:137-44.

Boyer, K. M., L. C. Vogel, S. P. Gotoff, C. A. Gadzala, J. Stringer, and W. R. Maxted. Nosocomial transmission of bacteriophage type 7/11/12 group B streptococci in a special care nursery. *Am J Dis Child*. 1980. **134**:964-6.

Braun, T. I., W. Pinover, and P. Sih. Group B streptococcal meningitis in a pregnant woman before the onset of labor. *Clin Infect Dis.* 1995. **21**:1042-3.

Brimil, N., E. Barthell, U. Heindrichs, M. Kuhn, R. Lutticken, and B. Spellerberg. Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany. *Int J Med Microbiol*. 2006. **296**:39-44.

Brochet, M., E. Couve, R. Bercion, J. M. Sire, and P. Glaser. Population structure of human isolates of *Streptococcus agalactiae* from Dakar and Bangui. *J Clin Microbiol*. 2009. **47**:800-3.

Brochet, M., E. Couve, M. Zouine, T. Vallaeys, C. Rusniok, M. C. Lamy, C. Buchrieser, P. Trieu-Cuot, F. Kunst, C. Poyart, and P. Glaser. Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. *Microbes Infect*. 2006. **8**:1227-43.

Broker, G., and B. Spellerberg. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and horizontal gene transfer. *Int J Med Microbiol*. 2004. **294**:169-75.

Brussow, H., C. Canchaya, and W. D. Hardt. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004. **68**:560-602.

Brussow, H., and F. Desiere. Comparative phage genomics and the evolution of Siphoviridae: insights from dairy phages. *Mol Microbiol*. 2001. **39**:213-22.

Bruynoghe, R., and J. Maisin. Essais de thérapeutiqe au moyen du bactériophage du Staphylocoque. *J Compt Rend Soc Biol*. 1921. **85**:1120-1121.

Bryan, J. D., R. Liles, U. Cvek, M. Trutschl, and D. Shelver. Global transcriptional profiling reveals *Streptococcus agalactiae* genes controlled by the MtaR transcription factor. *BMC Genomics*. 2008. **9**:607.

Bryan, J. D., and D. W. Shelver. *Streptococcus agalactiae* CspA is a serine protease that inactivates chemokines. *J Bacteriol*. 2009. **191**:1847-54.

Burke, J., D. Schneider, and J. Westpheling. Generalized transduction in Streptomyces coelicolor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. **98**:6289-94.

Buu-Hoi, A., C. Le Bouguenec, and T. Horaud. High-level chromosomal gentamicin resistance in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Antimicrob Agents Chemother*. 1990. 34:985-8.

Campbell, A. M. Chromosomal insertion sites for phages and plasmids. *J Bacteriol*. 1992. **174**:7495-9.

Campbell, J. R., S. L. Hillier, M. A. Krohn, P. Ferrieri, D. F. Zaleznik, and C. J. Baker. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. *Obstet Gynecol*. 2000. **96**:498-503.

Canchaya, C., F. Desiere, W. M. McShan, J. J. Ferretti, J. Parkhill, and H. Brussow. Genome analysis of an inducible prophage and prophage remnants integrated in the *Streptococcus pyogenes* strain SF370. *Virology*. 2002. **302**:245-58.

Canchaya, C., G. Fournous, and H. Brussow. The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Mol Microbiol*. 2004. **53**:9-18.

Canchaya, C., C. Proux, G. Fournous, A. Bruttin, and H. Brussow. Prophage genomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003. **67**:238-76, table of contents.

Chang, B., T. Ikebe, A. Wada, K. Ogata, M. Tomita, C. Katsukawa, R. Kawahara, R. Suzuki, M. Endo, J. Isobe, D. Tanaka, K. Hirasawa, and H. Watanabe. Surveillance of group B streptococcal toxic shock-like syndrome in nonpregnant adults and characterization of the strains in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2006. **59**:182-5.

Chatellier, S., H. Huet, S. Kenzi, A. Rosenau, P. Geslin, and R. Quentin. Genetic diversity of rRNA operons of unrelated *Streptococcus agalactiae* strains isolated from cerebrospinal fluid of neonates suffering from meningitis. *J Clin Microbiol.* 1996. **34**:2741-7.

Chatellier, S., C. Ramanantsoa, P. Harriau, K. Rolland, A. Rosenau, and R. Quentin. Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol*. 1997. **35**:2573-9.

Chen Y, Golding I, Sawai S, Guo L, Cox EC. Population Fitness and the Regulation of *Escherichia coli* Genes by Bacterial Viruses. 2005. PLoS Biol **3**: e229.

Christensen, K. K., K. Dahlander, A. Esktrom, N. Svenningsen, and P. Christensen. Colonization of newborns with group B streptococci: relation to maternal urogenital carriage. *Scand J Infect Dis*. 1981. **13**:23-7.

Christie, R., N. E. Atkins, and E. Munch-Petersen. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci*. 1944. **22**:197-200.

Cieslewicz, M. J., D. Chaffin, G. Glusman, D. Kasper, A. Madan, S. Rodrigues, J. Fahey, M. R. Wessels, and C. E. Rubens. Structural and genetic diversity of group B *streptococcus* capsular polysaccharides. *Infect Immun*. 2005. **73**:3096-103.

Clark, A. J., W. Inwood, T. Cloutier, and T. S. Dhillon. Nucleotide sequence of coliphage HK620 and the evolution of lambdoid phages. *J Mol Biol*. 2001. **311**:657-79.

Coddeville, M. Le module de lysogénie du bactériophage mv4 de Lactobacillus delbrueckii : le commutateur génétique et le contrôle directionnel de la recombinaison spécifique de site. Paul Sabatier, Toulouse. 2006.

Coleman, D., Knights, J., Russell, R., Shanley, D., Birkbeck, T.H., Dougan, G., and Charles, I. Insertional inactivation of the *Staphylococcus aureus* beta-toxin by bacteriophage phi 13 occurs by site- and orientation-specific integration of the phi 13 genome. 1991. *Mol Microbiol* **5**: 933–939.

Colford, J. M., Jr., J. Mohle-Boetani, and K. L. Vosti. Group B streptococcal bacteremia in adults. Five years' experience and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1995. **74**:176-90.

Comeau, A. M., F. Tetart, S. N. Trojet, M. F. Prere, and H. M. Krisch. Phage-Antibiotic Synergy (PAS): beta-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *PLoS One*. 2007. **2**:e799.

Cooper, B. W., and E. Morganelli. Group B streptococcal bacteremia in adults at Hartford Hospital 1991-1996. *Conn Med*. 1998. **62**:515-7.

Correa, A. B., I. C. Oliveira, C. Pinto Tde, M. C. Mattos, and L. C. Benchetrit. Pulsed-field gel electrophoresis, virulence determinants and antimicrobial susceptibility profiles of type Ia group B streptococci isolated from humans in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009. **104**:599-603.

Crum, N. F., and M. R. Wallace. Group B streptococcal necrotizing fasciitis and toxic shock-like syndrome: a case report and review of the literature. *Scand J Infect Dis*. 2003. **35**:878-81.

Culebras, E., I. Rodriguez-Avial, C. Betriu, M. Redondo, and J. J. Picazo. Macrolide and tetracycline resistance and molecular relationships of clinical strains of *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002. **46**:1574-6.

d'Herelle, F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *CR Acad Sci, Paris.* 1917. **165**:373-375.

Dabrowska-Szponar, M., and H. Kubielas. [Serologic and genetic analysis of group B streptococci isolated from adult patients]. *Med Dosw Mikrobiol*. 2006. **58**:283-9.

Das, A., P. Ray, M. Sharma, and S. Gopalan. Rapid diagnosis of vaginal carriage of group B beta haemolytic *streptococcus* by an enrichment cum antigen detection test. *Indian J Med Res*. 2003. **117**:247-52.

Davies, H. D., N. Jones, T. S. Whittam, S. Elsayed, N. Bisharat, and C. J. Baker. Multilocus sequence typing of serotype III group B *streptococcus* and correlation with pathogenic potential. *J Infect Dis*. 2004. **189**:1097-102.

Decoster, L., J. Frans, H. Blanckaert, K. Lagrou, and J. Verhaegen. Antimicrobial susceptibility of group B streptococci collected in two Belgian hospitals. *Acta Clin Belg.* 2005. **60**:180-4.

Del Giudice, P., N. van der Mee-Marquet, F. David-Rubin, F. Le Duff, K. Benchia, E. Counillon, A. S. Domelier, and R. Quentin. Severe relapsing erysipelas associated with chronic *Streptococcus agalactiae* vaginal colonization. *Clin Infect Dis.* 2006. **43**:e67-70.

Denning, D. W., C. J. Baker, N. J. Troup, and L. S. Tompkins. Restriction endonuclease analysis of human and bovine group B streptococci for epidemiologic study. *J Clin Microbiol.* 1989. **27**:1352-6.

Desiere, F., S. Lucchini, C. Canchaya, M. Ventura, and H. Brussow. Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2002. **82**:73-91.

Dillon, H. C., Jr., E. Gray, M. A. Pass, and B. M. Gray. Anorectal and vaginal carriage of group B streptococci during pregnancy. *J Infect Dis.* 1982. **145**:794-9.

Dillon, H. C., Jr., S. Khare, and B. M. Gray. Group B streptococcal carriage and disease: a 6-year prospective study. *J Pediatr*. 1987. **110**:31-6.

Dmitriev, A., L. Tkacikova, A. Suvorov, M. Kantikova, I. Mikula, and A. Totolyan. Comparative genetic study of group B streptococcal strains of human and bovine origin. *Folia Microbiol (Praha)*. 1999. **44**:449-53.

Domelier, A. S., N. van der Mee-Marquet, L. Arnault, L. Mereghetti, P. Lanotte, A. Rosenau, M. F. Lartigue, and R. Quentin. Molecular characterization of erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* strains. *J Antimicrob Chemother.* 2008. **62**:1227-33.

Domelier, A. S., N. van der Mee-Marquet, A. Grandet, L. Mereghetti, A. Rosenau, and R. Quentin. Loss of Catabolic Function in *Streptococcus agalactiae* Strains and Its Association with Neonatal Meningitis. *J Clin Microbiol*. 2006. **44**:3245-3250.

Domelier, A. S., N. van der Mee-Marquet, P. Y. Sizaret, G. Hery-Arnaud, M. F. Lartigue, L. Mereghetti, and R. Quentin. Molecular characterization and lytic activities of *Streptococcus agalactiae* bacteriophages and determination of lysogenic-strain features. *J Bacteriol*. 2009. **191**:4776-85.

Domingo, P., N. Barquet, M. Alvarez, P. Coll, J. Nava, and J. Garau. Group B streptococcal meningitis in adults: report of twelve cases and review. *Clin Infect Dis.* 1997. **25**:1180-7.

Doran, K. S., J. C. Chang, V. M. Benoit, L. Eckmann, and V. Nizet. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. *J Infect Dis*. 2002. **185**:196-203.

Doran, K. S., E. J. Engelson, A. Khosravi, H. C. Maisey, I. Fedtke, O. Equils, K. S. Michelsen, M. Arditi, A. Peschel, and V. Nizet. Blood-brain barrier invasion by group B *Streptococcus* depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid. *J Clin Invest*. 2005. **115**:2499-507.

Doran, K. S., G. Y. Liu, and V. Nizet. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. *J Clin Invest*. 2003. **112**:736-44.

Dramsi, S., E. Caliot, I. Bonne, S. Guadagnini, M. C. Prevost, M. Kojadinovic, L. Lalioui, C. Poyart, and P. Trieu-Cuot. Assembly and role of pili in group B streptococci. *Mol Microbiol*. 2006. **60**:1401-13.

Dunne, D. W., and V. Quagliarello. Group B streptococcal meningitis in adults. *Medicine (Baltimore)*. 1993. **72**:1-10.

Easmon, C. S., and M. J. Hastings. GBS colonisation in mothers and babies. *Antibiot Chemother*. 1985. **35**:28-39.

Easmon, C. S., M. J. Hastings, A. J. Clare, B. Bloxham, R. Marwood, R. P. Rivers, and J. Stringer. Nosocomial transmission of group B streptococci. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1981a. **283**:459-61.

Easmon, C. S., A. Tanna, P. Munday, and S. Dawson. Group B streptococci--gastrointestinal organisms? *J Clin Pathol*. 1981b. **34**:921-3.

Edwards, M. S. Issues of antimicrobial resistance in group B *streptococcus* in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2006. **17**:149-52.

Edwards, M. S., and C. J. Baker. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis*. 2005. **41**:839-47.

Edwards, M. S., and C. J. Baker. Infectious Diseases of the Fetus and the Newborn Infant. Remington, J. S., and J. O. Klein., editors. The W. B. Saunders Co.; Philadelphia: 2001. P. 1091-1156.

Edwards, M. S., M. A. Rench, D. L. Palazzi, and C. J. Baker. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in healthy elderly persons. *Clin Infect Dis*. 2005. **40**:352-7.

Eickhoff, T. C., J. O. Klein, A. K. Daly, D. Ingall, and M. Finland. Neonatal Sepsis and Other Infections Due to Group B Beta-Hemolytic Streptococci. *N Engl J Med*. 1964. **271**:1221-8.

El-Solh, N., D. H. Bouanchaud, T. Horodniceanu, A. Roussel, and Y. A. Chabbert. Molecular studies and possible relatedness between R plasmids from groups B and D streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1978. **14**:19-23.

Facklam, R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev*. 2002. **15**:613-30.

Falagas, M. E., E. S. Rosmarakis, I. Avramopoulos, and N. Vakalis. *Streptococcus agalactiae* infections in non-pregnant adults: single center experience of a growing clinical problem. *Med Sci Monit*. 2006. **12**:CR447-51.

Fallon, R. J. The rapid recognition of Lancefield group B haemolytic streptococci. *J Clin Pathol*. 1974. **27**:902-5.

Farley, M. M. Group B streptococcal infection in older patients. Spectrum of disease and management strategies. *Drugs Aging*. 1995. **6**:293-300.

Farley, M. M. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin Infect Dis*. 2001. **33**:556-61.

Farley, M. M., R. C. Harvey, T. Stull, J. D. Smith, A. Schuchat, J. D. Wenger, and D. S. Stephens. A population-based assessment of invasive disease due to group B *Streptococcus* in nonpregnant adults. *N Engl J Med*. 1993. **328**:1807-11.

Ferretti, J. J., W. M. McShan, D. Ajdic, D. J. Savic, G. Savic, K. Lyon, C. Primeaux, S. Sezate, A. N. Suvorov, S. Kenton, H. S. Lai, S. P. Lin, Y. Qian, H. G. Jia, F. Z. Najar, Q. Ren, H. Zhu, L. Song, J. White, X. Yuan, S. W. Clifton, B. A. Roe, and R. McLaughlin. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. **98**:4658-63.

Ferrieri, P. GBS enzymes, hemolysin, toxins and other products. *Antibiot Chemother*. 1985. **35**:57-70.

Ferrieri, P., P. P. Cleary, and A. E. Seeds. Epidemiology of group-B streptococcal carriage in pregnant women and newborn infants. *J Med Microbiol*. 1977. **10**:103-14.

Florindo, C., S. Viegas, A. Paulino, E. Rodrigues, J. P. Gomes, and M. J. Borrego. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility profiles in *Streptococcus agalactiae* colonizing strains: association of erythromycin resistance with subtype III-1 genetic clone family. *Clin Microbiol Infect.* 2009.

Franken, C., G. Haase, C. Brandt, J. Weber-Heynemann, S. Martin, C. Lammler, A. Podbielski, R. Lutticken, and B. Spellerberg. Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*. *Mol Microbiol*. 2001. **41**:925-35.

Freeman, V. J. Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Bacteriol*. 1951. **61**:675-88.

Fry, R. M. Fatal infections by hemolytic *streptococcus* group B. *Lancet*. 1938. i:199-201.

Gajdos, V., A. S. Domelier, C. Castel, M. Guibert, F. Perreaux, A. Mollet, L. Lebrun, R. Quentin, and P. Labrune. Late-onset and recurrent neonatal *Streptococcus agalactiae* infection with ingestion of infected mother's milk. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008. **136**:265-7.

Gallagher, P. G., and C. Watanakunakorn. Group B streptococcal bacteremia in a community teaching hospital. *Am J Med*. 1985. **78**:795-800.

Garcia-Lechuz, J. M., P. Bachiller, F. J. Vasallo, P. Munoz, B. Padilla, and E. Bouza. Group B streptococcal osteomyelitis in adults. *Medicine (Baltimore)*. 1999. **78**:191-9.

Gardam, M. A., D. E. Low, R. Saginur, and M. A. Miller. Group B streptococcal necrotizing fasciitis and streptococcal toxic shock-like syndrome in adults. *Arch Intern Med*. 1998. **158**:1704-8.

Garland, S. M. Early onset neonatal group B *streptococcus* (GBS) infection: associated obstetric risk factors. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 1991. **31**:117-8.

Gase, K., J. Ozegowski, and H. Malke. The *Streptococcus agalactiae hylB* gene encoding hyaluronate lyase: completion of the sequence and expression analysis. *Biochim Biophys Acta*. 1998. **1398**:86-98.

George, I. A., J. E. Mathews, and K. P. Mathews. Postpartum Group B streptococcal meningitis. *J Postgrad Med.* 2008. **54**:65-6.

Gherardi, G., M. Imperi, L. Baldassarri, M. Pataracchia, G. Alfarone, S. Recchia, G. Orefici, G. Dicuonzo, and R. Creti. Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy. *J Clin Microbiol*. 2007. **45**:2909-16.

Gibbs, R. S., S. Schrag, and A. Schuchat. Perinatal infections due to group B streptococci. *Obstet Gynecol*. 2004. **104**:1062-76.

Gibson, R. L., V. Nizet, and C. E. Rubens. Group B streptococcal beta-hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. *Pediatr Res*. 1999. **45**:626-34.

Gilbert, G. L. Vaccines for other neonatal infections: are group B streptococcal infections vaccine-preventable? *Expert Rev Vaccines*. 2004. **3**:371-4.

Glaser, P., C. Rusniok, C. Buchrieser, F. Chevalier, L. Frangeul, T. Msadek, M. Zouine, E. Couve, L. Lalioui, C. Poyart, P. Trieu-Cuot, and F. Kunst. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol Microbiol*. 2002. **45**:1499-513.

Goerke, C., J. Koller, and C. Wolz. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006. **50**:171-7.

Greatrex, B. A review of beta-haemolytic streptococcal infection in babies. *Br J Nurs*. 1997. **6**:486, 488, 490-3.

Green, P. A., K. V. Singh, B. E. Murray, and C. J. Baker. Recurrent group B streptococcal infections in infants: clinical and microbiologic aspects. *J Pediatr*. 1994. **125**:931-8.

Gutekunst, H., B. J. Eikmanns, and D. J. Reinscheid. Analysis of RogB-controlled virulence mechanisms and gene repression in *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun*. 2003. **71**:5056-64.

Gutekunst, H., B. J. Eikmanns, and D. J. Reinscheid. The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. *Infect Immun*. 2004. **72**:3495-504.

Hancock, R. E., and G. Diamond. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol*. 2000. **8**:402-10.

Harper, I. A. The importance of group B streptococci as human pathogens in the British Isles. *J Clin Pathol*. 1971. **24**:438-41.

Harris, T. O., D. W. Shelver, J. F. Bohnsack, and C. E. Rubens. A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. *J Clin Invest*. 2003. **111**:61-70.

Harrison, L. H., A. Ali, D. M. Dwyer, J. P. Libonati, M. W. Reeves, J. A. Elliott, L. Billmann, T. Lashkerwala, and J. A. Johnson. Relapsing invasive group B streptococcal infection in adults. *Ann Intern Med*. 1995a. **123**:421-7.

Harrison, L. H., D. M. Dwyer, and J. A. Johnson. Emergence of serotype V group B streptococcal infection among infants and adults. *J Infect Dis.* 1995b. **171**:513.

Harrison, L. H., J. A. Elliott, D. M. Dwyer, J. P. Libonati, P. Ferrieri, L. Billmann, and A. Schuchat. Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. Maryland Emerging Infections Program. *J Infect Dis***.** 1998. **177**:998-1002.

Haug, R. H., E. A. Hoiby, and G. Lermark. Serotyping and bacteriophage typing of group B streptococci. *NIPH Ann*. 1983. **6**:119-23.

Hellerqvist, C. G., J. Rojas, R. S. Green, S. Sell, H. Sundell, and M. T. Stahlman. Studies on group B beta-hemolytic *Streptococcus*. I. Isolation and partial characterization of an extracellular toxin. *Pediatr Res.* 1981. **15**:892-8.

Hellerqvist, C. G., G. B. Thurman, D. L. Page, Y. F. Wang, B. A. Russell, C. A. Montgomery, and H. W. Sundell. Antitumor effects of GBS toxin: a polysaccharide exotoxin from group B beta-hemolytic *streptococcus*. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1993. **120**:63-70.

Helmig, R., N. Uldbjerg, J. Boris, and M. Kilian. Clonal analysis of *Streptococcus agalactiae* isolated from infants with neonatal sepsis or meningitis and their mothers and from healthy pregnant women. *J Infect Dis***.** 1993. **168**:904-9.

Hendrix, R. W. Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor Popul Biol*. 2002. **61**:471-80.

Hensler, M. E., S. Miyamoto, and V. Nizet. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin directly impairs cardiomyocyte viability and function. *PLoS One.* 2008. **3**:e2446.

Herbert, M. A., C. J. Beveridge, and N. J. Saunders. Bacterial virulence factors in neonatal sepsis: group B *streptococcus*. *Curr Opin Infect Dis*. 2004. **17**:225-9.

Hery-Arnaud, G., G. Bruant, P. Lanotte, S. Brun, B. Picard, A. Rosenau, N. van der Mee-Marquet, P. Rainard, R. Quentin, and L. Mereghetti. Mobile genetic elements provide evidence for a bovine origin of clonal complex 17 of *Streptococcus agalactiae*. *Appl Environ Microbiol*. 2007. **73**:4668-72.

Hery-Arnaud, G., G. Bruant, P. Lanotte, S. Brun, A. Rosenau, N. van der Mee-Marquet, R. Quentin, and L. Mereghetti. Acquisition of insertion sequences and the GBSi1 intron by *Streptococcus agalactiae* isolates correlates with the evolution of the species. *J Bacteriol.* 2005. **187**:6248-52.

Hill, A. M., and H. M. Butler. Haemolytic streptococci infections following childbirth and abortion: clinical features, with special reference to infections due to streptococci of groups other than A. *Med J Aust***.** 1940. **1**:293-299.

Ho, C. M., C. Y. Chi, M. W. Ho, C. M. Chen, W. C. Liao, Y. M. Liu, P. C. Lin, and J. H. Wang. Clinical characteristics of group B *streptococcus* bacteremia in non-pregnant adults. *J Microbiol Immunol Infect***.** 2006. **39**:396-401.

Hodgson, D. A. Generalized transduction of serotype 1/2 and serotype 4b strains of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol***.** 2000. **35**:312-23.

Holmstrom, B., and E. W. Grimsley. Necrotizing fasciitis and toxic shock-like syndrome caused by group B *streptococcus*. *South Med J.* 2000. **93**:1096-8.

Hood, M., A. Janney, and G. Dameron. Beta hemolytic *streptococcus* group B associated with problems of the perinatal period. *Am J Obstet Gynecol*. 1961. **82**:809-18.

Hoogkamp-Korstanje, J. A., L. J. Gerards, and B. P. Cats. Maternal carriage and neonatal acquisition of group B streptococci. *J Infect Dis***.** 1982. **145**:800-3.

Huang, P. Y., M. H. Lee, C. C. Yang, and H. S. Leu. Group B streptococcal bacteremia in non-pregnant adults. *J Microbiol Immunol Infect*. 2006. **39**:237-41.

Hunter, P. R., and M. A. Gaston. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol***.** 1988. **26**:2465-6.

Huson, D. H., and D. Bryant. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol*. 2006. **23**:254-67.

Imperi, M., M. Pataracchia, G. Alfarone, L. Baldassarri, G. Orefici, and R. Creti. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of Streptococcus agalactiae. *J Microbiol Methods.* 2010. **80**:212-4.

Jackson, L. A., R. Hilsdon, M. M. Farley, L. H. Harrison, A. L. Reingold, B. D. Plikaytis, J. D. Wenger, and A. Schuchat. Risk factors for group B streptococcal disease in adults. *Ann Intern Med*. 1995. **123**:415-20.

Jacobsson, K. A novel family of fibrinogen-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*. *Vet Microbiol***.** 2003. **96**:103-13.

Jiang, S. M., M. J. Cieslewicz, D. L. Kasper, and M. R. Wessels. Regulation of virulence by a two-component system in group B *streptococcus*. *J Bacteriol***.** 2005. **187**:1105-13.

Jiang, S. M., N. Ishmael, J. D. Hotopp, M. Puliti, L. Tissi, N. Kumar, M. J. Cieslewicz, H. Tettelin, and M. R. Wessels. Variation in the group B *Streptococcus* CsrRS regulon and effects on pathogenicity. *J Bacteriol***.** 2008. **190**:1956-65.

Johnson, D. R., and P. Ferrieri. Group B streptococcal Ibc protein antigen: distribution of two determinants in wild-type strains of common serotypes. *J Clin Microbiol*. 1984. **19**:506-10.

Jones, A. L., R. H. Needham, A. Clancy, K. M. Knoll, and C. E. Rubens. Penicillin-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*: a novel mechanism for evasion of immune clearance. *Mol Microbiol*. 2003a. **47**:247-56.

Jones, N., J. F. Bohnsack, S. Takahashi, K. A. Oliver, M. S. Chan, F. Kunst, P. Glaser, C. Rusniok, D. W. Crook, R. M. Harding, N. Bisharat, and B. G. Spratt. Multilocus sequence typing system for group B *streptococcus*. *J Clin Microbiol*. 2003b. **41**:2530-6.

Jones, N., K. Oliver, Y. Jones, A. Haines, and D. Crook. Carriage of group B *streptococcus* in pregnant women from Oxford, UK. *J Clin Pathol*. 2006a. **59**:363-6.

Jones, N., K. A. Oliver, J. Barry, R. M. Harding, N. Bisharat, B. G. Spratt, T. Peto, and D. W. Crook. Enhanced invasiveness of bovine-derived neonatal sequence type 17 group B *streptococcus* is independent of capsular serotype. *Clin Infect Dis.* 2006b. **42**:915-24.

Juhala, R. J., M. E. Ford, R. L. Duda, A. Youlton, G. F. Hatfull, and R. W. Hendrix. Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdoid bacteriophages. *J Mol Biol*. 2000. **299**:27-51.

Karunakaran, R., N. S. Raja, A. Hafeez, and S. D. Puthucheary. Group B *Streptococcus* infection: epidemiology, serotypes, and antimicrobial susceptibility of selected isolates in the population beyond infancy (excluding females with genital tract- and pregnancy-related isolates) at the University Malaya Medical Centre, Kuala Lumpur. *Jpn J Infect Dis*. 2009. **62**:192-4.

Kenny, J. G., S. McGrath, G. F. Fitzgerald, and D. van Sinderen. Bacteriophage Tuc2009 encodes a tail-associated cell wall-degrading activity. *J Bacteriol***.** 2004. **186**:3480-91.

Kieran, E., M. Matheson, A. G. Mann, A. A. Efstratiou, K. Butler, and W. Gorman. Group B *streptococcus* (GBS) colonisation among expectant Irish mothers. *Ir Med J***.** 1998. **91**:21-2.

Kim, B. N., I. G. Bae, M. N. Kim, J. H. Woo, J. Ryu, and Y. S. Kim. Group B streptococcal bacteremia in nonpregnant adults with hepatic disease in Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001. **20**:639-42.

Kimura, K., S. Suzuki, J. Wachino, H. Kurokawa, K. Yamane, N. Shibata, N. Nagano, H. Kato, K. Shibayama, and Y. Arakawa. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother***.** 2008. **52**:2890-7.

Kong, F., S. Gowan, D. Martin, G. James, and G. L. Gilbert. Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol***.** 2002. **40**:216-26.

Konto-Ghiorghi, Y., E. Mairey, A. Mallet, G. Dumenil, E. Caliot, P. Trieu-Cuot, and S. Dramsi. Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog.* 2009. **5**:e1000422.

Kreikemeyer, B., K. S. McIver, and A. Podbielski. Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. *Trends Microbiol***.** 2003. **11**:224-32.

Lamy, M. C., M. Zouine, J. Fert, M. Vergassola, E. Couve, E. Pellegrini, P. Glaser, F. Kunst, T. Msadek, P. Trieu-Cuot, and C. Poyart. CovS/CovR of group B *streptococcus*: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol Microbiol***.** 2004. **54**:1250-68.

Lancefield, R. C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med.* 1933. **57**:571-595.

Landy, A., and W. Ross. Viral integration and excision: structure of the lambda att sites. *Science*. 1977. **197**:1147-60.

Lang, S., and M. Palmer. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. *J Biol Chem***.** 2003. **278**:38167-73.

Larppanichpoonphol, P., and C. Watanakunakorn. Group B streptococcal bacteremia in nonpregnant adults at a community teaching hospital. *South Med J***.** 2001. **94**:1206-11.

Laurent, T. C., and J. R. Fraser. Hyaluronan. *FASEB J*. 1992. **6**:2397-404.

Lee, N. Y., J. J. Yan, J. J. Wu, H. C. Lee, K. H. Liu, and W. C. Ko. Group B streptococcal soft tissue infections in non-pregnant adults. *Clin Microbiol Infect***.** 2005. **11**:577-9.

Lee C. Y., and J. J. Iandolo. Integration of staphylococcal phage L54a occurs by site-specific recombination: Structural analysis of the attachment sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. **83**:5474-5478.

Lefebvre, N., E. Forestier, M. Mohseni-Zadeh, V. Remy, O. Lesens, C. Kuhnert, V. Poindron, P. Riegel, Y. Piemont, D. Christmann, and Y. Hansmann. [Invasive *Streptococcus agalactiae* infections in non-pregnant adults]. *Med Mal Infect***.** 2007. **37**:796-801.

Lerner, P. I., K. V. Gopalakrishna, E. Wolinsky, M. C. McHenry, J. S. Tan, and M. Rosenthal. Group B *streptococcus* (*S. agalactiae*) bacteremia in adults: analysis of 32 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1977. **56**:457-73.

Letellier, L., P. Boulanger, L. Plancon, P. Jacquot, and M. Santamaria. Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. *Front Biosci***.** 2004. **9**:1228-339.

Levesque, C., M. Duplessis, J. Labonte, S. Labrie, C. Fremaux, D. Tremblay, and S. Moineau. Genomic organization and molecular analysis of virulent bacteriophage 2972 infecting an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strain. *Appl Environ Microbiol.* 2005. **71**:4057-68.

Li, S., and M. J. Jedrzejas. Hyaluronan binding and degradation by *Streptococcus agalactiae* hyaluronate lyase. *J Biol Chem***.** 2001. **276**:41407-16.

Liddy, H., and R. Holliman. Group B *Streptococcus* highly resistant to gentamicin. *J Antimicrob Chemother***.** 2002. **50**:142-3.

Lim, C. T., M. K. Thong, N. Parasakthi, and Y. F. Ngeow. Group B *streptococcus*: maternal carriage rate and early neonatal septicaemia. *Ann Acad Med Singapore***.** 1997. **26**:421-5.

Lin, B., S. K. Hollingshead, J. E. Coligan, M. L. Egan, J. R. Baker, and D. G. Pritchard. Cloning and expression of the gene for group B streptococcal hyaluronate lyase. *J Biol Chem***.** 1994. **269**:30113-6.

Lin, F. Y., P. H. Azimi, L. E. Weisman, J. B. Philips, 3rd, J. Regan, P. Clark, G. G. Rhoads, J. Clemens, J. Troendle, E. Pratt, R. A. Brenner, and V. Gill. Antibiotic susceptibility profiles for group B streptococci isolated from neonates, 1995-1998. *Clin Infect Dis***.** 2000. **31**:76-9.

Lin, F. Y., A. Whiting, E. Adderson, S. Takahashi, D. M. Dunn, R. Weiss, P. H. Azimi, J. B. Philips, 3rd, L. E. Weisman, J. Regan, P. Clark, G. G. Rhoads, C. E. Frasch, J. Troendle, P. Moyer, and J. F. Bohnsack. Phylogenetic lineages of invasive and colonizing strains of serotype III group B Streptococci from neonates: a multicenter prospective study. *J Clin Microbiol***.** 2006. **44**:1257-61.

Lin, W. J., D. Walthers, J. E. Connelly, K. Burnside, K. A. Jewell, L. J. Kenney, and L. Rajagopal. Threonine phosphorylation prevents promoter DNA binding of the Group B *Streptococcus* response regulator CovR. *Mol Microbiol***.** 2009. **71**:1477-95.

Lindahl, G., M. Stalhammar-Carlemalm, and T. Areschoug. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin Microbiol Rev***.** 2005. **18**:102-27.

Lindahl, U., and M. Hook. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Annu Rev Biochem***.** 1978. **47**:385-417.

Lischke, J. H., and P. H. McCreight. Maternal group B streptococcal vertebral osteomyelitis: an unusual complication of vaginal delivery. *Obstet Gynecol***.** 1990. **76**:489-91.

Liu, G. Y., K. S. Doran, T. Lawrence, N. Turkson, M. Puliti, L. Tissi, and V. Nizet. Sword and shield: linked group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc Natl Acad Sci U S A***.** 2004. **101**:14491-6.

Liu, J. W., J. J. Wu, W. C. Ko, and Y. C. Chuang. Clinical characteristics and antimicrobial susceptibility of invasive group B streptococcal infections in nonpregnant adults in Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 1997. **96**:628-33.

Lloyd, D. J., and T. M. Reid. Group B streptococcal infection in the newborn. Criteria for early detection and treatment. *Acta Paediatr Scand***.** 1976. **65**:585-91.

Luan, S. L., M. Granlund, M. Sellin, T. Lagergard, B. G. Spratt, and M. Norgren. Multilocus sequence typing of Swedish invasive group B *streptococcus* isolates indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching. *J Clin Microbiol***.** 2005. **43**:3727-33.

Madureira, P., M. Baptista, M. Vieira, V. Magalhaes, A. Camelo, L. Oliveira, A. Ribeiro, D. Tavares, P. Trieu-Cuot, M. Vilanova, and P. Ferreira. *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein. *J Immunol***.** 2007. **178**:1379-87.

Maisey, H. C., K. S. Doran, and V. Nizet. Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Expert Rev Mol Med***.** 2008. **10**:e27.

Manning, S., P. Tallman, and B. Foxman. Prevalence and co-colonization with group b *streptococcus* (Gbs) Among heterosexual college couples. *Ann Epidemiol***.** 2000. **10**:472.

Manning, S. D. Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*). *Front Biosci.* 2003. **8**:s1-18.

Manning, S. D., K. Neighbors, P. A. Tallman, B. Gillespie, C. F. Marrs, S. M. Borchardt, C. J. Baker, M. D. Pearlman, and B. Foxman. Prevalence of group B *streptococcus* colonization and potential for transmission by casual contact in healthy young men and women. *Clin Infect Dis***.** 2004. **39**:380-8.

Manning, S. D., A. C. Springman, E. Lehotzky, M. A. Lewis, T. S. Whittam, and H. D. Davies. Multilocus sequence types associated with neonatal group B streptococcal sepsis and meningitis in Canada. *J Clin Microbiol***.** 2009. **47**:1143-8.

Manning, S. D., P. Tallman, C. J. Baker, B. Gillespie, C. F. Marrs, and B. Foxman. Determinants of co-colonization with group B *streptococcus* among heterosexual college couples. *Epidemiology***.** 2002. **13**:533-9.

Martins, E. R., M. A. Pessanha, M. Ramirez, and J. Melo-Cristino. Analysis of group B streptococcal isolates from infants and pregnant women in Portugal revealing two lineages with enhanced invasiveness. *J Clin Microbiol***.** 2007. **45**:3224-9.

Mason, R. E., and W. E. Allen. Characteristics of *Staphylococcus aureus* associated with lysogenic conversion to loss of beta-hemolysin production. *Can J Microbiol.* 1975. **21**:1113-6.

Matsubara, K., and G. Yamamoto. Invasive group B streptococcal infections in a tertiary care hospital between 1998 and 2007 in Japan. *Int J Infect Dis.* 2009. **13**:679-84.

Mayon-White, R. T. The incidence of GBS disease in neonates in different countries. *Antibiot Chemother*. 1985. **35**:17-27.

McCracken, G. H., Jr. Group B streptococci: the new challenge in neonatal infections. *J Pediatr*. 1973. **82**:703-6.

McKenna, D. S., and J. D. Iams. Group B streptococcal infections. *Semin Perinatol***.** 1998. **22**:267-76.

Mertz, K. R., L. M. Baddour, J. L. Bell, and J. L. Gwin. Breast cellulitis following breast conservation therapy: a novel complication of medical progress. *Clin Infect Dis***.** 1998. **26**:481-6.

Meyn, L. A., D. M. Moore, S. L. Hillier, and M. A. Krohn. Association of sexual activity with colonization and vaginal acquisition of group B *Streptococcus* in nonpregnant women. *Am J Epidemiol***.** 2002. **155**:949-57.

Michel, J. L., L. C. Madoff, D. E. Kling, D. L. Kasper, and F. M. Ausubel. Cloned alpha and beta C-protein antigens of group B streptococci elicit protective immunity. *Infect Immun***.** 1991. **59**:2023-8.

Michon, F., J. R. Brisson, A. Dell, D. L. Kasper, and H. J. Jennings. Multiantennary group-specific polysaccharide of group B *Streptococcus*. *Biochemistry*. 1988. **27**:5341-51.

Minkoff, H. L., M. F. Sierra, G. F. Pringle, and R. H. Schwarz. Vaginal colonization with Group B beta-hemolytic *streptococcus* as a risk factor for post-cesarean section febrile morbidity. *Am J Obstet Gynecol***.** 1982. **142**:992-5.

Moak, M., and I. J. Molineux. Peptidoglycan hydrolytic activities associated with bacteriophage virions. *Mol Microbiol***.** 2004. **51**:1169-83.

Moller, M., A. C. Thomsen, K. Borch, K. Dinesen, and M. Zdravkovic. Rupture of fetal membranes and premature delivery associated with group B streptococci in urine of pregnant women. *Lancet*. 1984. 2:69-70.

Morrow, D. L., J. B. Kline, S. D. Douglas, and R. A. Polin. Rapid detection of group B streptococcal antigen by monoclonal antibody sandwich enzyme assay. *J Clin Microbiol.* 1984. **19**:457-9.

Motlova, J., L. Strakova, P. Urbaskova, P. Sak, and T. Sever. Vaginal & rectal carriage of *Streptococcus agalactiae* in the Czech Republic: incidence, serotypes distribution & susceptibility to antibiotics. *Indian J Med Res.* 2004. 119 Suppl:84-7.

Moyo, S. R., J. A. Maeland, and K. Bergh. Typing of human isolates of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus, GBS) strains from Zimbabwe. *J Med Microbiol***.** 2002. **51**:595-600.

Munoz, P., A. Llancaqueo, M. Rodriguez-Creixems, T. Pelaez, L. Martin, and E. Bouza. Group B *streptococcus* bacteremia in nonpregnant adults. *Arch Intern Med***.** 1997. **157**:213-6.

Murdoch, D. R., and L. B. Reller. Antimicrobial susceptibilities of group B streptococci isolated from patients with invasive disease: 10-year perspective. *Antimicrob Agents Chemother***.** 2001. **45**:3623-4.

Musser, J. M., S. J. Mattingly, R. Quentin, A. Goudeau, and R. K. Selander. Identification of a high-virulence clone of type III *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) causing invasive neonatal disease. *Proc Natl Acad Sci U S A***.** 1989. **86**:4731-5.

Nakagawa, I., K. Kurokawa, A. Yamashita, M. Nakata, Y. Tomiyasu, N. Okahashi, S. Kawabata, K. Yamazaki, T. Shiba, T. Yasunaga, H. Hayashi, M. Hattori, and S. Hamada. Genome sequence of an M3 strain of *Streptococcus pyogenes* reveals a large-scale genomic rearrangement in invasive strains and new insights into phage evolution. *Genome Res.* 2003. **13**:1042-55.

Nizet, V., R. L. Gibson, E. Y. Chi, P. E. Framson, M. Hulse, and C. E. Rubens. Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect Immun***.** 1996. **64**:3818-26.

Nocard, M., and R. Mollereau. Sur une mammite contagieuse des vaches laitieres. *Ann Inst Pasteur***.** 1887. **1**:109.

Noya, F. J., M. A. Rench, T. G. Metzger, G. Colman, J. Naidoo, and C. J. Baker. Unusual occurrence of an epidemic of type Ib/c group B streptococcal sepsis in a neonatal intensive care unit. *J Infect Dis***.** 1987. **155**:1135-44.

O'Brien, A. D., J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes, H. W. Smith, and S. B. Formal. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science*. 1984. **226**:694-6.

Ohlsson, A., and V. S. Shah. Intrapartum antibiotics for known maternal Group B streptococcal colonization. *Cochrane Database Syst Rev*, 2009:CD007467.

Oliveira, I. C., M. C. De Mattos, M. F. Areal, B. T. Ferreira-Carvalho, A. M. Figuiredo, and L. C. Benchetrit. Pulsed-field gel electrophoresis of human group B streptococci isolated in Brazil. *J Chemother***.** 2005. **17**:258-63.

Opal, S. M., A. Cross, M. Palmer, and R. Almazan. Group B streptococcal sepsis in adults and infants. Contrasts and comparisons. *Arch Intern Med.* 1988. **148**:641-5.

Oppenheim, A. B., O. Kobiler, J. Stavans, D. L. Court, and S. Adhya. Switches in bacteriophage lambda development. *Annu Rev Genet.* 2005. **39**:409-29.

Overman, S. B., D. D. Eley, B. E. Jacobs, and J. A. Ribes. Evaluation of methods to increase the sensitivity and timeliness of detection of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. *J Clin Microbiol*. 2002. **40**:4329-31.

Paredes, A., P. Wong, E. O. Mason, Jr., L. H. Taber, and F. F. Barrett. Nosocomial transmission of group B Streptococci in a newborn nursery. *Pediatrics*. 1977. **59**:679-82.

Parmelle, C. E., P.H.Carr, and F. E. Nelson. Electron microscope studies of bacteriophage active against *Streptococcus lactis*. *J Bacteriol.* 1948. **57**:391-397.

Pedulla, M. L., M. E. Ford, J. M. Houtz, T. Karthikeyan, C. Wadsworth, J. A. Lewis, D. Jacobs-Sera, J. Falbo, J. Gross, N. R. Pannunzio, W. Brucker, V. Kumar, J. Kandasamy, L. Keenan, S. Bardarov, J. Kriakov, J. G. Lawrence, W. R. Jacobs, Jr., R. W. Hendrix, and G. F. Hatfull. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell.* 2003. **113**:171-82.

Perovic, O., H. H. Crewe-Brown, M. Khoosal, and A. S. Karstaedt. Invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999. **18**:362-4.

Perry, J. D., M. Oliver, A. Nicholson, J. Wright, and F. K. Gould. Evaluation of a new chromogenic agar medium for isolation and identification of Group B streptococci. *Lett Appl Microbiol.* 2006. **43**:615-8.

Persson, E., S. Berg, L. Bevanger, K. Bergh, R. Valso-Lyng, and B. Trollfors. Characterisation of invasive group B streptococci based on investigation of surface proteins and genes encoding surface proteins. *Clin Microbiol Infect.* 2008. **14**:66-73.

Peschel, A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* 2002. **10**:179-86.

Pettersson, K. Perinatal infection with Group B streptococci. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2007. **12**:193-7.

Phares, C. R., R. Lynfield, M. M. Farley, J. Mohle-Boetani, L. H. Harrison, S. Petit, A. S. Craig, W. Schaffner, S. M. Zansky, K. Gershman, K. R. Stefonek, B. A. Albanese, E. R. Zell, A. Schuchat, and S. J. Schrag. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA.* 2008. **299**:2056-65.

Podbielski, A., O. Blankenstein, and R. Lutticken. Molecular characterization of the *cfb* gene encoding group B streptococcal CAMP-factor. *Med Microbiol Immunol.* 1994. **183**:239-56.

Poyart, C., M. C. Lamy, C. Boumaila, F. Fiedler, and P. Trieu-Cuot. Regulation of D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis in *Streptococcus agalactiae* involves a novel two-component regulatory system. *J Bacteriol.* 2001a. **183**:6324-34.

Poyart, C., E. Pellegrini, O. Gaillot, C. Boumaila, M. Baptista, and P. Trieu-Cuot. Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun.* 2001b. **69**:5098-106.

Poyart, C., E. Pellegrini, M. Marceau, M. Baptista, F. Jaubert, M. C. Lamy, and P. Trieu-Cuot. Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Mol Microbiol.* 2003. **49**:1615-25.

Pritchard, D. G., B. Lin, T. R. Willingham, and J. R. Baker. Characterization of the group B streptococcal hyaluronate lyase. *Arch Biochem Biophys.* 1994. **315**:431-7.

Quach, D., N. M. van Sorge, S. A. Kristian, J. D. Bryan, D. W. Shelver, and K. S. Doran. The CiaR response regulator in group B *Streptococcus* promotes intracellular survival and resistance to innate immune defenses. *J Bacteriol.* 2009. **191**:2023-32.

Quentin, R., H. Huet, F. S. Wang, P. Geslin, A. Goudeau, and R. K. Selander. Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by multilocus enzyme genotype and serotype: identification of multiple virulent clone families that cause invasive neonatal disease. *J Clin Microbiol.* 1995. **33**:2576-81.

Quiberoni, A., J. I. Stiefel, and J. A. Reinheimer. Characterization of phage receptors in *Streptococcus thermophilus* using purified cell walls obtained by a simple protocol. *J Appl Microbiol.* 2000. **89**:1059-65.

Radtke, A., B. A. Lindstedt, J. E. Afset, and K. Bergh. Rapid multiple-locus variant-repeat assay (MLVA) for genotyping of *Streptococcus agalactiae*. *J Clin Microbiol.* 2010. **48**:2502-8.

Raisanen, L., C. Draing, M. Pfitzenmaier, K. Schubert, T. Jaakonsaari, S. von Aulock, T. Hartung, and T. Alatossava. Molecular interaction between lipoteichoic acids and *Lactobacillus delbrueckii*

phages depends on D-alanyl and alpha-glucose substitution of poly (glycerophosphate) backbones. *J Bacteriol.* 2007. **189**:4135-40.

Raja, N. S. Microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Malaysia: a retrospective study of 194 cases. *J Microbiol Immunol Infect***.** 2007. **40**:39-44.

Rajagopal, L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiol*. 2009. **4**:201-21.

Rajagopal, L., A. Clancy, and C. E. Rubens. A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. *J Biol Chem***.** 2003. **278**:14429-41.

Rajagopal, L., A. Vo, A. Silvestroni, and C. E. Rubens. Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic-type kinase in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol.* 2005. **56**:1329-46.

Rajagopal, L., A. Vo, A. Silvestroni, and C. E. Rubens. Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signalling mechanisms in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol.* 2006. **62**:941-57.

Rantz, L. A., and W. M. M. Kirby. Hemolytic *streptococcus* bacteremia: report of thirteen cases with special reference to serologic groups of etiologic organisms. *N Engl J Med***.** 1942. **227**:730-733.

Reich, H. L., G. H. Crawford, M. T. Pelle, and W. D. James. Group B streptococcal toxic shock-like syndrome. *Arch Dermatol***.** 2004. **140**:163-6.

Riefler, J., 3rd, A. Molavi, D. Schwartz, and M. DiNubile. Necrotizing fasciitis in adults due to group B *streptococcus*. Report of a case and review of the literature. *Arch Intern Med***.** 1988. **148**:727-9.

Ring, A., J. S. Braun, V. Nizet, W. Stremmel, and J. L. Shenep. Group B streptococcal beta-hemolysin induces nitric oxide production in murine macrophages. *J Infect Dis***.** 2000. **182**:150-7.

Ring, A., J. S. Braun, J. Pohl, V. Nizet, W. Stremmel, and J. L. Shenep. Group B streptococcal beta-hemolysin induces mortality and liver injury in experimental sepsis. *J Infect Dis***.** 2002. **185**:1745-53.

Rolland, K., C. Marois, V. Siquier, B. Cattier, and R. Quentin. Genetic features of *Streptococcus agalactiae* strains causing severe neonatal infections, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis and *hylB* gene analysis. *J Clin Microbiol***.** 1999. **37**:1892-8.

Rolland, K., L. Mereghetti, S. Watt, S. Chatellier, and R. Quentin. tRNA gene clusters at the 3' end of rRNA operons are specific to virulent subgroups of *Streptococcus agalactiae* strains, as demonstrated by molecular differential analysis at the population level. *Microbiology***.** 2002. **148**:1493-9.

Rosa-Fraile, M., J. Rodriguez-Granger, M. Cueto-Lopez, A. Sampedro, E. B. Gaye, J. M. Haro, and A. Andreu. Use of Granada medium to detect group B streptococcal colonization in pregnant women. *J Clin Microbiol***.** 1999. **37**:2674-7.

Rosenau, A., K. Martins, S. Amor, F. Gannier, P. Lanotte, N. van der Mee-Marquet, L. Mereghetti, and R. Quentin. Evaluation of the ability of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from genital and neonatal specimens to bind to human fibrinogen and correlation with characteristics of the *fbsA* and *fbsB* genes. *Infect Immun***.** 2007. **75**:1310-7.

Rosini, R., C. D. Rinaudo, M. Soriani, P. Lauer, M. Mora, D. Maione, A. Taddei, I. Santi, C. Ghezzo, C. Brettoni, S. Buccato, I. Margarit, G. Grandi, and J. L. Telford. Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol***.** 2006. **61**:126-41.

Rouse, D. J., W. W. Andrews, F. Y. Lin, C. W. Mott, J. C. Ware, and J. B. Philips, 3rd. Antibiotic susceptibility profile of group B *streptococcus* acquired vertically. *Obstet Gynecol***.** 1998. **92**:931-4.

Rubens, C. E., M. R. Wessels, L. M. Heggen, and D. L. Kasper. Transposon mutagenesis of type III group B *Streptococcus*: correlation of capsule expression with virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A***.** 1987. **84**:7208-12.

Russell, H., N. L. Norcross, and D. E. Kahn. Isolation and characterization of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage. *J Gen Virol***.** 1969. **5**:315-7.

Sader, H. S., R. J. Hollis, and M. A. Pfaller. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. *Clin Lab Med***.** 1995. **15**:407-31.

Samen, U. M., B. J. Eikmanns, and D. J. Reinscheid. The transcriptional regulator RovS controls the attachment of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells and the expression of virulence genes. *Infect Immun***.** 2006. **74**:5625-35.

Sanger, F., G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, C. A. Fiddes, C. A. Hutchison, P. M. Slocombe, and M. Smith. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. 1977. **265**:687-95.

Santi, I., M. Scarselli, M. Mariani, A. Pezzicoli, V. Masignani, A. Taddei, G. Grandi, J. L. Telford, and M. Soriani. BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B *Streptococcus* survival in human blood. *Mol Microbiol***.** 2007. **63**:754-67.

Savoia, D., C. Gottimer, C. Crocilla, and M. Zucca. *Streptococcus agalactiae* in pregnant women: phenotypic and genotypic characters. *J Infect***.** 2008. **56**:120-5.

Schicklmaier, P., and H. Schmieger. Frequency of generalized transducing phages in natural isolates of the *Salmonella typhimurium* complex. *Appl Environ Microbiol***.** 1995. **61**:1637-40.

Schoening, T. E., J. Wagner, and M. Arvand. Prevalence of erythromycin and clindamycin resistance among *Streptococcus agalactiae* isolates in Germany. *Clin Microbiol Infect***.** 2005. **11**:579-82.

Schrag, S. J., S. Zywicki, M. M. Farley, A. L. Reingold, L. H. Harrison, L. B. Lefkowitz, J. L. Hadler, R. Danila, P. R. Cieslak, and A. Schuchat. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med***.** 2000. **342**:15-20.

Schubert, A., K. Zakikhany, M. Schreiner, R. Frank, B. Spellerberg, B. J. Eikmanns, and D. J. Reinscheid. A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. *Mol Microbiol***.** 2002. **46**:557-69.

Schuchat, A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev***.** 1998. **11**:497-513.

Schugk, J., V. P. Harjola, A. Sivonen, J. Vuopio-Varkila, and M. Valtonen. A clinical study of beta-haemolytic groups A, B, C and G streptococcal bacteremia in adults over an 8-year period. *Scand J Infect Dis*. 1997. **29**:233-8.

Schwartz, B., A. Schuchat, M. J. Oxtoby, S. L. Cochi, A. Hightower, and C. V. Broome. Invasive group B streptococcal disease in adults. A population-based study in metropolitan Atlanta. *JAMA***.** 1991. **266**:1112-4.

Seepersaud, R., S. B. Hanniffy, P. Mayne, P. Sizer, R. Le Page, and J. M. Wells. Characterization of a novel leucine-rich repeat protein antigen from group B streptococci that elicits protective immunity. *Infect Immun***.** 2005. **73**:1671-83.

Seifert, K. N., E. E. Adderson, A. A. Whiting, J. F. Bohnsack, P. J. Crowley, and L. J. Brady. A unique serine-rich repeat protein (Srr-2) and novel surface antigen (epsilon) associated with a virulent lineage of serotype III *Streptococcus agalactiae*. *Microbiology.* 2006. **152**:1029-40.

Semel, J. D., and H. Goldin. Association of athlete's foot with cellulitis of the lower extremities: diagnostic value of bacterial cultures of ipsilateral interdigital space samples. *Clin Infect Dis*. 1996. **23**:1162-4.

Sendi, P., P. Graber, L. Johansson, A. Norrby-Teglund, and W. Zimmerli. *Streptococcus agalactiae* in relapsing cellulitis. *Clin Infect Dis*. 2007. **44**:1141-2.

Sendi, P., L. Johansson, and A. Norrby-Teglund. Invasive group B Streptococcal disease in non-pregnant adults : a review with emphasis on skin and soft-tissue infections. *Infection*. 2008. **36**:100-11.

Sexton, D. J., S. G. Rockson, R. E. Hempling, and C. W. Cathey. Pregnancy-associated group B streptococcal endocarditis: a report of two fatal cases. *Obstet Gynecol*. 1985. **66**:44S-47S.

Shelver, D., L. Rajagopal, T. O. Harris, and C. E. Rubens. MtaR, a regulator of methionine transport, is critical for survival of group B *streptococcus* in vivo. *J Bacteriol.* 2003. **185**:6592-9.

Shet, A., and P. Ferrieri. Neonatal & maternal group B streptococcal infections: a comprehensive review. *Indian J Med Res.* 2004. **120**:141-50.

Shimizu-Kadota, M., M. Kiwaki, S. Sawaki, Y. Shirasawa, H. Shibahara-Sone, and T. Sako. Insertion of bacteriophage phiFSW into the chromosome of Lactobacillus casei strain Shirota (S-1): characterization of the attachment sites and the integrase gene. *Gene*. 2000. **249**:127-34.

Siboo, I. R., H. F. Chambers, and P. M. Sullam. Role of SraP, a Serine-Rich Surface Protein of *Staphylococcus aureus*, in binding to human platelets. *Infect Immun*. 2005. **73**:2273-80.

Sinha, A., T. A. Lieu, L. C. Paoletti, M. C. Weinstein, and R. Platt. The projected health benefits of maternal group B streptococcal vaccination in the era of chemoprophylaxis. *Vaccine*. 2005. **23**:3187-95.

Skjaervold, N. K., K. Bergh, and L. Bevanger. Distribution of PFGE types of invasive Norwegian group B streptococci in relation to serotypes. *Indian J Med Res.* 2004. 119 Suppl:201-4.

Skoff, T. H., M. M. Farley, S. Petit, A. S. Craig, W. Schaffner, K. Gershman, L. H. Harrison, R. Lynfield, J. Mohle-Boetani, S. Zansky, B. A. Albanese, K. Stefonek, E. R. Zell, D. Jackson, T. Thompson, and S. J. Schrag. Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. *Clin Infect Dis*. 2009. **49**:85-92.

Skogberg, K., H. Simonen, O. V. Renkonen, and V. V. Valtonen. Beta-haemolytic group A, B, C and G streptococcal septicaemia: a clinical study. *Scand J Infect Dis*. 1988. **20**:119-25.

Speer, B. S., N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev.* 1992. **5**:387-99.

Spellerberg, B. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes Infect.* 2000. **2**:1733-42.

Spellerberg, B., S. Martin, C. Brandt, and R. Lutticken. The cyl genes of *Streptococcus agalactiae* are involved in the production of pigment. *FEMS Microbiol Lett*. 2000. **188**:125-8.

Spellerberg, B., E. Rozdzinski, S. Martin, J. Weber-Heynemann, and R. Lutticken. rgf encodes a novel two-component signal transduction system of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun*. 2002. **70**:2434-40.

Spellerberg, B., E. Rozdzinski, S. Martin, J. Weber-Heynemann, N. Schnitzler, R. Lutticken, and A. Podbielski. Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect Immun*. 1999. **67**:871-8.

Springman, A. C., D. W. Lacher, G. Wu, N. Milton, T. S. Whittam, H. D. Davies, and S. D. Manning. Selection, recombination, and virulence gene diversity among group B streptococcal genotypes. *J Bacteriol*. 2009. **191**:5419-27.

Stringer, J. The development of a phage-typing system for group-B streptococci. *J Med Microbiol*. 1980. **13**:133-43.

Sumby, P., S. F. Porcella, A. G. Madrigal, K. D. Barbian, K. Virtaneva, S. M. Ricklefs, D. E. Sturdevant, M. R. Graham, J. Vuopio-Varkila, N. P. Hoe, and J. M. Musser. Evolutionary origin and emergence of a highly successful clone of serotype M1 group a *Streptococcus* involved multiple horizontal gene transfer events. *J Infect Dis*. 2005. **192**:771-82.

Sun, Y., F. Kong, Z. Zhao, and G. L. Gilbert. Comparison of a 3-set genotyping system with multilocus sequence typing for *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*). *J Clin Microbiol*. 2005. **43**:4704-7.

Suttle, C.A. Viruses in the sea. *Nature.* 2005. **437**:356–361.

Suttle, C.A. Marine viruses-major players in the global ecosystem. *Nature Rev Microbiol*. 2007. 5: 801–812.

Sutton, G. P., L. R. Smirz, D. H. Clark, and J. E. Bennett. Group B streptococcal necrotizing fasciitis arising from an episiotomy. *Obstet Gynecol.* 1985. **66**:733-6.

Takahashi, S., E. E. Adderson, Y. Nagano, N. Nagano, M. R. Briesacher, and J. F. Bohnsack. Identification of a highly encapsulated, genetically related group of invasive type III group B streptococci. *J Infect Dis.* 1998. **177**:1116-9.

Takahashi, S., Y. Nagano, N. Nagano, O. Hayashi, F. Taguchi, and Y. Okuwaki. Role of C5a-ase in group B streptococcal resistance to opsonophagocytic killing. *Infect Immun*. 1995. **63**:4764-9.

Takamatsu, D., B. A. Bensing, H. Cheng, G. A. Jarvis, I. R. Siboo, J. A. Lopez, J. M. Griffiss, and P. M. Sullam. Binding of the *Streptococcus gordonii* surface glycoproteins GspB and Hsa to specific carbohydrate structures on platelet membrane glycoprotein Ibalpha. *Mol Microbiol*. 2005. **58**:380-92.

Tang, W. M., P. L. Ho, W. P. Yau, J. W. Wong, and D. K. Yip. Report of 2 fatal cases of adult necrotizing fasciitis and toxic shock syndrome caused by *Streptococcus agalactiae*. *Clin Infect Dis*. 2000. **31**:E15-7.

Tapsall, J. W. Pigment production by Lancefield-group-B streptococci (*Streptococcus agalactiae*). *J Med Microbiol***.** 1986. **21**:75-81.

Tazi, A., A. Doloy, H. Reglier-Poupet, M. E. Hemet, J. Raymond, and C. Poyart. [Evaluation of the new chromogenic medium StrepB Select for screening of group B *Streptococcus* in pregnant women]. *Pathol Biol (Paris)*. 2009. **57**:225-8.

Teixeira, L. A., A. M. Figueiredo, B. T. Ferreira, V. M. Alves, P. E. Nagao, C. S. Alviano, J. Angluster, F. C. Silva-Filho, and L. C. Benchetrit. Sialic acid content and surface hydrophobicity of group B streptococci. *Epidemiol Infect*. 1993. **110**:87-94.

Tenenbaum, T., B. Spellerberg, R. Adam, M. Vogel, K. S. Kim, and H. Schroten. *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. *Microbes Infect*. 2007. **9**:714-20.

Tettelin, H., V. Masignani, M. J. Cieslewicz, C. Donati, D. Medini, N. L. Ward, S. V. Angiuoli, J. Crabtree, A. L. Jones, A. S. Durkin, R. T. Deboy, T. M. Davidsen, M. Mora, M. Scarselli, I. Margarit y Ros, J. D. Peterson, C. R. Hauser, J. P. Sundaram, W. C. Nelson, R. Madupu, L. M. Brinkac, R. J. Dodson, M. J. Rosovitz, S. A. Sullivan, S. C. Daugherty, D. H. Haft, J. Selengut, M. L. Gwinn, L. Zhou, N. Zafar, H. Khouri, D. Radune, G. Dimitrov, K. Watkins, K. J. O'Connor, S. Smith, T. R. Utterback, O. White, C. E. Rubens, G. Grandi, L. C. Madoff, D. L. Kasper, J. L. Telford, M. R. Wessels, R. Rappuoli, and C. M. Fraser. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci U S A***.** 2005. **102**:13950-5.

Tettelin, H., V. Masignani, M. J. Cieslewicz, J. A. Eisen, S. Peterson, M. R. Wessels, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, I. Margarit, T. D. Read, L. C. Madoff, A. M. Wolf, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. T. DeBoy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, M. R. Lewis, D. Radune, N. B. Fedorova, D. Scanlan, H. Khouri, S. Mulligan, H. A. Carty, R. T. Cline, S. E. Van Aken, J. Gill, M. Scarselli, M. Mora, E. T. Iacobini, C. Brettoni, G. Galli, M. Mariani, F. Vegni, D. Maione, D. Rinaudo, R. Rappuoli, J. L. Telford, D. L. Kasper, G. Grandi, and C. M. Fraser. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. **99**:12391-6.

Thomsen, A. C., L. Morup, and K. B. Hansen. Antibiotic elimination of group-B streptococci in urine in prevention of preterm labour. *Lancet*. 1987. **i**:591-3.

Tran, H. L., F. Fiedler, D. A. Hodgson, and S. Kathariou. Transposon-induced mutations in two loci of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a result in phage resistance and lack of N-acetylglucosamine in the teichoic acid of the cell wall. *Appl Environ Microbiol*. 1999. **65**:4793-8.

Trijbels-Smeulders, M. A., J. L. Kimpen, L. A. Kollee, J. Bakkers, W. Melchers, L. Spanjaard, W. J. Wannet, and M. A. Hoogkamp-Korstanje. Serotypes, genotypes, and antibiotic susceptibility profiles of group B streptococci causing neonatal sepsis and meningitis before and after introduction of antibiotic prophylaxis. *Pediatr Infect Dis J*. 2006. **25**:945-8.

Trivalle, C., E. Martin, P. Martel, B. Jacque, J. F. Menard, and J. F. Lemeland. Group B streptococcal bacteraemia in the elderly. *J Med Microbiol*. 1998. **47**:649-52.

Tsolia, M., M. Psoma, S. Gavrili, V. Petrochilou, S. Michalas, N. Legakis, and T. Karpathios. Group B *streptococcus* colonization of Greek pregnant women and neonates: prevalence, risk factors and serotypes. *Clin Microbiol Infect*. 2003. **9**:832-8.

Twort, F. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet.* 1915. **ii**:1241-1243.

Tyrrell, G. J., L. D. Senzilet, J. S. Spika, D. A. Kertesz, M. Alagaratnam, M. Lovgren, and J. A. Talbot. Invasive disease due to group B streptococcal infection in adults: results from a Canadian, population-based, active laboratory surveillance study--1996. Sentinel Health Unit Surveillance System Site Coordinators. *J Infect Dis*. 2000. **182**:168-73.

Uh, Y., I. H. Jang, G. Y. Hwang, K. J. Yoon, and W. Song. Emerging erythromycin resistance among group B streptococci in Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001. **20**:52-4.

Ulrich, L. E., E. V. Koonin, and I. B. Zhulin. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* 2005. **13**:52-6.

van der Mee-Marquet, N., A. S. Domelier, L. Mereghetti, P. Lanotte, A. Rosenau, W. van Leeuwen, and R. Quentin. Prophagic DNA fragments in *Streptococcus agalactiae* strains and association with neonatal meningitis. *J Clin Microbiol*. 2006. **44**:1049-58.

van der Mee-Marquet, N., L. Fourny, L. Arnault, A. S. Domelier, M. Salloum, M. F. Lartigue, and R. Quentin. Molecular characterization of human-colonizing *Streptococcus agalactiae* strains isolated from throat, skin, anal margin, and genital body sites. *J Clin Microbiol*. 2008. **46**:2906-11.

Verghese, A., K. Mireault, and R. D. Arbeit. Group B streptococcal bacteremia in men. *Rev Infect Dis*. 1986. **8**:912-7.

Vojtek, I., Z. A. Pirzada, B. Henriques-Normark, M. Mastny, R. P. Janapatla, and E. Charpentier. Lysogenic transfer of group A *Streptococcus* superantigen gene among Streptococci. *J Infect Dis*. 2008. **197**:225-34.

Wagner, P. L., and M. K. Waldor. Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect Immun*. 2002. **70**:3985-93.

Waldemarsson, J., T. Areschoug, G. Lindahl, and E. Johnsson. The streptococcal Blr and Slr proteins define a family of surface proteins with leucine-rich repeats: camouflaging by other surface structures. *J Bacteriol*. 2006. **188**:378-88.

Waldor, M. K., and J. J. Mekalanos. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*. 1996. **272**:1910-4.

Wang, T. K., A. M. Fung, P. C. Woo, K. Y. Yuen, and S. S. Wong. *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) bacteraemia in nonpregnant adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002. **21**:140-2.

Welsh, J., and M. McClelland. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*. 1990. **18**:7213-8.

Wendlinger, G., M. J. Loessner, and S. Scherer. Bacteriophage receptors on *Listeria monocytogenes* cells are the N-acetylglucosamine and rhamnose substituents of teichoic acids or the peptidoglycan itself. *Microbiology.* 1996. **142 (Pt 4)**:985-92.

Wessels, M. R., C. E. Rubens, V. J. Benedi, and D. L. Kasper. Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989. **86**:8983-7.

Wiles, K. G., P. Panizzi, H. K. Kroh, and P. E. Bock. Skizzle is a novel plasminogen- and plasmin-binding protein from *Streptococcus agalactiae* that targets proteins of human fibrinolysis to promote plasmin generation. *J Biol Chem*. 2010. **285**:21153-64.

Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*. 1990. **18**:6531-5.

Wong, C. H., A. Kurup, and K. C. Tan. Group B *Streptococcus* necrotizing fasciitis: an emerging disease? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004. **23**:573-5.

Wood, E. G., and H. C. Dillon, Jr. A prospective study of group B streptococcal bacteriuria in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1981. **140**:515-20.

Yagupsky, P., M. A. Menegus, and K. R. Powell. The changing spectrum of group B streptococcal disease in infants: an eleven-year experience in a tertiary care hospital. *Pediatr Infect Dis J*. 1991. **10**:801-8.

Yan, H. P., C. E. Carter, E. Z. Wang, D. L. Page, K. Washington, B. D. Wamil, F. M. Yakes, G. B. Thurman, and C. G. Hellerqvist. Functional studies on the anti-pathoangiogenic properties of CM101. *Angiogenesis*. 1998. **2**:219-33.

Yancey, M. K., P. Duff, P. Clark, T. Kurtzer, B. H. Frentzen, and P. Kubilis. Peripartum infection associated with vaginal group B streptococcal colonization. *Obstet Gynecol*. 1994. **84**:816-9.

Zabriskie, J. B. The Role of Temperate Bacteriophage in the Production of Erythrogenic Toxin by Group a Streptococci. *J Exp Med*. 1964. **119**:761-80.

Zhang, G. W., M. Kotiw, and G. Daggard. A RAPD-PCR genotyping assay which correlates with serotypes of group B streptococci. *Lett Appl Microbiol*. 2002. **35**:247-50.

Zhang, X., A. D. McDaniel, L. E. Wolf, G. T. Keusch, M. K. Waldor, and D. W. Acheson. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis*. 2000. **181**:664-70.

Annexes

Annexe 1. Extraction d'ADN bactérien par méthode phénol / chlorophorme / alcool isoamylique.

I. Matériel

1. Produits

- Tampon de lyse :

  NACl 1M (réf. S9625, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France),

  Tris-HCl 10 mM pH 7,5 (réf. 15504-020, Invitrogen life Technologie, Cergy Pontoise, France),

  EDTA 5 mM pH 8 (réf. E-5134, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France),

  Triton 0,5X (réf. T-6878, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- Lysozyme préparée extemporanément à 100 mg/L (réf. L-7651, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- Protéinase K : Solution à 20 mg/L (réf. P-2308, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- Mélange phénol / chloroforme / alcool isoamylique (25/24/1) (réf. P-2069, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- NaCl 1M (réf. S9625, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- Éthanol absolu (réf. 20820.293, VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)
- Tampon Tris-EDTA : Tris 10 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM
- Eau osmosée (Milli-QPlus, Millipore)

2. Réactifs

- Gants stériles
- Pipettes calibrées

  0,5 à 10 µL (Biohit Proline, réf. 720000, Biohit SAS, Bonnelles, France)

  10 à 100 µL (Biohit Proline, réf. 720050, Biohit SAS, Bonnelles, France)

  100 à 1000 µL (Biohit Proline, réf. 720060, Biohit SAS, Bonnelles, France)
- Embouts stériles à filtres

  10 µL (ATGC Biotechnologie, Marne la Vallée, France)

  100 µL (réf. 302-08-401, Axygen, Inc., USA)

  1000 µL (Starlab GMBH, Ahrensburg)
- Râteaux (réf. 1612-1561, VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)
- Microtubes Eppendorf 2 mL (réf. 033297, Dutscher SAS, Brumath, France) achetés en vrac, disposés dans des boites plastiques, refermées et passées à +80°C pendant 2 heures

- Bain-marie à 37°C et 56°C
- Centrifugeuse
- Spectrophotomètre pour lecture à 260 nm et 280 nm
- Cuve en quartz

II. Méthode

1. Extraction de l'ADN

Une culture de *S. agalactiae* sur gélose Trycase-soja additionnée de 5 % de sang de cheval a été mise en suspension dans 1,4 mL de tampon de lyse à l'aide d'une pipette râteau. Sept cents microlitres de cette suspension bactérienne ont été placés dans un tube Eppendorf stérile de 2 mL et ensuite lysés par addition de 20 µL de la solution de lysozyme. Après une heure d'incubation à 37°C, 20 µL de la solution de protéinase K ont été ajoutés suivi d'une incubation d'une heure à 56°C.

L'extraction de l'ADN a été réalisée par addition de 740 µL du mélange phénole / chloroforme / alcool isoamylique. Le mélange a été homogénéisé et vortexé pour obtenir une suspension laiteuse puis centrifugé 15 minutes (min) à 13000 tr/min à température ambiante. La phase aqueuse supérieure contenant l'ADN a été reprise dans un nouveau tube Eppendorf de 2 mL puis une 2ème extraction a été réalisée en additionnant 500 µL du mélange phénol / chloroforme / alcool isoamylique (25/24/1). Après une centrifugation de 15 min à 13000 tr/min, la phase supérieure a été reprise dans un nouveau tube Eppendorf de 2 mL. Cinquante µL de NaCl 1M puis 1 mL d'éthanol absolu ont été ajoutés puis agités vigoureusement. Après 10 min à -80°C, une centrifugation de 15 min à 13000 tr/min a permit d'obtenir le culot d'ADN. Le culot a été repris par 100 µL de Tris-EDTA 1X. L'ADN extrait a été conservé à -20°C.

2. Détermination de la concentration d'ADN

La concentration d'ADN extrait a été déterminée par spectrophotométrie à 260 nm. La concentration a été calculée suivant la loi de Beer-Lambert :

$$Abs_{(260nm)} = \varepsilon\,[ADN] \times 1$$

Où $Abs_{(260nm)}$ correspond à l'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm,

ε est le coefficient d'extinction molaire en $mL.\mu g^{-1}.cm^{-1}$,

[ADN] est la concentration de l'ADN en $\mu g.mL^{-1}$, et 1 est la longueur de la cuve en cm.

Le control de pureté de l'ADN a été réalisé en mesurant les absorbances aux longueurs d'ondes spécifiques des protéines (280 nm). Un rapport $Abs_{(260nm)}$ / $Abs_{(280nm)}$ inferieur à 1,8

indique une contamination de l’échantillon par des protéines.

Annexe 2. Sérotypage de *S. agalactiae* par PCR.

La détermination du sérotype de *S. agalactiae* s'effectue selon la méthode décrite par Kong *et a*l. pour les sérotypes Ia, Ib, III, IV, V, et VI (Kong *et al.*, 2002).

I. Matériels

1. Réactifs

- Taq polymérase (réf. N808-0167, Perkin Elmer, Courtabouef, France)
- Buffer 10X : Tris-HCl 10 mM, pH 8,3 : KCl 50 mM (fourni avec la Taq polymérase)
- Tampon $MgCl_2$ 25 mM (fourni avec la Taq polymérase)
- Nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (réf., 27-203501, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France)
- Amorces (Eurogenetec) (Tableau 16)
- Agarose (réf. A-7431, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- Tampon TBE 1X:

Tris-base 89 mM (réf. 15504-20, Invitrogen life Technologie, Cergy Pontoise, France)

Borate 89 mM (réf. 1001650500, VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)

EDTA 2,5 mM (réf. E-5134 Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)

- Bromure d'éthidium 10 mg/mL (réf. E-1510, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- Gel loading (réf. G-2526, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- Marqueur de poids moléculaire XIV (réf. 1721933, Roche Diagnostique, Meylan, France)

2. Matériel

- Thermocycleur : GeneAmp®PCR System 2700 (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France)
- Vortex
- Pipettes calibrées

0,5 à 10 µL (Biohit Proline, réf. 720000, Biohit SAS, Bonnelles, France)

10 à 100 µL (Biohit Proline, réf. 720050, Biohit SAS, Bonnelles, France)

100 à 1000 µL (Biohit Proline, réf. 720060, Biohit SAS, Bonnelles, France)

- Embouts stériles à filtres

10 µL (ATGC Biotechnologie, Marne la Vallée, France)

100 µL (réf. 302-08-401, Axygen, Inc., USA)

1000 µL (Starlab GMBH, Ahrensburg)

- Gants stériles
- Glace
- Microtubes Eppendorf 1,5 mL et 2 mL (réf. 033290 et 033297, Dutscher SAS, Brumath, France) achetés en vrac, disposés dans des boites plastiques, refermées et passées à +80°C pendant 2 heures
- Microtubes PCR 0,2 mL (réf. 321.11.051, Axygen Inc., USA)
- Blocs réfrigérés blancs
- Cuve d'électrophorèse
- Transilluminateur UV
- Appareil photo
- Eau osmosée stérile (Milli-QPlus, Millipore)

II. Méthode

1. Dilution de l'ADN bactérien extrait

L'ADN bactérien extrait a été dilué dans de l'eau osmosée stérile afin d'obtenir une concentration de 5 ng / µL.

2. Préparation de mix

La préparation du mix a été réalisée dans une pièce réservée à cet usage avec du matériel également réservé. L'amplification a été réalisée avec un mélange réactionnel de 20 µL sur des blocs réfrigérés, constitué du tampon de l'enzyme 1X, de $MgCl_2$ 1,5 mM, de chacun des dNTPs 200 µM, de 1 unité de *Taq* ADN polymérase, de 0,5 µM de chacune des amorces utilisées. Cinq microlitres de la solution d'ADN bactérien extrait et dilué à la concentration de 5 ng / µL ont été ajoutés aux 20 µL de mix dans une autre pièce.

3. Conditions d'amplification

Trente-cinq cycles d'amplification ont été effectués, chacun comprenant une dénaturation à 96°C pendant 30 secondes (sec), une hybridation des amorces à 60°C pendant 30 sec, une élongation à 72°C pendant 4 min, et en fin une extension de 10 min à 72°C a été réalisée à la suite des 35 cycles. Les produits amplifiés ont été conservés à +4°C.

4. Caractérisation des produits amplifiés

Les produits amplifiés ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % dans un tampon de migration TBE 1 X. Pour cela, 25 µL de produit amplifié additionné de 5 µL de

tampon de charge ont été soumis à voltage constant 120 Volts pendant 2 heures. Les produits amplifiés ont été révélés après coloration dans un bain de bromure d'éthidium à 0,1 µg/mL puis visualisés sous ultraviolet et photographiés. Le marqueur de taille moléculaire XIV a été utilisé pour estimer les tailles de fragments comprises entre 350 et 650 pb.

Tableau 16. Sérotypage des souches de *S. agalactiae* : amorces utilisées pour les PCR et taille des amplicons.

Sérotype	**Séquence des amorces**	**Amplicon (pb)**
Ia		354
Ia cps HS1	5'-GGC CTG CTG GGA TTA ATG AAT ATA GTT CCA G-3'	
Cps Ia	5'-GTA TAA CTT CTA TCA ATG GAT GAG TCT GTT G-3'	
Ib		523
Ib cps IA1	5'-CCT GAT TCA TTG CAG AAG TCT TTA CGA TGC G-3'	
Ib cps IS	5'-GAT AAT AGT GGA GAA ATT TGT GAT AAT TTA T-3'	
III		641
III cps HS	5'-GAA TAC TAT TGG TCT GTA TGT TGG TTT TAT T-3'	
cps Ia	5'- GTA TAA CTT CTA TCA ATG GAT GAG TCT GTT G-3'	
IV		379
IV cps HS1	5'-CCC AAG TAT AGT TAT GAA TAT TAG TTG GAT G-3'	
IV cps MA	5'-GGG TCA ATT GTA TCG TCG CTG TCA ACA AAA C-3'	
V		374
V cps MA	5'-CCC CCC ATA AGT ATA AAT AAT ATC CAA TCT T-3'	
V cps HS2	5'-CCC AGT GTG GTA ATG AAT ATT AGT TGG CTA G-3'	
VI		360
VI cps HS1	5'-CCT TAT TGG GCA AGG TAT AAG AGT TCC CTC C-3'	
VI cps IA	5'-GAA GCA AAG ATT CTA CAC AGT TCT CAA TCA C-3'	

Annexe 3. Multilocus sequence typing (MLST).

Le principe de MLST repose sur le séquençage de 7 loci correspondant à 7 gènes de ménage (housekeeping genes) connus chez *S. agalactiae*, appelés : adhP, pheS, atr, glnA, sdhA, glcK, et tkt. Pour chaque locus, un numéro d'allèle différent a été affecté à chaque séquence nucléotidique distincte. Cette numérotation a été établie par ordre d'identification des variants nucléotidiques (Jones *et al.* 2003b). Toute mutation dans la séquence nucléotidique, silencieuse ou non, a défini ainsi un nouvel allèle dont le numéro d'identification est déposé sur le site MLST de *S. agalactiae* (http://pubmlst.org/sagalactiae/). La combinaison de numéros correspondant aux allèles des 7 loci étudiés définit un profil allélique ou « sequence type » (ST). Pour la détermination du profil allélique, l'ordre d'affection des numéros aux 7 loci a été fixé arbitrairement. La numérotation des profils alléliques a également été établie par ordre d'identification de ceux-ci (ST-1, ST-2, etc.). La base des données référençant les profils alléliques déposés est accessible en ligne (http://pubmlst.org/sagalactiae/).

I. Matériels

1. Réactifs

- Taq polymérase (réf. N808-0167, Perkin Elmer, Courtabouef, France)
- Buffer 10X : Tris-HCl 10 mM, pH 8,3 : KCl 50 mM (fourni avec la Taq polymérase)
- Tampon $MgCl_2$ 25 mM (fourni avec la Taq polymérase)
- Nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (réf., 27-203501, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France)
- Amorces (Eurogenetec) (Tableau 17)
- Agarose (réf. A-7431, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- Tampon TBE 1X:

Tris-base 89 mM (réf. 15504-20, Invitrogen life Technologie, Cergy Pontoise, France)
Borate 89 mM (réf. 1001650500, VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)
EDTA 2,5 mM (réf. E-5134 Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)

- Bromure d'éthidium 10 mg/mL (réf. E-1510, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- Gel loading (réf. G-2526, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- Marqueur de poids moléculaire XIV (réf. 1721933, Roche Diagnostique, Meylan, France)
- Kit de séquençage: BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (réf. 4337456, Applied

Biosystems, France S.A.)

- Tampon de séquençage 5X (fourni avec le kit BigDye)
- isopropanol (réf. 20842.298, VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)
- Formamide (réf. 4311320, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France)

2. Matériel

- Thermocycleur : GeneAmp®PCR System 2700 (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France)
- Vortex
- Pipettes calibrées

  0,5 à 10 µL (Biohit Proline, réf. 720000, Biohit SAS, Bonnelles, France)

  10 à 100 µL (Biohit Proline, réf. 720050, Biohit SAS, Bonnelles, France)

  100 à 1000 µL (Biohit Proline, réf. 720060, Biohit SAS, Bonnelles, France)
- Embouts stériles à filtres

  10 µL (ATGC Biotechnologie, Marne la Vallée, France)

  100 µL (réf. 302-08-401, Axygen, Inc., USA)

  1000 µL (Starlab GMBH, Ahrensburg)
- Gants stériles
- Glace
- Microtubes PCR 0,2 mL (réf. 321.11.051, Axygen Inc., USA)
- Blocs réfrigérés blancs
- Cuve d'électrophorèse
- Transilluminateur UV
- Appareil photo
- Montage PCR Centrifugal Filter Devices (réf. UFC7 PCR 50, Millipore, Saint Quentin, France)
- Centrifugeuse
- Spectrophotomètre pour lecture à 260 nm et 280 nm
- Cuve en quartz
- Eau osmosée stérile (Milli-QPlus, Millipore)
- Plaque de séquençage : MicroAmp™ 96 Well Reaction Plate) (réf. N801-0560, Applied Biosystems, France S.A.).

- Séquenceur capillaire (4 capillaires) : 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

II. Méthode

1. Amplification des sept loci

- **Dilution de l'ADN bactérien extrait**

L'ADN bactérien extrait a été dilué dans de l'eau osmosée stérile afin d'obtenir une concentration de 25 ng / µL.

- **Préparation de mix**

Pour chaque locus, un mélange réactionnel de 40 µL, constitué du tampon de l'enzyme 1X, de $MgCl_2$ 1,5 mM, de chacun des dNTPs 200 µM, de 2 unités de *Taq* ADN polymérase, de 0,5 µM de chacune des amorces correspondant (listées dans le tableau 17) a été préparé. Dix microlitres de la solution d'ADN bactérien extrait et dilué à la concentration de 25 ng / µL ont été ajoutés aux 40 µL de mix.

- **Condition de la PCR**

Un premier cycle de dénaturation de l'ADN à 94°C de 1 min et 30 sec a été réalisé, suivi de trente cycles d'amplification (chacun comprenant une dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une hybridation des amorces à 50°C pendant 30 sec, une élongation à 72°C pendant 1 min), et en fin une extension de 4 min à 72°C a été réalisée à la suite des 30 cycles. Les produits amplifiés ont été conservés à +4°C.

- **Caractérisation des produits amplifiés**

Les produits de PCR ont été contrôlés par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % dans un tampon de migration TBE 1 X. Pour cela, 10 µL de produit amplifié additionné de 5 µL de tampon de charge ont été soumis à voltage constant 120 Volts pendant 2 heures. Les produits amplifiés ont été révélés après coloration dans un bain de bromure d'éthidium à 0,1 µg/mL puis visualisés sous ultraviolet et photographiés. Le marqueur de taille moléculaire XIV a été utilisé pour estimer les tailles de fragments comprises entre 350 et 650 pb.

2. Purification des produits amplifiés

Trois-cent-soixante microlitres de l'eau osmosée ont été ajoutés aux 40 µL (le volume restant après le control de la PCR par migration) de chaque produit de PCR. Les 400 µL ont été déposés dans un réservoir disposé sur un tube. Le tube a été ensuite centrifugé pendant 15 min à 1000 g. Le réservoir a été disposé sur un nouveau tube. Vingt microlitres de l'eau osmosée ont

été ajoutés et puis le réservoir a été mis à l'inverse sur un nouveau tube. Une centrifugation à 1000 g pendant 2 min a été réalisée. Le réservoir a été jetés et la solution d'ADN purifié dans le tube a été conservé à -20°C si la PCR de séquençage n'est pas réalisée dans les 24 heures qui suivent la purification.

3. La réaction de séquençage

- **Dilution du produit purifié**

Le produit d'ADN purifié a été dilué dans de l'eau osmosée stérile afin d'obtenir une concentration de 30-60 ng / µL.

- **Préparation du mix**

Un mélange de 6 µL par échantillon a été préparé dans chaque puits sur la plaque de séquençage. Ce mélange a été constitué de 1,5 µL du tampon de séquençage, 1,5 µL de l'eau osmosée, 2 µL de l'amorce à 2 µM (sens ou anti-sens), et 1 µL du kit de séquençage (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing). Quatre millilitres du produit d'ADN purifié et dilué à 30-60 ng/µL ont été ajoutés aux 6 µL de mix.

- **Conditions de la réaction de séquençage**

Après un cycle de dénaturation à 96°C pendant 1 min, trente cycles ont été effectués, chacun comprenant une dénaturation à 96°C pendant 20 sec, une hybridation des amorces à 50°C pendant 15 sec, et une élongation à 60°C pendant 4 min. Le séquençage a été réalisé sur les deux brins de chaque ADN (sens et anti-sens). Les produits séquencés ont été conservés à +4°C.

- **Purification des produits séquencés et analyse**

Dix microlitres de l'eau osmosée et 30 µL de l'isopropanol à 100 % ont été ajoutés à chaque produit séquencé. Après avoir laissé deux heures à la température ambiante (ou une nuit à 4°C), le mélange a été centrifugé à 3000 g pendant 30 min. Le surnageant a été éliminé par retournement de la plaque. Cent-cinquante microlitres d'isopropanol à 70 % ont été ensuite ajoutés et une autre centrifugation à 2000 g pendant 10 min a été effectuée. Le surnageant a été éliminé par retournement. Une dernière centrifugation à 700 g pendant 1 min (la plaque à l'inverse sur un sopalin) a été réalisée. Après avoir laissé la plaque quelques secondes à la paillasse pour laisser évaporer le reste, l'ADN purifié a été mis en suspension dans 10 µL de formamide, puis laissé 1 heure sur la paillasse. La plaque a été ensuite conservée à 4°C si le séquençage aurait lieu dans les 24 heures suivante ou à -20°C.

- **Analyse de séquences nucléotidiques**

Les séquences nucléotidiques ont été analysées par le séquenceur capillaire 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). L'analyse consécutive des séquences a été réalisée à l'aide du logiciel Sequencing Analysis software v5.2 Patch2. Le logiciel BioEdit (Biological sequence alignment editor), disponible en ligne (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html), a été utilisé pour l'ajustement des séquences. Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences de *S. agalactiae* déposées sur le site : http://pubmlst.org/sagalactiae/.

Tableau 17. Les amorces pour MLST et la taille des fragments séquencés.

Gène	Séquence des amorces	Taille du fragment séquencé (pb)
adhP		498
sens	GGT GTG TGC CAT ACT GAT TT	
anti-sens	ACA GCA GTC ACA ACC ACT CC	
pheS		501
sens	ATA TCA ACT CAA GAA AAG CT	
anti-sens	TGA AGG AAT TGA TGG CTA TG	
atr		501
sens	ATG GTT GAG CCA ATT ATT TC	
anti-sens	CCT TGC TCA ACA ATA ATG CC	
glnA		498
sens	AAT AAA GCA ATG TTT GAT GG	
anti-sens	GCA TTG TTC CCT TCA TTA TC	
sdhA		519
sens	AAC ATA GCA GAG CTC ATG AT	
anti-sens	GGG ACT TCA ACT AAA CCT GC	
glcK		459
sens	GGT ATC TTG ACG CTT GAG GG	
anti-sens	ATC GCT GCT TTA ATG GCA GA	
tkt		480
sens	ACA CTT CAT GGT GAT GGT TG	
anti-sens	TGA CCT AGG TCA TGA GCT TT	

Annexe 4. Profils de macrorestriction de l'AND en cham pulse (PFGE).

I. Matériels

CHEF DR II CELL (cuve)	Réf. 1703618C, BioRad, Marnes la Coquette, France
CHEF DR DRIVE MODUL (intégrateur)	Réf. 1703618D, BioRad, Marnes la Coquette, France
PULSEWARE 760 SWITCHER 220V	Réf. 1703602, BioRad, Marnes la Coquette, France
MD 200/2-0 PWR SUPPLY 220/240	Réf. 1654762, BioRad, Marnes la Coquette, France

II. Réactifs

- Bouillon Cœur Cervell (réf. 220837, Becton Dickinsos, Pont de Claix, France)
- Kit Genepath (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) :

Module universel (réf. 59001)

Module enzyme groupe 1 (réf. 59003)

Module standard groupe 1 (réf. 59004)

Kit gel électrophorèse (réf. 59007)

- Eau osmosée stérile (Milli-Qplus, Millipore)
- Mutanolysine (réf. M4782, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France), reconstitué à 5 UI/µL
- Lysozyme (réf. L-7651, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France), préparé extemporanément à 100 mg/mL
- Lysostaphine (réf. L-2898, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- Bromure d'éthidium (réf. E-1510, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- Agarose à faible point de fusion SeaPlaque® GTG®Agarose (réf. 50111, Lonza, USA)

Autres matériels divers

- Glace
- Centrifugeuse réfrigérée à +4°C
- Bain-marie
- Agitateur oscillant
- Pipettes calibrées :

0,5 à 10 µL (Biohit Proline, réf. 720000, Biohit SAS, Bonnelles, France)

10 à 100 µL (Biohit Proline, réf. 720050, Biohit SAS, Bonnelles, France)

100 à 1000 µL (Biohit Proline, réf. 720060, Biohit SAS, Bonnelles, France)

- Embouts stériles à filtres :

10 µL (ATGC Biotechnologie, Marne la Valée, France)

100 µL (Axygen, Inc., USA)

1000 µL (Starlab GMBH, Ahrensburg)

- Tubes Eppendorf 1,5 mL et 2 mL (réf. 033290 et 033297, Dutscher SAS, Brumath, France)
- Scalpels stériles
- Gants stériles
- Transilluminateur UV
- Four à micro-ondes

III. Méthode

1. Préparation des inserts

À partir d'une culture de la souche sur gélose trypcase-soja additionnée de 5 % sang de cheval, une colonie a été ensemencée dans un bouillon cœur-cervelle et incubée à 37°C pendant 18 heures. Les bouillons ont été vortexés à fin d'homogénéiser la culture. Huit-cent microlitres ont été pipetés et placés dans un tube de 1,5 mL, puis centrifugés 2 min à 10 000 tr/min. Le surnageant a été éliminé et le culot remis en suspension dans 150 µL de Cell Suspension Buffer par aspiration / refoulement, et les tubes ont été placés au bain-marie à 50°C. Afin de faire fondre l'agarose à bas point de fusion, celui-ci a été chauffé à l'aide d'un four à micro-ondes et maintenu à 50°C dans un bain-marie. Pour chaque souche, 3 µL de la solution de lysosyme, 3 µL de la solution de mutanolysine, 3 µL de lysostaphine puis 150 µL d'agarose à bas point de fusion ont été ajoutés à la suspension bactérienne. Le mélange a été coulé dans des moules à inserts et placé à +4°C pendant 10 min.

2. Traitement des inserts par lysozyme, mutanolysine, et protéinase K

Chaque insert a été démoulé dans un tube Eppendorf de 2 mL contenant 500 µL de tampon de lyse, 10 µL de lysozyme, 10 µL de mutanolysine, et 10 µL de lysostaphine. Après une incubation d'une heure à 37°C au bain-marie, les inserts ont été rincés par 1 mL de tampon de lavage 1X. Chaque insert a été ensuite incubé avec 500 µL de tampon de protéinase K et 20 µL de protéinase K pendant 24 heures à 50°C.

3. Lavage des inserts

Trois séries de lavage successifs ont été réalisés pour chaque insert dans 1 mL de tampon de lavage 1X, pendant 45 min sous agitation douce à température ambiante. Un quatrième lavage en tampon de lavage 0,1X a été réalisé pendant 45 min sous agitation douce à température ambiante.

4. Digestion des inserts

Les inserts ont été placés dans un tube Eppendorf de 2 mL contenant 500 µL de tampon de l'enzyme de restriction *Sma*I et incubés à température ambiante sous agitation douce pendant 45 min. Après avoir retiré le tampon, 25 unités d'enzyme de restriction *Sma*I ont été ajoutés avec 300 µL de tampon *Sma*I Buffer pour chaque insert. Les inserts ont été incubés pendant 16 à 20 heures à 25°C. Le tampon a été éliminé pour arrêter la restriction et 1 mL de tampon de lavage a été ajouté. Les inserts restreints peuvent être conservés 2 à 4 semaines à +4°C.

5. Migration électrophorétique

L'électrophorèse par champ électrique alterné a été réalisée dans un gel d'agarose à bas point de fusion à 1 % en tampon TBE 0,5X à température constante de 14°C et à un voltage constant de 200 Voltes pendant 20 heures.

6. Révélation

Les profils de restriction ont été révélés après incubation dans une solution de bromure d'éthidium à 0,1 µg/mL et visualisés sous transilluminateur UV.

Annexe 5. Amplification par PCR en temps réel de 10 fragments d'ADN prophagique chez *S. agalactiae*.

Dix fragments d'ADN prophagique ont été recherchés par PCR en temps réel. Trois fragments, F5, F7, et F10, avaient été identifiés par une méthode basée sur une analyse RAPD au niveau de la population (van der mee 2006), et 7 fragments, SAG0566, SAK_0738, SAK_0748, SAK_2090, SAK_2094, SAJ_2395, SAK_1326, ont été identifiés et sélectionnés par analyse des séquences prophagiques présentes sur les souches séquencées de *S. agalactiae* (515, A909, 18RS21, COH1, H36B, CJB111 (Tettelin *et al.*, 2005), 2603V/R (Tettelin *et al.*, 2002), et NEM316 (Glaser 2002)). L'analyse comparative des huit génomes de *S. agalactiae* séquencés a permit d'identifier quatre clusters de gènes correspondant à quatre prophages appelés Sa01 (souches 2603V/R, 18RS21, et 515), Sa03 (souches A909, H36B, et 515), Sa04 (souches A909 et CJB111), et Sa05 (souches A909, 18RS21, COH1, H36B, et CJB111) ainsi que des « résidus » phagiques (souches 515, H36B, 18RS21). Les amorces pour amplifier ces 7 fragments d'ADN prophagique ont été déterminées en utilisant le logiciel Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

Les résultats de la PCR ont fait la base pour construire un dendrogram en utilisant le coefficient de Jaccard.

I. Matériels

1. Produits

- iQ SYBR green Supermix 1x (réf. 204143, Qiagen S. A., Courtaboeuf, France)
- Amorces (Eurogenetec) : voir tableau 18.

2. Matériel

- Chromo 4 System Instrument (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Logiciel primer 3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primet3/primer3_www.cgi)
- Logiciel BLAST software (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
- Vortex
- Pipettes calibrées

0,5 à 10 µL (Biohit Proline, réf. 720000, Biohit SAS, Bonnelles, France)

10 à 100 µL (Biohit Proline, réf. 720050, Biohit SAS, Bonnelles, France)

100 à 1000 µL (Biohit Proline, réf. 720060, Biohit SAS, Bonnelles, France)

- Embouts stériles à filtres

10 µL (ATGC Biotechnologie, Marne la Vallée, France)

100 µL (réf. 302-08-401, Axygen, Inc., USA)

1000 µL (Starlab GMBH, Ahrensburg)

- Gants stériles
- Glace
- Microtubes Eppendorf 1,5 mL et 2 mL (réf. 033290 et 033297, Dutscher SAS, Brumath, France)
- Microtubes PCR 0,2 mL (réf. 321.11.051, Axygen Inc., USA)
- Blocs réfrigérés blancs

II. Méthode

L'amplification a été réalisée avec un mélange réactionnel de 25 µL constitué de 12,5 µL iQ SYBR green super Mix, de 0,5 µM de chacune des amorces utilisées, et de 5 µL d'ADN bactérien extrait et dilué à la concentration de 5 ng/µL.

Quarante cycles d'amplification ont été réalisés, chacun comprenant une dénaturation à 94°C pendant 10 sec, une hybridation des amorces à une température variable selon le gène pendant 10 sec (voir tableau 18), une élongation à 72°C pendant 30 sec. Les produits amplifiés ont ensuite été refroidis à 35°C et soumis à une augmentation de la température de 0,2°C par pallier de 10 sec jusqu'à 95°C afin d'obtenir le Tm des amplicons.

Tableau 18. Les fragments d'ADN prophagique amplifiés : gènes cibles, souches références, amorces, Température d'hybridation, et taille de l'amplicon.

Fragment d'AND prophagique	Description du gène cible	Souche(s) référence(s)	séquence (5'→3') de l'amorce pour la PCR Sens Anti-Sens	Temperature d'hybridation	Taille de l'amplicon (bp)
F5	A terminase large subunit	*S.pyogenes* 10394	ATC TTA GCA AGC TCC CAC GA TCA ACG GCT GGT ATG GAT TT	45°C	341
F7	A phage-associated cell wall hydrolase and a phage-associated lysin	*S. pyogenes* 10394, SpyM6	AGG CCG CAA CCT TAA ATC T CGA GTG AAA ACG TGT CTG G	48°C	497
F10	A phage-encoded transcriptional regulator, ArpU family	*S. pyogenes* 5005	TCA GCA GAG GAA GGA AAG GA CAA TCA AAG AGC CCT CCC TA	49°C	510
SAG0566	Single-strand binding protein prophage lambda Sa1	*S. agalactiae* 2603 V/R 18RS21	GTG CTT TGG TTG GAA TTA C TCT GTT GTT GGC TAT TGC	54°C	132
SAK_0738	DNA methylase prophage lambda W4	CJB111, A909	GGG ATA AGA AAG CCA ATC ACA TAG ATA GAC GCA TCG	54°C	172
SAK_0748	Phage major capsid protein HK97 family	CJB111, A909	TGA TTT CTC TTA CTA CTG GAT TG CGC TTC TGG TAG AAC GAG	52°C	136
SAK_2090	BRO domain protein, prophage antirepressor prophage Sa05	A909, H36B CJB111	TAG AGC ACC AAG GCG AAT G AAA CGA CCT CAT CAA CTA AAC G	54°C	102
SAK_2094	Prophage Sa05 site-specific recombinase phage integrase family	A909, H36B CJB111, 18RS21 COH1	AAA GAG TAA AGC ATT TCG CCT AAT CTA TAT TGG AGT TC	49°C	526
SAJ_2395	Phage terminase-like protein, large subunit (remnant)	18RS21, 515	TGA TAG ATA AGT ATG TGA GAT TC TTG TCT TTC CGA GTT AGC	50,5°C	251
SAK_1326	Site-specific recombinase, phage integrase family (remnant)	A909, H36B CJB111	TTT GAC CTA CGG GAT TAT G TGA ACG CCA TCT TAG AAG	50,5°C	261

Annexe 6. Isolement, propagation des bactériophages de *S. agalactiae*.

I. Matériels

- Bouillon Todd Hewitt modifié (mTH) : tube de 4,5 mL, stérilisé à 115°C pendant 10 min

Todd Hewitt Broth Base (réf. 249240, Becton Dickinson, France)	30 g
Extrait de levure (réf. LP0021, Oxoid LTD, England)	2 g
CaCl2 (réf. 22 319.328, VWR Prolabo, France)	12 mg
L-Tryptophane (réf. 1.08374.0010, Merck, Germany)	10 mg
Eau osmosée (Milli-QPlus, Millipore)	qsp 1 L

- Gélose Todd Hewitt modifiée stérilisée à 115°C pendant 10 min (20 mL dans les boites de pétri de diamètre 9 et 13,5 cm)

Todd Hexitt Broth Base	30 g
Extrait de levure	2 g
CaCl2	12 mg
L-Tryptophane	10 mg
Eau osmosée	qsp 1 L
Agar (réf. 214010, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France)	7 g

- Gélose Todd Hewitt modifié molle stérilisée à 115°C pendant 10 min (tubes de 10 mL)

Todd Hexitt Broth Base	30 g
Extrait de levure	2 g
CaCl2	12 mg
L-Tryptophane	10 mg
Eau osmosée	qsp 1 L
Agar	4 g

- Gélose trypcase soja + 5 % de sang de cheval (réf. 43061, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)
- Mitomycine C (réf. M0440, Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- Filtres 0,45 µm de porosité (réf. SLHA 03355, Millipore, Bedford, Mass., USA)
- Pipettes stériles de 10 mL

- Boites de Pétri (diameter 9 et 13,5 cm)
- Anses calibrées de 10 µL
- Pipettes calibrées :

  0,5 à 10 µL (Biohit Proline, réf. 720000, Biohit SAS, Bonnelles, France)

  100 à 1000 µL (Biohit Proline, réf. 720060, Biohit SAS, Bonnelles, France)
- Embouts stériles à filtres :

  10 µL (ATGC Biotechnologie, Marne la Valée, France)

  1000 µL (Starlab GMBH, Ahrensburg)
- Étuve à 30°C
- Bain-marie à 50°C
- Centrifugeuse
- Multiensemenceur Biddulph (appareil de Lidwell)
- Aiguilles er seringues de 10 mL stériles
- Râteaux (réf. I612-1561, VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)
- Tubes Falcon de 15 mL (réf. 352097, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France)

II. Méthode

1. Induction des bactériophages

Les souches de *S. agalactiae* congelées à -80°C ont été mises en culture sur gélose au sang à 37°C pendant 18 H. Chaque souche de *S. agalactiae* a été mise en bouillon Todd Hewitt modifié et incubée pendant 2 heures à 30°C. La mitomycine C a été ajoutée dans le bouillon à la concentration de 1 µg/mL, et l'incubation a été poursuivie pendant 2 heures. La culture a été centrifugée pendant 15 min à 1500 g et le surnageant a été filtré sur filtre de 0,45 µm de porosité. Chaque filtrat a été conservé à - 80°C en tube falcon de 15 mL.

2. Mise en évidence des phages dans les filtrats

Vingt millilitres de gélose mTH ont été coulés dans une boite de Pétri (diamètre 9 cm). Les boites ont été inondées d'une culture de *S. agalactiae* en bouillon mTH de 2 heures à 30°C. L'excès de culture a été aspiré à l'aide d'une pipette stérile. Les boites ont été séchées pendant 20 min sous hotte. Dix microlitres des filtrats ont été déposés à la surface de la gélose à l'aide de l'appareil de Lidwell. Les boites ont été incubées 18H à 30°C. La mise en évidence de plages de lyse permet de conclure à la présence de phage(s) dans le filtrat étudié. Les filtrats pour lesquels au moins 20 plages de lyse ont été observées pour deux souches différentes, ont été considérés

comme contenant des phages, et nommés suspensions phagiques.

3. Sélection du phage et de la souche de propagation, purification du phage

Pour chaque suspension phagique, la souche de propagation a été définie comme la souche donnant le plus grand nombre de plages de lyse. Vingt millilitres de gélose mTH ont été coulés dans une boite de Pétri (diamètre 9 cm). Les boites ont été inondées d'une culture de la souche de propagation (PS) en bouillon mTH de 2 heures à 30°C. L'excès de culture a été aspiré à l'aide d'une pipette stérile. Les boites ont été séchées pendant 20 min sous hotte. Dix microlitres des suspensions phagiques ont été déposés à la surface de la gélose à l'aide de l'appareil de Lidwell. Les boites ont été incubées 18H à 30°C. Sous la loupe, une plage de lyse isolée a été reprise à la pipette et a été diluée dans 1 mL de bouillon mTH et conservée à -80°C.

4. Propagation du phage

Un bouillon mTH a été ensemencé avec une colonie de la souche de propagation et incubé 24 heures à 30°C. Vingt millilitres de gélose mTH ont été coulés dans une boite de Pétri (diamètre 13,5 cm). Un tube de gélose molle a été mis à liquéfier puis maintenu à 50°C au bain-marie. Cette gélose molle a été ensemencée avec 800 µL de la culture de 18H de la souche de propagation et 1 mL de la suspension phagique. La gélose a été homogénéisée, coulée en boite de Pétri sur la mince couche de gélose mTH, et incubée à 30°C pendant 24 heures. Les phages ont ensuite été récupérés par fractionnement de la gélose molle à l'aide d'un râteau dans 10 mL de bouillon mTH préalablement répandu à la surface de la double couche de la gélose. À l'aide d'une pipette de 10 mL, le mélange a été aspiré et refoulé de nombreuses fois jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. La suspension a été ensuite récupérée et centrifugée à 1500 g pendant 15 min. Le surnageant a été prélevé à la seringue et filtré avec un filtre Millipore (0,45 µL) dans un tube stérile.

5. Titrage du phage

Des dilutions de la suspension phagique en bouillon mTH ont été réalisées de 10^{-1} à 10^{-7} pour le titrage de celle-ci. Dix µL de chaque dilution ont été déposés sur une gélose mTH (20 mL en boite de Pétri 9 cm) préalablement ensemencée avec un bouillon de culture de 2 heures de la souche de propagation. Après incubation à 30°C pendant 18 heures, le titre de la suspension phagique (nombre de phage par mL) est égal à :

Nombre de plages de lyse x inverse de la dilution x 100

Annexe 7. Détermination du spectre lytique des bactériophages.

Étude du spectre d'activité d'un set de bactériophages sur les souches de *S. agalactiae*.

I. Matériel

- Bouillon Todd Heuitt modifié (mTH) : tube de 4,5 mL
- Gélose Todd Heuitt modifiée : 20 mL dans les boites de Pétri de diamètre 9 cm
- Multiensemenceur Biddulph (appareil de Lidwell)
- Plaque de titrage en Téflon à 27 cupules, stérile
- Pipette stérile de 10 mL
- Étuve à 30°C

II. Méthode

1. Détermination de la R.T.D.

La dilution test de routine (R.T.D) a été définie comme la plus grande dilution de phages capable de provoquer une lyse semi-confluente quand sont déposés 10 µL de la solution phagique.

2. Préparation des souches à lysotyper

Les souches à tester ont été mises en culture dans un bouillon mTH pendant 2 heures à 30°C afin d'obtenir une culture en phase exponentielle. Vingt millilitres de gélose mTH ont été coulés dans une boite de Pétri (diamètre 9 cm). Les boites ont été inondées du bouillon de culture de la souche de *S. agalactiae* à tester. L'excès de culture a été aspiré à l'aide d'une pipette stérile. Les boites ont été séchées pendant 20 min sous hotte.

3. Préparation de la plaque

Chaque suspension phagique à la R.T.D a été placée dans une cupule de la plaque en Téflon stérile. Dix microlitres es suspensions phagiques ont été déposés à la surface de la gélose à l'aide de l'appareil de Lidwell. Les boites ont été incubées 18H à 30°C.

4. Analyse des résultats

La lecture des boites se fait à l'aide d'une loupe. Les règles d'interprétation suivantes ont été appliquées :

- Lyse confluente : il n'y a plus de culture bactérienne au point de dépôt de la suspension phagique
- Lyse semi confluente : les plages de lyse nombreuses au point de dépôt de la suspension phagique laissant entrevoir une culture bactérienne

- ++ : supérieur ou égal à 50 plages de lyse
- + : de 20 à 49 plages de lyse
- +/- : de 1 à 19 plages de lyse
- 0 : aucune plage de lyse

Annexe 8. Microscopie électronique des bactériophages

I. Matériel

1. Produits

- Bouillon Todd Hewitt modifié (mTH) : tube de 4,5 mL
- Gélose Todd Hewitt modifié : 20 mL dans les boîtes de Pétri de diamètre 13,5 cm
- Gélose Todd Hewitt modifié molle : tubes de 10 mL
- Acétate d'uranyle 2 %
- Sucrose 20 % (P/v) en tampon PBS
- Tampon Tris 10 mM, pH = 7,2

2. Matériel

- Pipettes stériles de 10 mL
- Rateau
- Filtres 0,45 µm de porosité (réf. SLHA03355, Millipore, Bedford, Mass, USA)
- Centrifugeuse
- Utracentrifugeuse
- Grille de carbone
- Microscope électronique JEOL JEM-1230
- Camera CCD GATAN BioScan grand angle (1024x1024 pixels)
- Pipettes calibrées:

0,5 à 10 µL (Biohit Proline, réf. 720000, Biohit SAS, Bonnelles, France)

100 à 1000 µL (Biohit Proline, réf. 720060, Biohit SAS, Bonnelles, France)

- Embouts stériles à filtres :

10 µL (ATGC Biotechnologie, Marne la Valée, France)

1000 µL (Starlab GMBH, Ahrensburg)

- Anses calibrées de 10 µL
- Bain-marie à 50 °C

II. Méthode

1. Préparation des particules phagiques

Un bouillon mTH a été ensemencé avec une colonie de la souche de propagation et incubée 24 heures à 30 °C.

Vingt mL de gélose mTH ont été coulés dans une boîte de Pétri (diamètre 13,5 cm). Les tubes de gélose molle ont été mis à liquéfier puis maintenus à 50 °C au bain-marie.

Cette gélose molle a été ensemencée avec 800 µL de la culture de 18H de la souche de propagation et 1 mL de la suspension phagique. Après homogénéisation, la gélose molle a été coulée en boîte de Pétri sur la mince couche de gélose mTH, et incubée à 30 °C pendant 24 heures. Les phages ont été ensuite récupérés par fractionnement de la gélose molle l'aide d'une pipette râteau dans 10 mL de tampon Tris préalablement répandu à la surface de la double couche de la gélose. À l'aide d'une pipette, le mélange a été aspiré et refoulé de nombreuses fois jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. La suspension a été ensuite récupérée pour être centrifugée à 1 500 g pendant 15 min. Le surnageant a été prélevé à la seringue et filtré avec un filtre Millipore (0,45 µm) dans un tube stérile. Les suspensions phagiques obtenues doivent avoir un titre de > 10^8 phages/mL pour être analysées en microscopie électronique.

Les suspensions phagiques ont ensuite été ultra-centrifugées à 20 000 tr/min pendant 1,5 heures en gradient de densité de sucrose à 20 % (P/vol).

2. Observation des particules phagiques

Dix µL des suspensions phagiques ont été déposés sur des grilles de carbone avec une solution d'acétate d'uranyle à 2 % (pH = 4,0).

Les observations ont été faites au microscope électronique JEOL JEM-1230.

Selon les recommandations de l'ICTV, les mesures ont été faites pour chaque type morphologique observé sur un nombre minimum de 20 particules phagiques.

Pour les têtes des bactériophages, les dimensions correspondent aux distances entre les sommets opposés des capsides isométriques.

Pour les queues, les dimensions notées ne comprennent pas la plaque basale.

Annexe 9. Extraction d'ADN phagique.

L'extraction de l'ADN phagique a été réalisée à l'aide du kit Qiagen Lambda Mini kit (Qiagen S. A., Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fournisseur, à partir des suspensions phagiques contenant au minimum 10^9 phages/mL

I. Matériel

- Qiagen Lambda Mini kit (réf. 12523, Qiagen S. A., Courtaboeuf, France)
- Tampon Tris-EDTA : Tris 10 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM
- Isopropanol (réf. 20842.298, VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)
- Éthanol à 70 % (réf. 20820.293, VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)
- Tubes Eppendorf 1,5 mL et 2 mL (réf. 033290 et 033297, Dutscher SAS, Brumath, France)
- Tubes Falcon 15 mL (réf. 352097, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France)
- Centrifugeuse réfrigérée à +4°C
- Bain-marie à 70°C et à 37°C
- Glace
- Pipettes calibrées

0,5 à 10 µL (Biohit Proline, réf. 720000, Biohit SAS, Bonnelles, France)
10 à 100 µL (Biohit Proline, réf. 720050, Biohit SAS, Bonnelles, France)
100 à 1000 µL (Biohit Proline, réf. 720060, Biohit SAS, Bonnelles, France)

- Embouts stériles à filtre :

10 µL (ATGC Biotechnologie, Marne la Valée, France)
100 µL (Axygen, Inc., USA)
1000 µL (Starlab GMBH, Ahrensburg)

- Gants stériles

II. Méthode

1. Précipitation et lyse des particules phagiques

Dix millilitres de suspensions phagiques ont été mélangés à 30 µL de tampon L1 contenant de la RNAse A et de la DNAse I dans un tube Falcon de 15 mL, afin de lyser l'ADN et les ARNs bactériens. Après incubation de 30 min à 37°C, les particules phagiques ont été précipitées par ajout de 2 mL de tampon L2 préalablement refroidi contenant du PEG, et en incubant le mélange pendant 1 heure dans la glace, suivi d'une centrifugation à > 10 000 g

pendant 10 min. Le surnageant a été éliminé afin de récupérer le culot. Ce culot contenant les particules phagiques a été remis en suspension dans 1 mL de tampon L3 par aspiration / refoulement à l'aide d'une pipette.

Les particules phagiques ont été lysées par ajout de 1 mL de tampon L4 contenant du sodium-dodécyl-sulfate (SDS) qui dénature les protéines. Le mélange a été incubé pendant 10 min à 70°C puis refroidi dans la glace. Les protéines de phage complexées au SDS ont été précipitées par 1 ml de tampon L5 et ont été séparées de l'ADN par centrifugation à +4°C pendant 30 min à > 15 000 g. Le surnagent a été transféré immédiatement dans un nouveau tube Eppendorf et a été de nouveau centrifugé à > 15 000 g pendant 10 min pour éliminer les protéines résiduelles.

2. Liaison de l'ADN et élution de l'ADN

Le surnageant a été rapidement placé sur la colonne préalablement prétraitée par 1 mL de tampon QBT. Lorsque tout le surnageant a été passé au travers de la colonne par gravité, un lavage avec 2 mL de tampon de lavage QC a été effectué puis l'ADN phagique a été élué avec 1,5 mL de tampon d'élution QF.

3. Précipitaion de l'ADN phagique

L'ADN a été précipité par 1 mL d'isopropanol suivi d'une centrifugation de 30 min à +4°C à > 15 000 g. Le surnageant a été éliminé à l'aide d'une pipette et le culot a été lavé de traces de sels avec 1 mL d'éthanol à 70 %. Après une centrifugation de 10 min à > 15 000 g, l'ADN phagique a été remis en suspension dans 15 µL de tampon Tris-EDTA. L'ADN phagique extrait a été conservé à -20°C.

Annexe 10. Restriction enzymatique d'ADN phagique

Études des profils de restriction de l'ADN phagique avec les enzymes *Cla*I, *Hind*III, et *Eco*RI.

I. Matériels

1. Produits

- Enzymes de restriction :

  *Cla*I 10 UI/µL (réf. 10 656 291 001, Roche Diagnostic, Meylan, France)

  *Hind*III 10 UI/µL (réf. 10 656 313 001, Roche Diagnostic, Meylan, France)

  *Eco*RI 10 UI/µL (réf. 10 703 737 001, Roche Diagnostic, Meylan, France)

Le site de restriction et la température d'incubation sont présentés dans le tableau 19.

Tableau 19. Site de restriction et température d'incubation des enzymes de restriction.

Enzyme de restriction	Site de restriction	Température d'incubation
*Cla*I	AT↓CGAT	37°C
*Hind*III	A↓AGCTT	37°C
*Eco*RI	G↓AATC	37°C

- Agarose (réf. A-7431, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- Tampon TBE 1X :

Tris-base 89 mM (réf. 15504-20, Invitrogen life Technologie, Cergy Pontoise, France)

Borate 89 mM (réf. 1001650500, VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)

EDTA 2,5 mM (réf. E-5134 Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)

- Bromure d'éthidium (réf. E-1510, 10 mg/mL, Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- Gel loading (réf. G-2526, Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France)
- Marqueur de poids moléculaire XIV (réf. 1721933, Roche Diagnostic, Meylan, France)
- Marqueur de poids moléculaire Raoul (réf. MWRAU300, Q-Biogene, Strasbourg, France)
- Eau osmosée (Milli-Q Plus, Millipore)

2. Matériels

- Pipettes calibrées

0,5 à 10 µL (Biohit Proline, réf. 720000, Biohit SAS, Bonnelles, France)

10 à 100 µL (Biohit Proline, réf. 720050, Biohit SAS, Bonnelles, France)

100 à 1000 µL (Biohit Proline, réf. 720060, Biohit SAS, Bonnelles, France)

- Embouts stériles à filtres

10 µL (ATGC Biotechnologie, Marne la Vallée, France)

100 µL (réf. 302-08-401, Axygen, Inc., USA)

1000 µL (Starlab GMBH, Ahrensburg)

- Tubes Eppendorf 1,5 mL et 2 mL (réf. 033290 et 033297, Dutscher SAS, Brumath, France)
- Gants stériles
- Glace
- Bain-marie à 37°C
- Centrifugeuse réfrigérée
- Transilluminateur

3. Cuve à 2lectrophorèse

II. Méthode

Dans un tube eppendorf de 1,5 mL placé dans la glace, 15 µL de l'ADN phagique extrait et purifié ont été mélangés avec 1,5 µL d'enzyme de restriction (soit 15 UI), 2,5 µL du tampon spécifique de chacune des enzymes et 6 µL d'eau puis incubés pendant 3 heures au bain-marie à 37°C. L'enzyme de restriction a été inactivée en incubant le mélange au bain-marie à 65 °C pendant 15 min puis refroidissement rapide dans la glace.

Après une brève centrifugation réalisée afin de récupérer les goutes d'évaporation, les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 0,8 % dans un tampon de migration TBE 1 X. Pour cela, 25 µL de produit restreint additionné de 5 µL de tampon de charge ont été soumis à voltage constant 50 Volts pendant 16 heures. Les produits amplifiés ont été révélés après coloration dans un bain de bromure d'éthidium à 0,1 µg/mL puis visualisés sous ultraviolet et photographiés. Les marqueurs de taille moléculaire XIV et Raoul ont été utilisés pour estimer les tailles de fragments.

Annexe 11. PCR en temps réel de gènes prophagiques de *S. agalactiae* sur l'ADN phagique.

Amplification par PCR en temps réel de 18 fragments de prophage décrits chez *S. agalactiae*.

En plus des 10 fragment d'ADN prophagique décrits dans l'annexe 5 et le tableau 18, huit autres fragment, SAG0598, SAG0610, SAK_0646, SAK_0613, SAK_2079, SAL_0666, SAI_0620, SAJ_2357, également identifiés par analyse des séquences prophagiques présentes sur les souches séquencées de *S. agalactiae*, ont été recherchés par PCR en temps réel chez les phages isolés.

Les amorces pour amplifier ces 8 fragments d'ADN prophagique ont été également déterminées en utilisant le logiciel Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), et sont représenté au niveau du tableau 20.

Matériels et produits (voir l'annexe 5)

I. Méthode

L'amplification a été réalisée avec un mélange réactionnel de 25 µL constitué de 12,5 µL iQ SYBR green super Mix, de 0,5 µM de chacune des amorces utilisées et de 5 µL de matrice d'ADN phagique extrait. Quarante cycles d'amplification ont été réalisés, chacun comprenant une dénaturation à 94°C pendant 10 sec, une hybridation des amorces à une température variable selon le gène pendant 10 sec (voir tableaux 18, 20), une élongation à 72°C pendant 30 sec. Les produits amplifiés ont ensuite été refroidis à 35°C et soumis à une augmentation de la température de 0,2°C par pallier de 10 sec jusqu'à 95°C afin d'obtenir le Tm des amplicons.

Tableau 20. Huit fragments d'ADN prophagique amplifiés : gènes cibles, souches références, amorces, température d'hybridation, et taille de l'amplicon.

Fragment d'AND prophagique	Description du gène cible	Souche(s) référence(s)	séquence (5'→3') de l'amorce pour la PCR Sens Anti-Sens	Temperature d'hybridation	Taille de l'amplicon (bp)
SAG0598	Prophage Lambda Sa1 N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase family protein	*S. agalactiae* 18RS21, 2603V/R	ACA AAT ATC ACG CAC TAA AC TCT TGA CCA GTC CAT TCC	52°C	289
SAG0610	Hypothetical protein Sa1	2603V/R, H36B, COH1, 515, A909, CJB111	TTG ATA TAC TCC ACA TTA GC CCT TCC TTG TTT CAT ACG	49°C	192
SAK_0646	Prophage Lambda Sa03, tail component, putative	A909, 2603V/R	AAT ACA ATA CAA TAG AAG ATT AC TCC GTC TTG AGT ATA GCT	54°C	233
SAK_0613	Prophage ps2 protein 07, excisionase	H36B, A909	GAC TAT GGC GAT TAT GTG CTA TGC GTT GGA TTA TTG	49°C	128
SAK_2079	Prophage Sa05, ArpU family transcriptional regulator	A909, COH1, CJB111, 18RS21	GCG TTA CCC AGT TTG ATA TAG GAA ATA AGC CGA GAA TGC	47°C	67
SAL_0666	Putative prophage LambdaSa1, minor structural protein (remnant)	515, 18RS21	CAT AGA GAT ACA CGA CAT C TGA ACG CTT GAT AAC ATC	50,5°C	289
SAI_0620	Phage holing, LL-H family (remnant)	H36B, 515, 2603V/R	CTG TGG AAG TTG GTA TTA AG TCT GTT AAA CTG ATA TTA TAT TGC	47°C	94
SAJ_2357	Gp31 (remnant)	18RS21, 515	ACT ATT ATA TCA TAC GAG GAG ATT GCT TCT AAT TCT TGT TC	50,5°C	247

Mazen Salloum

Les infections à *Streptococcus agalactiae* chez l'adulte
Émergence et impact de la lysogénie

Streptococcus agalactiae, associé initialement à la mammite bovine, est depuis les années 1960s, le principal responsable des infections invasives materno-foetales. Les souches responsables des infections invasives néonatales sont majoritairement de sérotype III et appartiennent à la division phylogénétique I en MLEE et au complexe clonal CC17 en MLST. Elles sont fréquemment lysogènes et leurs prophages sont aptes à lyser des populations rivales de *S. agalactiae* appartenant à l'ensemble des clones *intra-species* (Domelier *et al.*, 2009), suggérant l'importance des mécanismes de transduction et de la lysogénie dans l'évolution adaptative et l'émergence du clone CC17.

Depuis les années 1990s, *S. agalactiae*, commensal fréquent de l'homme, est responsable d'infections invasives émergentes chez le sujet âgé présentant des facteurs de risque d'infection. Ces infections sont le plus souvent des bactériémies, des infections cutanées ou ostéo-articulaires. Les souches associées à ces infections sont rarement de sérotype III et n'appartiennent pas au CC17.

Notre premier objectif a été de préciser les caractéristiques des souches responsables des infections invasives émergentes de l'adulte. Nous avons étudié 261 souches de *S.* agalactiae, soit 133 souches isolées d'infections invasives chez l'adulte (24 infections cutanées, 34 infections ostéo-articulaires, 67 bactériémies, 8 méningites), 67 souches isolées d'infections invasives néonatales (20 bactériémies, 47 méningites) et 61 souches colonisantes isolées chez l'adulte asymptomatique (souches uro-génitales, de la peau, de la gorge et de la marge anale). Chaque souche a été sérotypée puis analysée par MLST, macrorestriction de l'ADN génomique et en terme de contenu prophagique.

Nous montrons que les souches associées aux infections invasives chez l'adulte appartiennent majoritairement aux sérotypes V et Ia.

Nous montrons que les souches associées aux infections invasives chez l'adulte appartiennement majoritairement aux deux clones phylogénétiquement éloignés, CC1 et CC23. Nos résultats montrent que les clones associés aux souches invasives présentent des caractéristiques particulières. Le CC23 est un clone génétiquement très hétérogène dont les souches sont caractérisées par des profils PFGE très divers et un contenu prophagique fréquent et diversifié. A l'opposé, le CC1 est génétiquement homogène. Tel que le CC17 dont il est génétiquement éloigné, le CC1 présente un nombre limité de STs suggérant une exposition limitée des gènes de ménage aux mutations ou recombinaisons, et une homogénéité remarquable en terme de contenu en prophages. De plus, tel que pour le CC17, l'analyse PFGE montre une diversité importante des souches au sein du clone CC1 et l'existence de sous-clones parmi lesquels un nombre limité regroupe les souches invasives.

Enfin, nous montrons des caractéristiques moléculaires semblables pour les souches isolées des infections cutanées, des infections ostéo-articulaires, et des bactériémies chez l'adulte, suggérant que la peau et les tissus mous puissent être une porte d'entrée possible pour la bactériémie et pour les infections de l'os et des articulations.

L'étude du contenu prophagique des souches invasives de l'adulte montre une lysogénie fréquente, comparable à celle des souches associées aux infections invasives néonatales. Ceci suggère l'importance de la lysogénie dans la spécialisation de ces souches particulièrement aptes à infecter la peau, les os, et les articulations chez l'adulte. Aussi, dans un deuxième temps, nous avons isolé des phages tempérés de souches associées à des infections invasives cutanées et ostéo-articulaires afin de les caractériser et de les comparer aux phages isolés récemment de souches représentatives des infections materno-foetales (Domelier *et al.*, 2009). Sept phages ont été isolés et étudiés. Leur caractérisation en microscopie électronique a permis de les classer dans la famille des *SIPHOVIRIDAE*. L'analyse par restriction enzymatique de l'ADN phagique utilisant trois enzymes *Hind*III, *Eco*RI, et *Cla*I, l'amplification par PCR de fragments d'ADN prophagique, et l'étude de leur spectre lytique, a montré la diversité des phages isolés et leur différence des phages isolés des souches associées aux infections materno-foetales. L'étude de la susceptibilité aux 7 phages des 261 souches de *S. agalactiae* a montré que les phages isolés de souches lysogènes de CC23 présentent un spectre lytique restreint aux souches de CC23. A l'opposé, et comme cela a été démontré pour les phages isolés de souches de CC17, les phages isolés de souches lysogènes de CC1 ont présenté un spectre lytique étendu aux souches de tous les clones *intra-species*.

Mots clés : *Streptococcus agalactiae*, bactériophage, prophage

Soutenance de thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université François Rabelais

Les infections à *Streptococcus agalactiae* chez l'adulte
Émergence et impact de la lysogénie

Mazen SALLOUM
EA 3854 « Bactéries et Risque Materno-fœtal »

Directeur: Roland QUENTIN
Co-Directeur: Nathalie VAN DER MEE-MARQUET
Rapporteurs: Estelle JUMAS-BILAK
Bertrand PICARD
Examinateurs: Pierre Yves DONNIO
Laurent MEREGHETTI

Streptococcus agalactiae

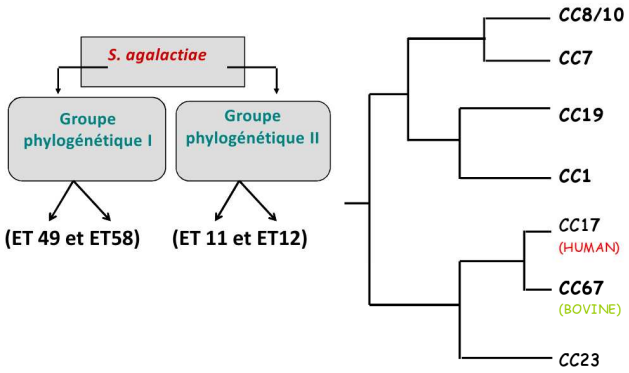
- Cocci à Gram positif, β hémolytique
- Génome mesurant 2, 220 kpb: «core-génome» 80 %
- Pathogénie:
  - Adhésion et invasion

    FbsA, FbsB, Lmb, Srr-1, Srr-2, BibA, αC, *iagA*, β-H/C, CAMP
  - Échappement immunitaire

    Capsule, superoxide dismutase, C5a péptidase, CspA
- Caractérisation des souches: Sérotypage (Ia, Ib, II-IX), PFGE, MLEE puis MLST

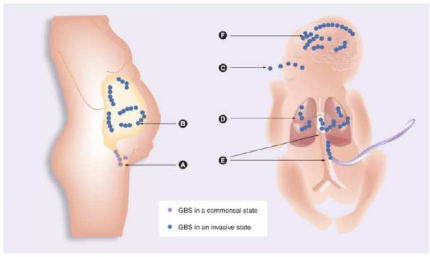
Caractérisation moléculaire de l'espèce

MLEE (Quentin 1995) **MLST** (Jones 2003, Héry Arnaud 2007)



S. agalactiae chez les nouveau-nés

- Colonisation digestive et génito-urinaire: 29 % (van der Mee-Marquet, 2008)
- Infections précoces: 80 à 85 %

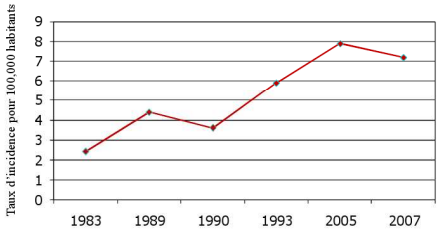


Rajagopal, 2009

- Infections tardives: septicémie et méningite

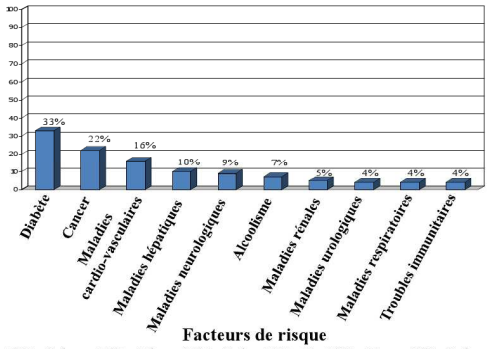
S. agalactiae chez l'adulte

- Émergence des infections



Schwartz *et al.*, 1991; Farley *et al.*, 1993; Skoff *et al.*, 2009; Blumberg *et al.*, 1996; Phares *et al.*, 2008

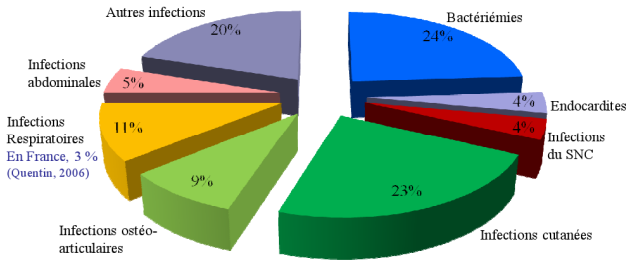
S. agalactiae chez l'adulte



Blancas, 2004 ; Bolanos, 2001 ; Falagas, 2006 ; Farley, 1993 ; Ho, 2006 ; Huang, 2006 ; Jackson, 1995 ; Lefebvre, 2007 ; Perovic, 1999 ; Schrag, 2000 ; Skoff, 2009 ; Trivalle, 1998 ; Tyrrell, 2000 ; Wang, 2002

- Au moins un facteur de risque dans plus de 70 % des cas

Les infections à *S. agalactiae* chez l'adulte



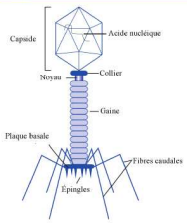
Bayer, 1976 ; Blancas, 2004 ; Bolanos, 2001 ; Colford, 1995 ; Falagas, 2006 ; Farley, 1993 ; Gallagher, 1985 ; Ho, 2006 ; Huang, 2006 ; Jackson, 1995 ., Kim, 2001 ., Larppanichpoonphol, 2001 ., Lefebvre, 2007 ., Lerner, 1977 ., Munoz, 1997 ., Opal, 1988 ., Schugk, 1997 ; Schwartz, 1991 ; Skoff, 2009 ; Skogberg, 1988 ; Trivalle, 1998 ; Tyrrell, 2000 ; Verghese, 1986 ; Wang, 2002

- Taux de mortalité: 18 % (6 à 35 %)

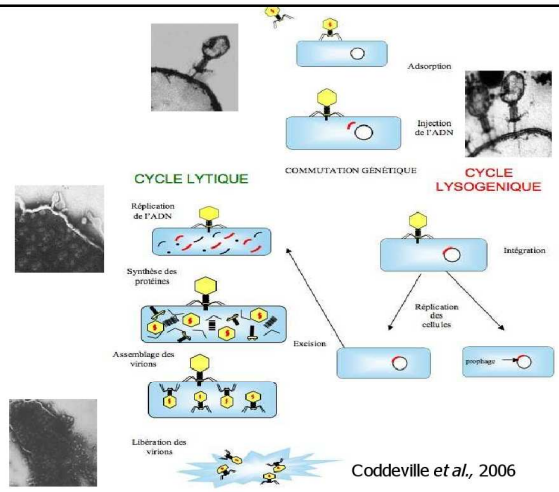
Les bactériophages

- Virus qui infectent uniquement les bactéries
- 10^{30} à 10^{32} bactériophages sur terre
- Découvert par Twort et d'Herelle en 1917
- Dés les années 1920, utilisation en thérapeutique
- Première description de la lysogénie en 1921 par Bordet
- Observation microscopique en 1940
- 5568 phages décrits en microscopie

Structure et Taxonomie



- La nomenclature est basée sur
  - La nature de leur acide nucléique
  - Leur morphologie (symétrie de capside, enveloppe, queue)
- ICTV: 20 familles, en quatre groupes morphologiques
- Phages caudés
- Phages pléiomorphiques
- Phages filamenteux
- Phages polyédriques



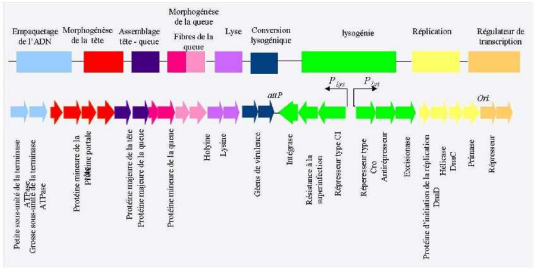
Coddeville *et al.*, 2006

Cycle lysogénique

- Intégration spécialisée:
  - Séquences riches en AT
  - ARNt
  - Régions intergéniques
  - ORF
- Intégration au hasard
- Cycle lysogénique:
  - Absence d'expression des gènes phagiques impliqués dans le cycle productif
  - Protection contre l'infection avec un phage homologue
- Transduction: acquisition de gènes de « fitness »

Génomique des phages et des prophages

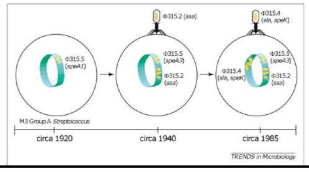
- La taille du génome de phage varie de 2435 à 316674pb
- Le génome est organisé en modules fonctionnels



- Evolution du génome : théorie des modules

Impact de la lysogénie sur les bactéries

- Acquisition de facteurs de virulence
  - Toxine diphtérique chez *Corynebacterium diphteriae* (Freeman, 1951)
  - Shiga-toxine et bactériophage chez *Escherichia coli* (O'Brien, 1984)
  - Toxine cholérique chez *Vibrio cholera* (Waldor et Mekalanos, 1996)
  - Superoxide dismutase chez *S. typhimurium* (Figueroa-Bossi, 1999)
  - évolution de *S. pyogenes* M3 entre 1920, 1940, et 1990 (Banks, 2002)



Impact de la lysogénie sur les bactéries

- Adaptation au système écologique
  - Adhérence, *S. pneumoniae* (Loeffler, 2006)
- Dérégulation de l'expression de gènes bactériens
  - Changement de capacité métabolique, *E. coli* (Chen, 2005)
- Résistance aux antibiotiques
  - *mefA* chez *S. pyogenes* (Giovanetti, 2005)

La lysogénie et *S. agalactiae*

- Première description en 1969 (Russel *et al.*, 1969)
- Analyse génomique: Régions abondantes d'origine phagique (Tettelin *et al.*, 2005; Glaser *et al.*, 2002)
- En 2006: association entre fragments prophagiques et souches de méningite néonatale (Van der mee-Marquet *et al.*, 2006)
- En 2009: isolement et caractérisation de 36 phages de lysogénie (Domelier *et al.*, 2009)
  - *SIPHOVIRIDAE*, 3 morphotypes
  - Phages spécifiques de chaque lignée phylogénétique
  - Activité lytique spécifique de chaque lignée phylogénétique à l'exception de ST-17

- Émergence de *S. agalactiae* chez l'adulte mais nature des souches impliquées ? :
  - Caractérisation des souches impliquées : Sérotypes, position phylogénétique, diversité génétique.
  - Comparaison : souches infectieuses adultes/souches colonisantes chez l'homme/souches invasives chez le N.Né
- Importance de la lysogénie chez *S. agalactiae et* dans les souches du N.Né, qu'en est t-il pour les souches adultes ?
  - Étude du contenu prophagique
  - Induction, isolement, et caractérisation des phages
  - Comparaison : souches infectieuses adultes/souches colonisantes chez l'homme/souches invasives chez le N.Né

- Rechercher d'éventuelles spécificités des souches infectantes chez l'adulte par rapport aux souches colonisant les muqueuses et aux souches d'infections néonatales
- Rechercher des arguments suggérant un éventuel lien entre évolution/lysogénie/capacités pathogènes
- Isoler et caractériser des phages présumés être impliqués dans l'évolution de l'espèce vers la pathogénicité chez le patient adulte

Première travail

Caractérisation des souches de *S. agalactiae* isolées d'infections chez l'adulte

- Sérotypes
- Position phylogénétique
- Diversité génétique

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les souches

Infections adulte		133
	Cutanées (SKI)	24
	Ostéoarticulaires (OAI)	34
	Bactériémie (AB)	67
	Méningite (AM)	8
Colonisation adulte	HCol	61
Infections néonatales		67
	Bactériémie (NB)	20
	Méningite (NM)	47
Total		261

MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Caractérisation des souches de *S. agalactiae*
  - Sérotypage: agglutination (sérotypes I, II, III)

    PCR (sérotypes Ia, Ib, III, IV, V, et VI) (Kong, 2002)
  - MLST: 7 gènes de ménage: adhP, pheS, atr, glnA, sdhA, glcK, et tkt (Jones, 2003)

    eBURST v3, SplitsTree4 v4.11.3 (Huson, 2006), Méthode de Feil (Feil, 2000)
  - PFGE: enzyme *Sma*I

    Taxotron (UPGMA)

    Indice de diversité génétique, Hunter et Gaston (Hunter, 1988)

RÉSULTATS: Caractérisation des souches

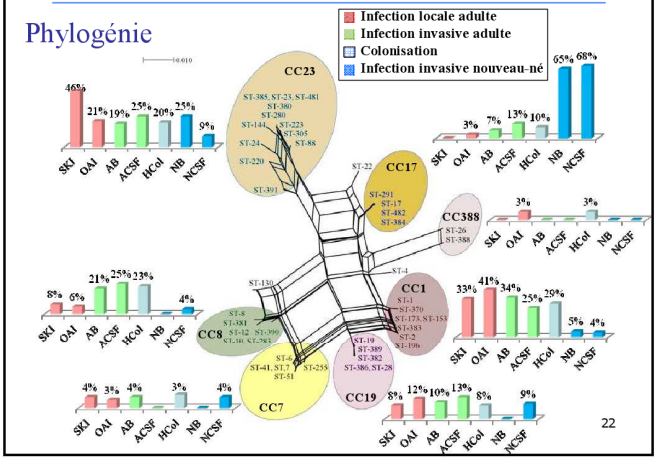
Sérotypes des souches

Sérotype	No. de souches (%) de *S. agalactiae* isolées						
	Chez l'adulte					Chez le nouveau-né	
	Infection cutanée	Infection ostéoarticulaire	Bactériémie	Méningite	Colonisation	Bactériémie	Méningite
Ia	9 (38)	8 (24)	15 (22)	2 (25)	11 (18)	4 (20)	4 (9)
Ib	2 (8)	2 (6)	12 (18)	2 (25)	11 (18)		3 (6)
II	1 (4)		4 (6)		3 (5)		
III	3 (13)	10 (29)	12 (18)	2 (25)	13 (21)	15 (75)	38 (81)
IV	1 (4)	1 (3)	2 (3)		4 (7)		
V	8 (33)	13 (38)	21 (31)	2 (25)	12 (20)	1 (5)	2 (4)
NT			1 (1)		7 (11)		

- Infections chez l'adulte: sérotypes V et Ia majoritaires
- Infections invasives néonatales: sérotype III

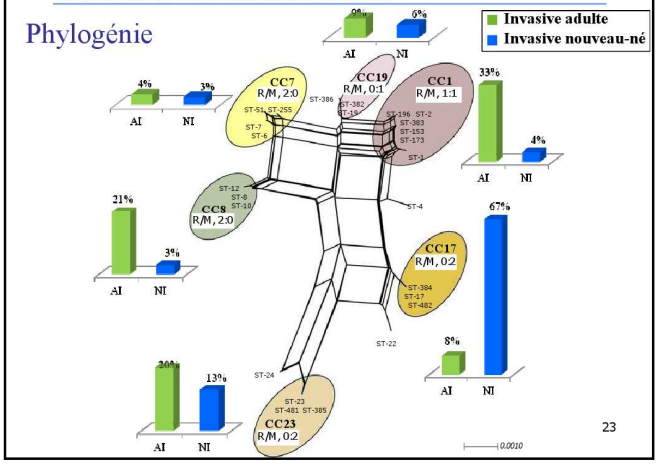
RÉSULTATS: Caractérisation des souches

Phylogénie



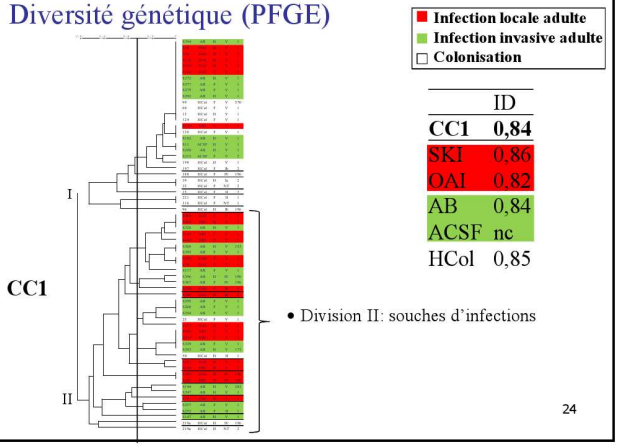
RÉSULTATS: Caractérisation des souches

Phylogénie



RÉSULTATS: Caractérisation des souches

Diversité génétique (PFGE)

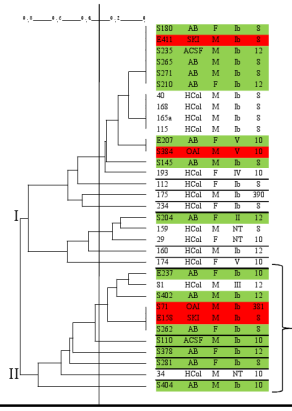


	ID
CC1	**0,84**
SKI	0,86
OAI	0,82
AB	0,84
ACSF	nc
HCol	0,85

- Division II: souches d'infections

RÉSULTATS: Caractérisation des souches

Diversité génétique (PFGE)



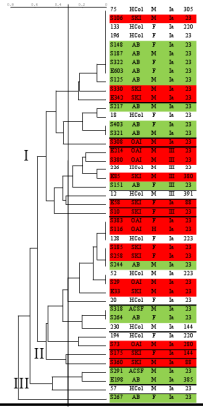
- Infection locale adulte
- Infection invasive adulte
- Colonisation

	ID
CC8	0,79
SKI	nc
OAI	nc
AB	0,79
ACSF	nc
HCol	0,88

- Division II: souches d'infections

RÉSULTATS: Caractérisation des souches

Diversité génétique (PFGE)



- Infection locale adulte
- Infection invasive adulte
- Colonisation

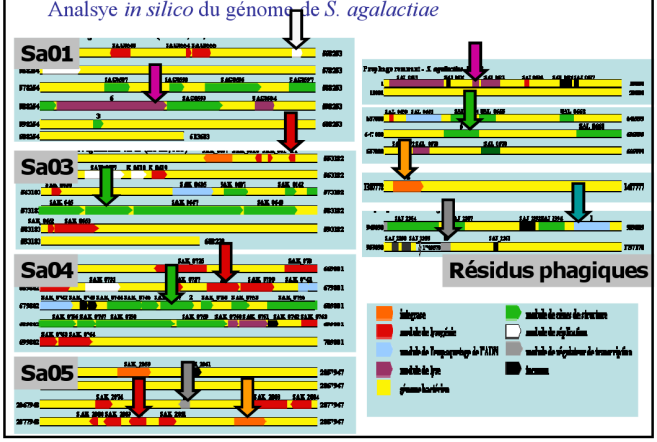
	ID
CC23	0,88
SKI	0,89
OAI	0,81
AB	0,83
ACSF	nc
HCol	0,91

Deuxième Travail

Étude du contenu prophagique des souches

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Analyse *in silico* du génome de *S. agalactiae*



MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Détection de fragments prophagiques: PCR

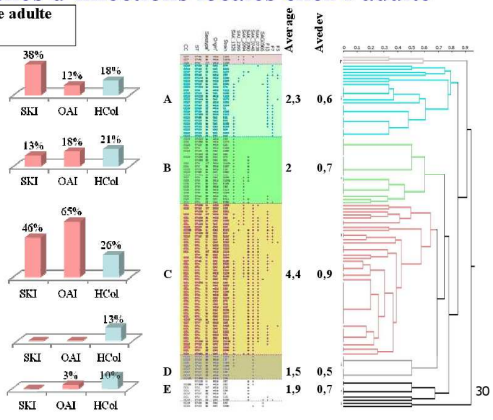
Prophage DNA fragment	Target gene description	Reference strain(s)	PCR primer		Amplicon size (bp)
			Orientation	sequence (5'→3')	
F5	A terminase large subunit	*S.pyogenes* 10394	Forward	ATC TTA GCA AGC TCC CAC GA	341
			Reverse	TCA ACG GCT GGT ATG GAT TT	
F7	A phage-associated cell wall hydrolase and a phage-associated lysin	*S. pyogenes* 10394 SpyM6	Forward	AGG CCG CAA CCT TAA ATC T	497
			Reverse	CGA GTG AAA ACG TGT CTG G	
F10	A phage-encoded transcriptional regulator, ArpU family	*S. pyogenes* 5005	Forward	TCA GCA GAG GAA GGA AAG GA	510
			Reverse	CAA TCA AAG AGC CCT CCC TA	
SAG0566	Single-strand binding protein prophage lambda Sa1	*S. agalactiae* 2603 V/R 18RS21	Forward	GTG CTT TGG TTG GAA TTA C	132
			Reverse	TCT GTT GTT GGC TAT TGC	
SAK_0738	DNA methylase prophage lambda W4	CJB111 A909	Forward	GGG ATA AGA AAG CCA ATC	172
			Reverse	ACA TAG ATA GAC GCA TCG	
SAK_0748	Phage major capsid protein HK97 family	CJB111 A909	Forward	TGA TTT CTC TTA CTA CTG GAT TG	136
			Reverse	CGC TTC TGG TAG AAC GAG	
SAK_2090	BRO domain protein, prophage antirepressor prophage Sa05	A909 H36B CJB111	Forward	TAG AGC ACC AAG GCG AAT G	102
			Reverse	AAA CGA CCT CAT CAA CTA AAC G	
SAK_2094	Prophage Sa05 site-specific recombinase phage integrase family	A909 H36B CJB111 18RS21 COH1	Forward	AAA GAG TAA AGC ATT TCG	526
			Reverse	CCT AAT CTA TAT TGG AGT TC	
SAJ_2395	Phage terminase-like protein, large subunit (remnant)	18RS21 515	Forward	TGA TAG ATA AGT ATG TGA GAT TC	251
			Reverse	TTG TCT TTC CGA GTT AGC	
SAK_1326	Site-specific recombinase, phage integrase family (remnant)	A909 H36B CJB111	Forward	TTT GAC CTA CGG GAT TAT G	261
			Reverse	TGA ACG CCA TCT TAG AAG	

- Analyse du contenu prophagique: Systat, Coefficient de Jaccard Sneath

RÉSULTATS: Contenu prophagique du génomes des souches

Les souches d'infections locales chez l'adulte

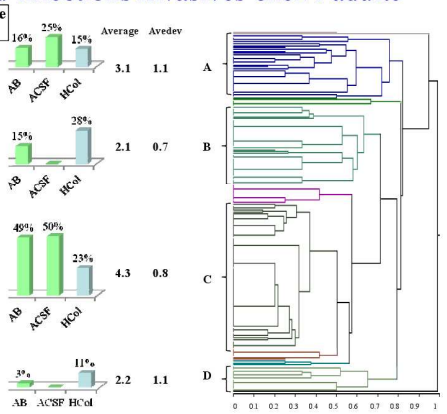
- Infection locale adulte
- Colonisation



RÉSULTATS: Contenu prophagique du génomes des souches

Les souches d'infections invasives chez l'adulte

Infection invasive adulte
Colonisation

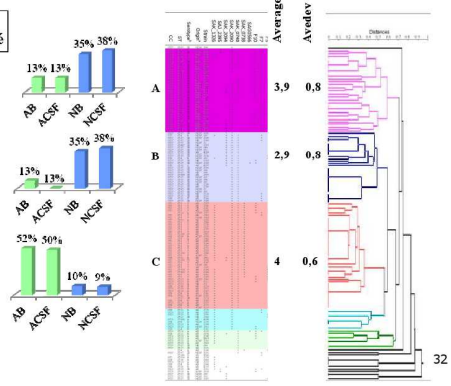


RÉSULTATS: Contenu prophagique du génomes des souches

Les souches isolées d'infections invasives

Comparaison aux souches invasives néonatales

Invasive adulte
Invasive nouveau-né



32

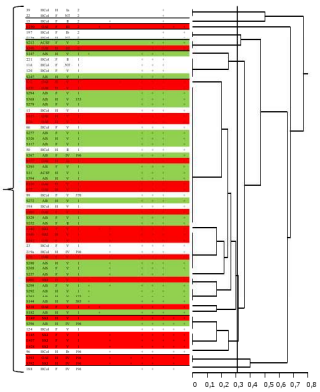
RÉSULTATS: Contenu prophagique du génomes des souches

Clone CC1 chez l'adulte

Infection locale adulte
Infection invasive adulte
Colonisation

	ID
CC1	**0,57**
SKI	0,68
OAI	0,40
AB	0,17
ACSF	nc
HCol	0,82

Average 4,2
Avedev 0,8



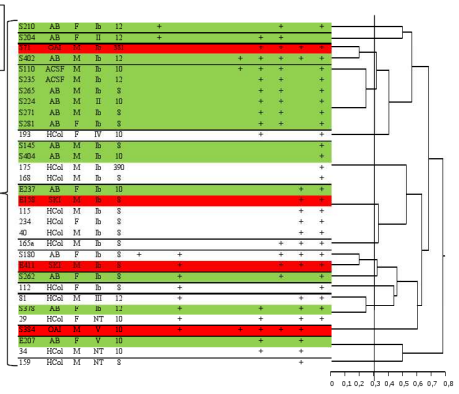
RÉSULTATS: Contenu prophagique du génomes des souches

Clone CC8 chez l'adulte

Infection locale adulte
Infection invasive adulte
Colonisation

Average 2,8
Avedev 0,9

	ID
CC8	**0,93**
SKI	nc
OAI	nc
AB	0,92
ACSF	nc
HCol	0,88



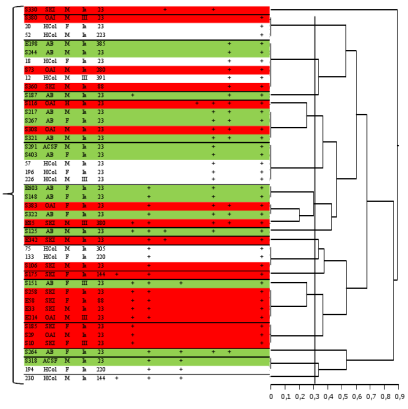
RÉSULTATS: Contenu prophagique du génomes des souches

Clone CC23 chez l'adulte

Infection locale adulte
Infection invasive adulte
Colonisation

Average 2,6
Avedev 0,8

	ID
CC23	**0,93**
SKI	0,93
OAI	0,95
AB	0,91
ACSF	nc
HCol	0,89



Induction, isolement, et caractérisation de phages de souches responsables d'infections chez l'adulte

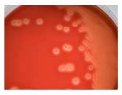
36

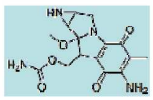
Isolement des phages

Induction des phages

58 souches

Traitement par la mitomycine C







Obtention de 58 filtrats contenant potentiellement des phages

Isolement des phages

Seconde étape : isolement des phages

58 filtrats



58 souches « indicatrices »





> 20 plages de lyse

Au moins 2 souches



7 suspensions phagiques issues de 7 souches donneuses

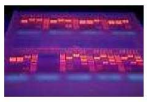
Caractérisation des phages

7 suspensions phagiques

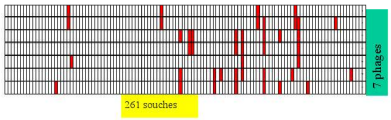
Microscopie électronique



Restriction enzymatique *Hind*III, *Cla*I, *Eco*RI

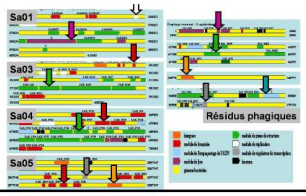


Activité lytique des 7 phages





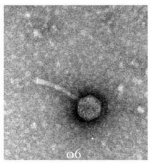
PCR « multilocus »



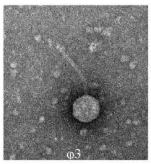
Microscopie électronique

- Têtes: symétrie icosaédrique, non enveloppées, 62 nm
- Queue longue, non contractile, striations, fibres terminales

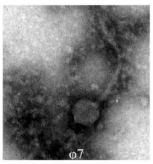
  ⇨ Les 7 phages appartiennent à la famille des *SIPHOVIRIDAE*
- Trois morphotypes: A, B, et C



Morphotype A
108 nm ± 10 nm
N=1

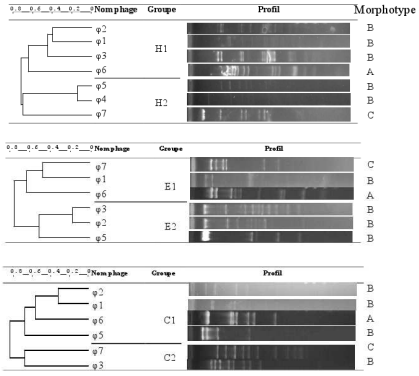


Morphotype B
145 nm ± 10 nm
N=5



Morphotype C
180 nm ± 10 nm
N=1

Restriction enzymatique de l'ADN phagique

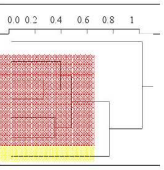


- Une diversité génétique importante pour les 7 phages isolés

RÉSULTATS: Caractérisation des phages

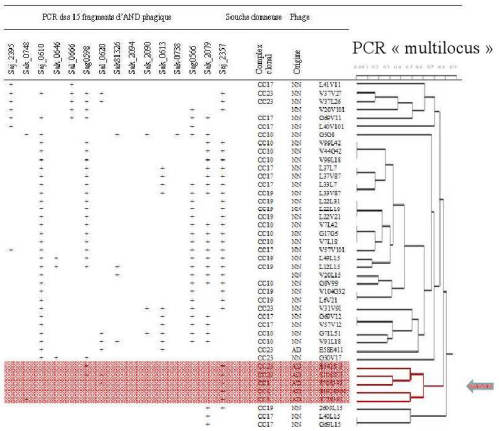
PCR « multilocus »

Souche donneuse	Souche propagation	Profils de restriction avec *Hin*dIII	*Eco*RI	*Cla*I	Morphotype	Phage
E85	S330	H1	E1	C1	A	φ6
S73	S342	H2	-	-	B	φ4
S73	S106	H2	E2	C1	B	φ5
S393	S70	H1	E2	C1	B	φ2
S360	S392	H1	E2	C2	B	φ3
S393	S72	H1	E1	C1	B	φ1
E411	E58	H2	E1	C2	C	φ7

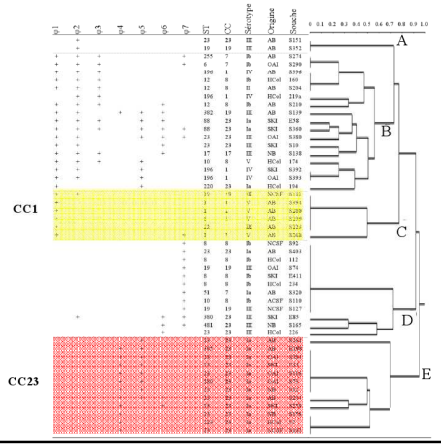


- Association entre les morphotypes et le contenu en fragments
- Diversité génétique des phages isolés

RÉSULTATS: Comparaison aux phages isolés de souches materno-foetales



RÉSULTATS: Activité lytique des phages sur 261 souches de *S. agalactiae*



RÉSULTATS: Corrélation entre lysogénie et position phylogénétique des souches lysogènes

Phage	ST (CC) de la souches donneuse	No. (%) de souches lysées du complexe clonal							Total
		CC1	CC7	CC8	CC17	CC19	CC23	Autres	
φ1	1 (1)	7 (33)	2 (10)	3 (14)	1 (5)	2 (10)	5 (24)	1 (5)	21
φ2	1 (1)	4 (21)	2 (11)	4 (21)	1 (5)	2 (11)	6 (32)		19
φ3	196 (1)	2 (18)	2 (18)	4 (36)	1 (9)		2 (18)		11
φ4	23 (23)					1 (8)	11 (92)		12
φ5	23 (23)	2 (13)			1 (6)		1 (6) 12 (75)		16
φ6	23 (23)				1 (8)	1 (8)	1 (8) 9 (75)		12
φ7	88 (23)	1 (6)	3 (19)	5 (31)		2 (13)	5 (31)		16

- Les phages de ST1 lysent des souches appartenant à tous les CCs
- Les phages de ST23 lysent préférentiellement les souches de CC23 (P = 0,002)

DISCUSSION ET CONCLUSION

- **Les souches de *S. agalactiae* responsables d'infections chez l'adulte appartiennent à des lignées phylogénétiques plus restreintes (CC1, CC8, et CC23) que celles auxquelles appartiennent les souches qui colonisent les muqueuses de l'être humain**

Le risque infectieux des souches colonisantes dépond de l'hôte, mais aussi de la nature des souches colonisantes

DISCUSSION ET CONCLUSION

- **les lignées phylogénétiques les plus impliquées dans les infections de l'adulte (CC1, CC8, et CC23) sont rarement impliquées dans les infections invasives des nouveau-nés qui, pour leur grande majorité, appartiennent à un seul complexe clonal, le CC17**

  - CC1, CC8, et CC23 (Flore digestive) (van der Mee-Marquet, 2008)
  - CC17 (Voie vaginale)

Tractus digestif: porte d'entrée possible pour les infections de l'adulte

DISCUSSION ET CONCLUSION

- **Parmi les lignées phylogénétiques impliquées dans les infections de l'adulte, aussi bien locales qu'invasives, les souches de la lignée CC1 ont une place importante**

  - Émergence dans les années 1990
  - Phages produits: capacité de lyser les souches de l'ensemble des autres lignées phylogénétiques

Les phages produits par les souches de CC1: un avantage sélectif en termes de colonisation et d'infections

49

DISCUSSION ET CONCLUSION

- **À l'intérieur de chaque lignée phylogénétique plus particulièrement responsable d'infections chez l'adulte, l'étude de la diversité génétique montre que les souches infectantes constituent une population particulière au sein des complexes clonaux CC1 et CC8**

À l'intérieur de chaque lignée phylogénétique: le pouvoir invasif des souches peut être relativement variable

50

DISCUSSION ET CONCLUSION

- **Les souches de chaque lignée phylogénétique ont subi de mécanismes de lysogénie spécifiques**

La lysogénie : rôle actif dans la diversification de l'espèce et l'adaptation de certain clones à certaines niches écologique ?

Ou

Coïncidence: Capacité des souches à coloniser une niche/Contenu particulier en phages spécifique de la niche ?

La lysogénie participe à l'adaptation et à l'évolution de l'espèce (cyanophages; Suttle 2005, 2007)

51

DISCUSSION ET CONCLUSION

- **Parmi les souches isolées chez l'adulte, les souches infectantes diffèrent significativement des souches colonisantes par une plus grande richesse en éléments prophagiques dans leur génome**

Un lien possible lysogénie/pouvoir pathogène ?

- Inactivation de gènes bactériens ou modification de la transcription et l'expression de certains gènes de virulence (Lee *et al.*, 1986; Coleman *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2005)
- Importation de nouveau gènes de virulence (Freeman, 1951; O'Brien, 1984; Waldor et Mekalanos, 1996; Figueroa-Bossi, 1999; Banks, 2002)

52

DISCUSSION ET CONCLUSION

- **Chez *S. agalactiae*, des mécanismes plus complexes**

  - Optimiser l'expression de certains facteurs de virulence pré-existants ?
    L'intégration d'éléments génétiques mobiles dans certaines régions intergéniques permet d'augmenter l'expression de *lmb* (Al Safadi 2010)
  - Moduler l'expression de gènes de virulence ?
    Les souches invasives néonatales, riches en éléments prophagiques: des pertes cataboliques (Domelier, 2008)
  - Apport de promoteurs additionnels ?
  - des conséquences de l'action d'ARN non codants ou de courtes séquences palindromiques de type CRISPR ?

53

Perspectives

- **Étudier les phages isolés de souches de la lignée CC1**
  - Séquençage des 3 phages
  - Construction d'une souche lysogène à partir d'une souche sensible
  - Localisation du site d'insertion au niveau du génome
  - Comparaison: souche sensible/souche lysogène
  - Métabolisme (Bilog Phenotype Microarray; 1920 substrats)
  - Transcription de gènes de virulence
  - Expression protéique

54

Remerciement

à Madame le Docteur Nathalie van der Mee-Marquet

à Monsieur le Professeur Roland Quentin

à Madame le professeur Estelle Jumas-Bilak

à Monsieur le professeur Bertrand Picard

à Mosieur le professeur Pierre-Yves Donnio

à Mosieur le docteur Laurent Mereghetti

à Madame le docteur Anne-Sophie Domelier

à Monsieur Pierre-Yves Sizaret

à Madame le docteur Claire de Gialluly

à Madame le docteur Marie-Frédérique Lartigue

à Monsieur le docteur Philippe Lanotte

à Madame le docteur Agnès Rosenau

à Patricia Play et Laurence Arnault

à tous les membres de l'équipe et tous les internes du laboratoire de bactériologie à Trousseau

à Claire et Véronique en biochimie à Trousseau

à Yara

55

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 2010, p. 1261–1269 Vol. 48, No. 4
0095-1137/10/$12.00 doi:10.1128/JCM.01820-09
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Molecular Characterization and Prophage DNA Contents of *Streptococcus agalactiae* Strains Isolated from Adult Skin and Osteoarticular Infections[▽]

Mazen Salloum,[1] Nathalie van der Mee-Marquet,[1,2,3]* Anne-Sophie Domelier,[1,2,3] Laurence Arnault,[2] and Roland Quentin[1,2,3]

Equipe d'Accueil 3854, Institut Fédératif de Recherche 136 Agents Transmissibles et Infectiologie, UFR Médecine, Université François Rabelais de Tours, 37032 Tours Cedex, France,[1] and Service de Bactériologie et Hygiène Hospitalière[2] et Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand-Ouest (CRIOGO),[3] Centre Hospitalier Universitaire Trousseau, 37044 Tours Cedex, France

Received 16 September 2009/Returned for modification 8 February 2010/Accepted 16 February 2010

Skin and osteoarticular infections (SKI and OAI, respectively) account for almost one-third of *Streptococcus agalactiae* infections in nonpregnant adults. We evaluated the genetic diversity and phylogeny of 58 *S. agalactiae* strains responsible for adult SKI or OAI and of 61 *S. agalactiae* strains from cases of adult human colonization (HCol) by serotyping and multilocus sequence typing (MLST). We also assessed the prophage DNA content of the genomes of these strains by a PCR-based method. We found that 63% of SKI and 56% of OAI occurred in people aged 55 years and over. Overall, 71% of SKI strains were of serotype Ia or V, and 91% of OAI strains were of serotype Ia, III, or V. Strains of clonal complexes 1 and 23 (CC1 and CC23) were associated with 79% of SKI cases and 62% of OAI cases. Seven groups of strains, groups A, B, C, D, E, F, and G, were obtained by performing a hierarchical analysis on the basis of prophage DNA-PCR data. We found that 85% of CC1 strains clustered in DNA prophage group D, the group with the highest prophage DNA content (average, 4.4; average of absolute deviations [AVEDEV], 0.9). The CC23 strains displayed the greatest diversity in prophage DNA fragment content, but 47% of CC23 strains clustered in group B, which also had a high average prophage DNA content per strain (average, 2.3; AVEDEV, 0.6). Many (65%) of the OAI strains were in prophage DNA group D, whereas 83% of the SKI strains were in prophage DNA groups B and D. These data suggest that *S. agalactiae* strains from CC1 and CC23 may be subject to particular transduction mechanisms in gene recombination, rendering them particularly capable of invading the skin, bone, or joints in adults.

Streptococcus agalactiae was initially described in 1887 as an animal pathogen causing bovine mastitis (36). Since the 1960s, when human vaginal carriage of *S. agalactiae* was first documented, *S. agalactiae* has frequently been linked to neonatal infections and this bacterium has become the leading neonatal pathogen in developed countries (10, 13, 22, 23, 27, 34). *S. agalactiae* was rarely isolated from nonpregnant adults until 2 decades ago, when such infections began to be reported, particularly for the elderly and for individuals with underlying conditions such as diabetes mellitus, cancer, and a compromised immune system (4, 15, 37, 40–42). However, such infections have been reported even for adults without a known susceptibility factor (29, 33). Many case reports of clinical skin and osteoarticular infections (SKI and OAI, respectively) due to *S. agalactiae* in adults have been published in recent years, with these infections accounting for at least one-third of the reported cases of *S. agalactiae* infection in adults (41, 42).

Many genetic markers have been identified as associated with *S. agalactiae* clones specifically responsible for meningitis in neonates. Indeed, most of the *S. agalactiae* strains isolated from the cerebrospinal fluid of neonates belong to clonal complex 17 (CC17) and have particular mobile genetic elements, such as the group II intron GBSi1 (2) and particular prophage DNA fragments (47). No particular markers or virulence factors of *S. agalactiae* strains have been associated with any other disease.

Phages are important vehicles for horizontal gene exchange within bacterial populations and account for much of the genomic variation observed within bacterial species (8, 11, 28). Temperate phages affect bacterial fitness by modifying anchor points for genomic rearrangements, by disrupting genes, by protecting against lytic infection, by lysing competing strains through prophage induction, and by introducing new fitness factors (8, 19). Prophage acquisition, accounting for much of the molecular diversity of the *Streptococcus pyogenes* genome, rendered some of the strains of this species virulent through the acquisition of phage-encoded virulence factors and enhanced pathogen survival by improving resistance to host defenses under certain circumstances (1, 9). Little is currently known about *S. agalactiae* phages. They were first isolated in 1969 (39), and more-recent analyses of sequenced *S. agalactiae* strains have revealed the presence of abundant regions resembling prophages (16, 44, 45). We recently induced phages from *S. agalactiae* strains of various phylogenetic lineages, characterized them molecularly, and determined their lytic activities (12). The various molecular phage groups were found to correspond to particular strain lineages, with specific morphological features and lytic activities, suggesting a role for phage-mediated horizontal gene transfer in the evolution of the

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Bactériologie et Hygiène, Hôpital Trousseau, 37044 Tours Cedex, France. Phone: 33 234 389 430. Fax: 33 247 478 588. E-mail: n.vandermee@chu-tours.fr.

▽ Published ahead of print on 24 February 2010.

Downloaded from jcm.asm.org by Roland Quentin on April 12, 2010

TABLE 1. PCR primers and amplicon sizes used for prophage screening

Prophage DNA fragment	Target gene description	Reference strain(s)	Orientation	PCR primer sequence (5′ → 3′)	Amplicon size (bp)
F5	A terminase large subunit	*S. pyogenes* 10394	Forward	ATC TTA GCA AGC TCC CAC GA	341
			Reverse	TCA ACG GCT GGT ATG GAT TT	
F7	A phage-associated cell wall hydrolase and a phage-associated lysin	*S. pyogenes* 10394 SpyM6	Forward	AGG CCG CAA CCT TAA ATC T	497
			Reverse	CGA GTG AAA ACG TGT CTG G	
F10	A phage-encoded transcriptional regulator, ArpU family	*S. pyogenes* 5005	Forward	TCA GCA GAG GAA GGA AAG GA	510
			Reverse	CAA TCA AAG AGC CCT CCC TA	
SAG0566	Single-strand binding protein prophage lambda Sa1	*S. agalactiae* 2603 V/R 18RS21	Forward	GTG CTT TGG TTG GAA TTA C	132
			Reverse	TCT GTT GTT GGC TAT TGC	
SAK_0738	DNA methylase Prophage lambda W4	CJB111 A909	Forward	GGG ATA AGA AAG CCA ATC	172
			Reverse	ACA TAG ATA GAC GCA TCG	
SAK_0748	Phage major capsid protein HK97 family	CJB111 A909	Forward	TGA TTT CTC TTA CTA CTG GAT TG	136
			Reverse	CGC TTC TGG TAG AAC GAG	
SAK_2090	BRO domain protein, prophage antirepressor Prophage Sa05	A909	Forward	TAG AGC ACC AAG GCG AAT G	102
		H36B CJB111	Reverse	AAA CGA CCT CAT CAA CTA AAC G	
SAK_2094	Prophage Sa05 Site-specific recombinase Phage integrase family	A909 H36B CJB111 18RS21 COH1	Forward	AAA GAG TAA AGC ATT TCG	526
			Reverse	CCT AAT CTA TAT TGG AGT TC	
SAJ_2395	Phage terminase-like protein, large subunit (remnant)	18RS21 515	Forward	TGA TAG ATA AGT ATG TGA GAT TC	251
			Reverse	TTG TCT TTC CGA GTT AGC	
SAK_1326	Site-specific recombinase, phage integrase family (remnant)	A909 H36B CJB111	Forward	TTT GAC CTA CGG GAT TAT G	261
			Reverse	TGA ACG CCA TCT TAG AAG	

species and the emergence of lineages with a more specific role in particular diseases.

In this study, we characterized *S. agalactiae* strains isolated from skin and osteoarticular infections in adults, using serotyping and multilocus sequence typing (MLST) to determine the phylogenetic relationships and molecular features of the strains involved through comparison with the characteristics of strains involved in human colonization (HCol). We used a PCR-based method recognizing *S. agalactiae* prophages to determine the prophage content of strain genomes (12). The genetic relationships between prophage DNA regions of strains were determined by hierarchical analysis. Correlations between the prophage DNA content, the clinical circumstances of isolation, and the phylogenetic position of *S. agalactiae* strains were investigated.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates. We studied 119 strains of *S. agalactiae*. We isolated 24 strains from samples taken from patients with the following skin infections (SKI): whitlows (seven cases), perforating ulcers of the foot (seven cases), cellulitis (two cases), erysipelas (three cases), and cutaneous abscesses (five cases). We studied 34 strains responsible for osteoarticular infections (OAI), isolated from joint fluids in 26 cases and from bone biopsy specimens in 8 cases. All strains were isolated from nonpregnant adult patients (≥18 years of age) admitted to hospitals in various regions of France from 2002 to 2007. We characterized 61 human colonization (HCol) strains previously isolated from nonpregnant adults (48) by the same methods to allow a comparison of the molecular characteristics between these strains and those responsible for SKI and OAI.

Serotyping. Strains were serotyped by PCR, as previously described (26).

MLST. The strains were analyzed by MLST, as described by Jones et al. (24). Strains were grouped into clonal complexes (CCs) with the eBURST software program (http://eburst.mlst.net/). A neighbor-joining tree was generated from allelic profile data by Phylodendron (http://pubmlst.org/).

PCR for detection of prophage DNA fragments in the genomes of *S. agalactiae* strains. We previously identified and characterized bacteriophages and prophage remnants from *S. agalactiae* strain genomes and designed primer pairs recognizing the prophage sequences of *S. agalactiae* bacteriophages for use in PCR (12, 47). Ten of these primer pairs were used here for the evaluation, by PCR, of the prophage content of *S. agalactiae* strains (Table 1). PCR was carried out with a Chromo 4 system instrument (Bio-Rad, Hercules, CA) on DNA isolated from the strains. PCR was carried out in a final volume of 25 μl, containing 5 μl of extracted DNA, a 0.5 μM concentration of each primer, and 1× iQ SYBR green Supermix (Qiagen SA, Courtaboeuf, France) including 3 mM $MgCl_2$. Amplification was performed over 40 cycles of 10 s at 94°C, 10 s at the annealing temperature (45°C for F5, 48°C for F7, 49°C for F10 and SAK_2094, 50.5°C for SAJ_2395 and SAK_1326, 52°C for SAK_0748, or 54°C for SAG0566, SAK_2090, and SAK_0738), and 30 s at 72°C. The reaction products were then cooled to 35°C and subjected to a post-PCR melting cycle by increasing the temperature by 0.2°C for each 10-s cycle, up to 95°C.

The genetic relationships between the prophage DNA regions of strain genomes were investigated by a hierarchical analysis based on the Jaccard dichot-

Downloaded from jcm.asm.org by Roland Quentin on April 12, 2010

TABLE 2. *S. agalactiae* strains from skin and osteoarticular infections and human colonization cases: sexes and ages of individuals and serotypes of strains

Characteristic[a]	No. of individuals (% prevalence) with *S. agalactiae* causing:		
	Skin infection	Osteoarticular infection	Human colonization
Sex			
F	11 (46)	9 (26)	32 (52)
M	13 (54)	25 (74)	29 (48)
Age (yr)			
18–24	2 (8)	2 (6)	3 (5)
25–40	3 (13)	3 (9)	18 (30)
41–54	4 (17)	10 (29)	23 (38)
55–69	6 (25)	7 (21)	11 (18)
≥70	9 (38)	12 (35)	6 (10)
Strain serotype			
Ia	9 (38)	8 (24)	11 (18)
Ib	2 (8)	2 (6)	11 (18)
II	1 (4)		3 (5)
III	3 (13)	10 (29)	13 (21)
IV	1 (4)	1 (3)	4 (7)
V	8 (33)	13 (38)	12 (20)
NT			7 (11)
Total	24	34	61

[a] F, female; M, male; NT, nontypeable.

omy coefficient method, as implemented in the SYSTAT 12 software program. The genetic feature analyzed was the presence of a PCR amplicon corresponding to the prophage sequences studied. An absence of gene amplification was not considered to indicate similarity between the studied strains.

Statistical analysis. Data were analyzed by chi-square tests and Fisher's exact tests to evaluate associations, with a P value of ≤0.05 considered significant.

RESULTS

Relationships of sex and age with infection or colonization rate. *S. agalactiae* skin infections (SKI) were equally distributed between the sexes, like *S. agalactiae* human colonization (HCol) (Table 2). In contrast, *S. agalactiae* osteoarticular infections (OAI) were significantly more frequent ($P = 0.02$) (Table 2) in men (25/34; 74%) than in women (9/34; 26%), whereas no such difference between the sexes was observed for colonization in men (29/61; 48%) and in women (32/61; 52%).

S. agalactiae HCol strains were most frequently isolated from individuals under the age of 55 years (44/61; 72%), whereas *S. agalactiae* SKI and OAI strains were most frequently isolated from individuals aged 55 years and over (15/24 [63%] and 19/34 [56%], respectively; $P = 0.003$) (Table 2).

Serotyping. All *S. agalactiae* strains responsible for SKI or OAI could be serotyped, whereas 7 of the 61 HCol strains (11%) could not be typed (Table 2). More than two-thirds of the strains responsible for SKI (71%) belonged to serotypes Ia (38%) and V (33%), and most of the strains isolated from OAI (91%) were of serotype V (38%), serotype III (29%), or serotype Ia (24%). In contrast, HCol strains were more equally distributed between the various serotypes (5 to 21%) (Table 2).

MLST characterization. We identified 31 different sequence types (STs) among the 119 strains tested. The eBURST software program assigned 114 strains from 28 of the 31 STs to seven clonal complexes (CCs), CC1, CC7, CC8, CC17, CC19, CC23, and CC388 (Table 3). The genetic relationship between the STs and CC is presented as a dendrogram (Fig. 1).

HCol strains were more genetically diverse than the strains responsible for infections; the 61 HCol strains belonged to 23 different STs, with a maximum of 9 strains for a single ST (15%, for ST-1) (Table 3).

The distributions of SKI and HCol strains between the various STs (Table 3) differed significantly ($P < 0.00001$). SKI strains were less diverse, with the 24 strains belonging to only 10 STs. SKI strains were more frequently classified as ST-1 (7/24; 29%) or ST-23 (7/24; 29%) than were HCol strains (9/61 [15%] ST-1 and 5/61 [8%] ST-23). Similarly, the distributions of SKI and HCol strains between the various CCs differed significantly ($P < 0.00001$) (Table 3). SKI strains were more likely to belong to CC1 or CC23 (19/24; 79%) than HCol strains (30/61; 49%).

The distributions of OAI and HCol strains between the various STs (Table 3) differed significantly ($P < 0.00001$). The 34 OAI isolates belonged to 14 STs. OAI strains were more frequently of ST-1 (11/34; 32%) and ST-23 (6/34; 18%) than were HCol strains (9/61 [15%] ST-1 and 5/61 [8%] ST-23). Nevertheless, the distributions of OAI strains and of HCol strains between CCs did not differ significantly ($P = 0.2$), although OAI strains were more likely to belong to CC1 or CC23 (21/34; 62%) than HCol strains (30/61; 49%).

S. agalactiae strains of each serotype were distributed between several STs (Table 3), but the strains of serotypes Ia, Ib, IV, and V were mostly of ST-23 (50%), ST-8 (53%), ST-196 (67%), and ST-1 (70%), respectively. Serotype Ia, Ib, and V isolates belonged principally to CC23 (86%), CC8 (73%), and CC1 (73%), respectively.

Prophage DNA fragments in the *S. agalactiae* genome. The prophage DNA fragments studied here were not detected by PCR in four *S. agalactiae* strains, all isolated from HCol cases. For each of the remaining 115 strains, PCR amplified 1 to 7 of the 10 prophage DNA fragments studied. The genetic relationships between the prophage DNA regions of strain genomes were represented as a dendrogram (Fig. 2). This analysis assigned the strains to seven major prophage DNA groups, A to G. The natures and frequencies of the prophage DNA fragments amplified from the strains differed significantly between prophage DNA groups (Table 4) ($P < 0.00001$). Three different patterns of prophage DNA fragment amplification were observed in these groups (Table 4). For the 49 strains of prophage group D, all the prophage targets studied were found in at least one strain and PCR amplified a large number of prophage DNA fragments in each strain (average, 4.4) (Fig. 2). For the 24 strains of prophage group B, a large number of prophage DNA fragments were amplified (only one prophage sequence was never amplified [SAK_0748]) and the mean number of prophage DNA fragments amplified per strain was 2.3 (Fig. 2). Only one or two prophage DNA fragments were amplified for 35 strains from the 42 strains of the other five prophage DNA groups (A, C, E, F, and G). In each of these groups, the mean number of prophage DNA fragments amplified per strain was ≤2 (Fig. 2).

Strains of the three different clinical origins (SKI, OAI, and HCol) were differentially distributed between prophage DNA groups A to G (Table 4) ($P = 0.003$). HCol strains were evenly

Downloaded from jcm.asm.org by Roland Quentin on April 12, 2010

TABLE 3. CCs, STs, and serotypes of *S. agalactiae* strains from skin and osteoarticular infections and cases of human colonization[a]

Clonal complex (no. of isolates)	ST	No. (%) of isolates from:			No. (%) of isolates of indicated serotype						
		SKI	OAI	HCol	Ia	Ib	II	III	IV	V	NT
CC1 (40)		8 (33)	14 (41)	18 (29)	2 (7)	2 (13)	3 (75)	2 (8)	4 (67)	24 (73)	3
	1 (27)	7 (29)	11 (32)	9 (15)	1		2			23	1
	2 (7)		2 (6)	5 (8)	1	1	1	2			2
	196 (5)	1 (4)	1 (3)	3 (5)		1			4		
	370 (1)			1 (2)						1	
CC7 (5)		1 (4)	1 (3)	3 (5)		2 (13)		1 (4)		1 (3)	1
	41 (3)	1 (4)		2 (3)		1		1		1	
	6 (1)		1 (3)			1					
	7 (1)			1 (2)							1
CC8 (18)		2 (8)	2 (6)	14 (23)		11 (73)		1 (4)	1 (17)	2 (6)	3
	8 (9)	2 (8)		7 (11)		8					1
	10 (5)		1 (3)	4 (7)					1	2	2
	12 (2)			2 (3)		1		1			
	381 (1)		1 (3)			1					
	390 (1)			1 (2)		1					
CC17 (7)			1 (3)	6 (10)				6 (23)	1 (17)		
	17 (6)		1 (3)	5 (8)				6			
	291 (1)			1 (2)					1		
CC19 (11)		2 (8)	4 (12)	5 (8)	1 (4)		1 (25)	8 (31)		1 (3)	
	19 (8)	1 (4)	4 (12)	3 (5)	1			7			
	28 (2)	1 (4)		1 (2)			1			1	
	389 (1)			1 (2)				1			
CC23 (30)		11 (46)	7 (21)	12 (20)	24 (86)			6 (23)			
	23 (18)	7 (29)	6 (18)	5 (8)	14			4			
	88 (2)	2 (8)			2						
	144 (2)	1 (4)		1 (4)	2						
	220 (2)			2 (3)	2						
	223 (2)			2 (3)	2						
	280 (1)		1 (3)		1						
	380 (1)	1 (4)						1			
	305 (1)			1 (2)	1						
	391 (1)			1 (2)				1			
CC388 (3)			1 (3)	2 (3)						3 (9)	
	26 (1)		1 (3)							1	
	388 (2)			2 (3)						2	
Singletons (5)			4 (12)	1 (2)	1 (4)			2 (8)		2 (6)	
	4 (1)		1 (3)		1						
	130 (2)		1 (3)	1 (2)						2	
	283 (2)		2 (6)					2			
Total		24	34	61	28	15	4	26	6	33	7

[a] SKI, skin infection; OAI, osteoarticular infection; HCol, human colonization; NT, nontypeable.

distributed between prophage DNA groups A to F, whereas 65% of OAI strains (22/34 strains) (Table 4) belonged to prophage DNA group D, the members of which had the largest numbers of amplified prophage DNA fragments. Similarly, 83% of SKI strains (20/24 strains) (Table 4) belonged to prophage DNA groups B and D, which displayed the highest numbers of amplified prophage DNA fragments. In contrast, 17 of the 18 strains of prophage groups A, E, and F, in which the number of amplified prophage DNA fragments was low, were HCol strains.

The distribution of strains from the various serotypes, STs, and CCs between prophage DNA groups was not random (Table 4) ($P < 0.00001$). Strains of the two major lineages, ST-1 and ST-23, and of the corresponding clonal complexes, CC1 and CC23, which were frequently implicated in SKI and OAI, had particular characteristics in terms of their prophage DNA content. All 27 ST-1 strains (100%) and 34 of the 40 CC1 strains (85%) (Table 4), most of which were of serotype V (Fig. 2), belonged to prophage DNA group D. And the six CC1 strains that did not belong to prophage DNA group D were rarely isolated from patients with infectious disease (only one strain, from a case of OAI) (Fig. 2). The CC8 and CC19 strains mostly belonged to prophage groups C (9/18; 50%) and B (7/11; 64%), respectively (Table 4 and Fig. 2). The strains of phylogenetic lineage ST-23 and its

Downloaded from jcm.asm.org by Roland Quentin on April 12, 2010

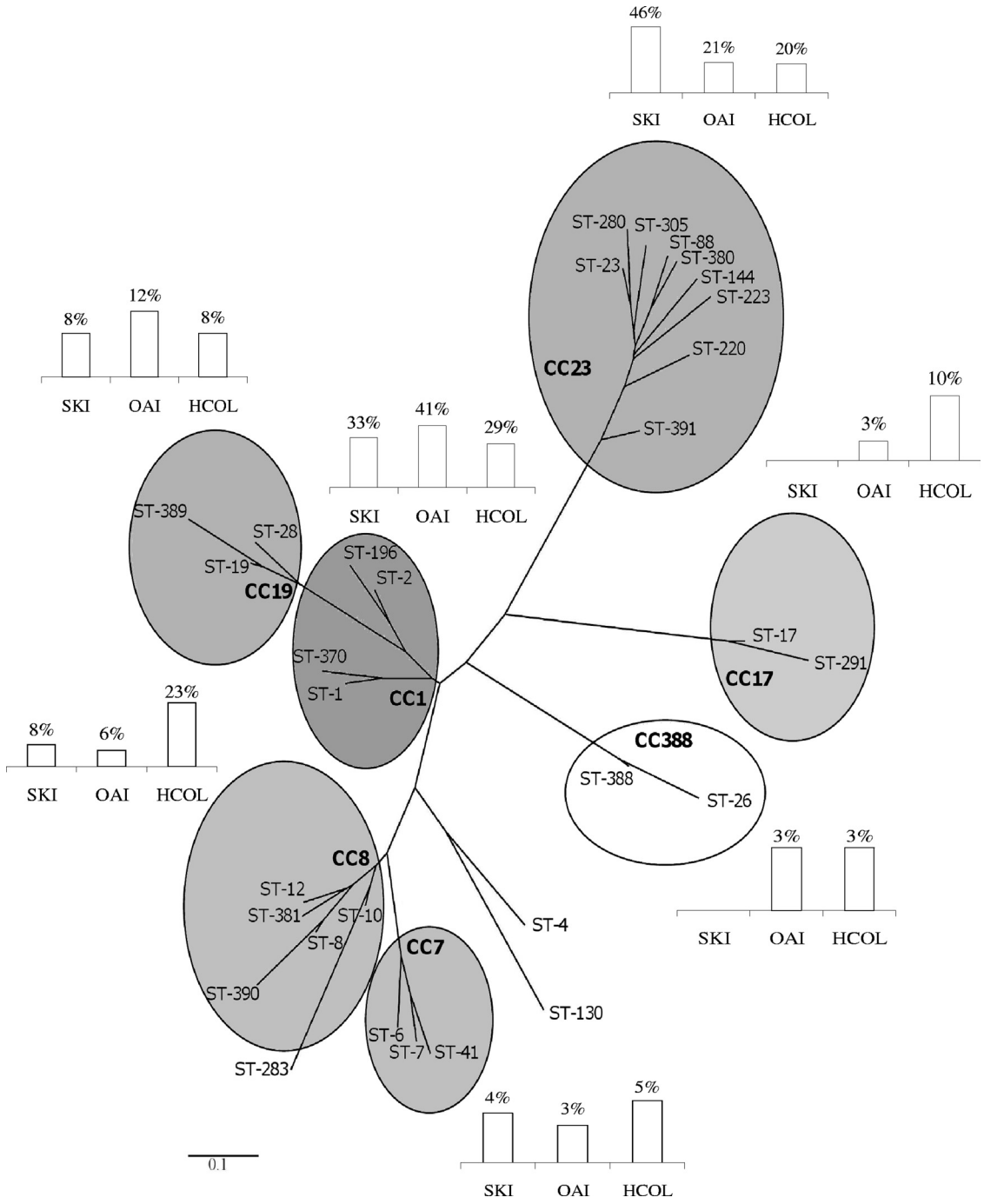


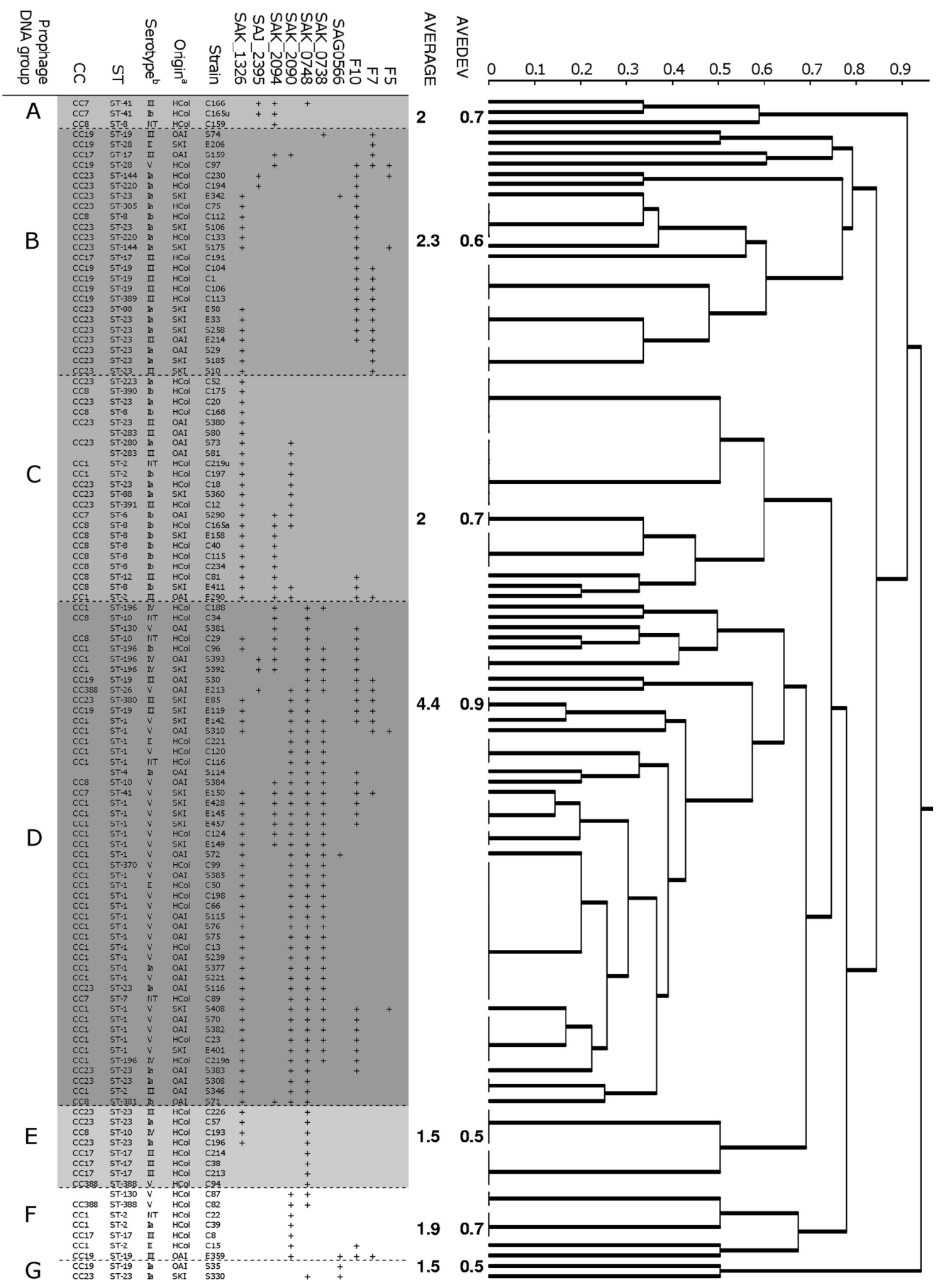
FIG. 1. Phylogenetic tree showing the relationship between sequence type (ST) and clonal complex (CC) obtained by analyzing MLST data from 119 *S. agalactiae* strains isolated from skin infections (SKI), osteoarticular infections (OAI), and cases of human colonization (HCol). Columns indicate the percentages of SKI, OAI, and HCol strains in each CC.

corresponding clonal complex, CC23, were mostly of serotype Ia and were distributed between five of the seven prophage DNA groups (groups B, C, D, E, and G) (Fig. 2 and Table 4). Therefore, they displayed considerable diversity in terms of the prophage DNA fragments amplified. Nevertheless, 14 of the 30 strains (47%) of CC23 belonged to prophage DNA group B, which included 64% of the CC19 strains.

DISCUSSION

S. agalactiae infections in nonpregnant adults have greatly increased in frequency over the last 2 decades in the United States and Europe (4, 15, 37, 40). Many clinical cases of *S. agalactiae* SKI and OAI have been reported. Our data confirm that *S. agalactiae* SKI and OAI are significantly more frequent in older people

Downloaded from jcm.asm.org by Roland Quentin on April 12, 2010



Downloaded from jcm.asm.org by Roland Quentin on April 12, 2010

TABLE 4. Distribution of the *S. agalactiae* strains of various origins, serotypes, and clonal complexes into prophage DNA groups displayed by SYSTAT 12 software[a]

Characteristic (no. of strains)	No. of strains (%) in indicated prophage DNA group							
	NP (4)	A (3)	B (24)	C (22)	D (49)	E (8)	F (7)	G (2)
Prophage DNA fragment								
F5	114 (96)		3 (3)		2 (2)			
F7	95 (83)		15 (13)	1 (1)	7 (6)		1 (1)	
F10	73 (61)		18 (15)	3 (3)	23 (19)		2 (2)	
SAG0566	114 (96)		1 (1)		1 (1)		1 (1)	2 (2)
SAK_0738	78 (66)		1 (1)		40 (34)			
SAK_0748	58 (49)	1 (1)			49 (41)	8 (7)	2 (2)	1 (1)
SAK_2090	59 (50)		1 (1)	11 (9)	41 (34)		7 (6)	
SAK_2094	90 (76)	3 (3)	2 (2)	9 (8)	15 (13)			
SAJ_2395	112 (94)	2 (2)	2 (2)		3 (3)			
SAK_1326	43 (36)		13 (11)	22 (18)	37 (31)	4 (3)		
Anatomic origin								
SKI (24)			9 (38)	3 (13)	11 (46)			1 (4)
OAI (34)			4 (12)	6 (18)	22 (65)		1 (3)	1 (3)
HCol (61)	4 (7)	3 (5)	11 (18)	13 (21)	16 (26)	8 (13)	6 (10)	
Serotype								
Ia (28)	1 (4)		12 (43)	5 (18)	5 (18)	2 (7)	1 (4)	2 (7)
Ib (15)	1 (7)	1 (7)	1 (7)	10 (67)	2 (13)			
II (4)			1 (25)		2 (50)		1 (25)	
III (26)		1 (4)	9 (35)	6 (23)	4 (15)	4 (15)	2 (8)	
IV (6)	1 (17)				4 (67)	1 (17)		
V (33)	1 (3)		1 (3)		28 (85)	1 (3)	2 (6)	
NT (7)		1 (14)		1 (14)	4 (57)		1 (14)	
Sequence type								
1 (27)					27 (100)			
2 (7)				3 (43)	1 (14)		3 (43)	
8 (9)		1 (11)	1 (11)	7 (78)				
10 (5)	1 (20)				3 (60)	1 (20)		
17 (6)			2 (33)			3 (50)	1 (17)	
19 (8)			4 (50)		2 (25)		1 (13)	1 (13)
23 (18)			8 (44)	3 (17)	3 (17)	3 (17)		1 (6)
196 (5)					5 (100)			
Others (34)	3 (9)	2 (6)	9 (26)	9 (26)	8 (24)	1 (3)	2 (6)	
Clonal complex								
1 (40)				3 (8)	34 (85)		3 (8)	
7 (5)		2 (40)		1 (20)	2 (40)			
8 (18)	2 (11)	1 (6)	1 (6)	9 (50)	4 (22)	1 (6)		
17 (7)	1 (14)		2 (29)			3 (43)	1 (14)	
19 (11)			7 (64)		2 (18)		1 (9)	1 (9)
23 (30)	1 (3)		14 (47)	7 (23)	4 (13)	3 (10)		1 (3)
388 (3)					1 (33)	1 (33)	1 (33)	
Others (5)				2 (40)	2 (40)		1 (20)	

[a] NP, no prophage amplification; SKI, skin infection; OAI, osteoarticular infection; HCol, human colonization; NT, nontypeable.

(≥55 years of age) (14, 15, 40), that most of the strains responsible for SKI (71%) belong to serotypes Ia and V, and that serotypes V, III, and Ia predominate among OAI strains (91%) (5, 14, 18, 46). Nevertheless, no other study to date has specifically focused on molecular characterization, including evaluation of the prophage content of *S. agalactiae* strains responsible for SKI and OAI.

Only strains from a particular phylogenetic lineage, initially recognized by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) (35, 38) and more recently defined as ST-17 by MLST, have been shown to be associated with a particular disease, due to a higher likelihood of their invading the central nervous system (CNS) of neonates (3, 24, 25, 30, 31). Our data indicate that strains of two other major lineages, CC1 and CC23, found in

FIG. 2. Distribution of 119 *S. agalactiae* strains isolated from skin infections (SKI), osteoarticular infections (OAI), and human colonization (HCol) cases into prophage DNA groups on the basis of PCR evaluations of the prophage content of strains. Jaccard analysis generated a dendrogram of similarity values for the results of the 10 prophage sequences studied. The average number of prophage DNA fragments amplified by PCR from strains and the average of absolute deviations (AVEDEV) were calculated for each prophage DNA group of strains. [a], anatomic origin of strains; [b], serotype of strains; ST, sequence-type; CC, clonal complex; NT, nontypeable.

Downloaded from jcm.asm.org by Roland Quentin on April 12, 2010

79% of SKI and 62% of OAI, are frequently associated with skin, bone, and joint infections. The similar phylogenetic characteristics of strains isolated from skin and bone or joint infections provide support for the hypothesis that the skin and soft tissues may be a potential portal of entry for bone and joint infections, as previously suggested (14).

The high percentages of CC1 and CC23 strains observed in SKI and OAI suggested that strains of these lineages have enhanced invasiveness for skin, bone, and joints. As for the propensity of ST-17 strains that invade the CNS of neonates, the pathogenic features of the strains of the two phylogenetically distant lineages CC1 and CC23, which may account for the particular ability of these strains to invade skin, bone, and joints, are unknown. In terms of evolution, the strains of these two lineages probably acquired virulence through the acquisition of different genetic elements. Indeed, the strains of these two lineages displayed a high degree of phylogenetic divergence (6, 20, 21, 24, 31, 32, 43, 48). In addition, the CC23 lineage contains strains of bovine origin isolated during the 1960s and strains subsequently isolated from humans (7, 21). In contrast, the CC1 lineage contains strains that have emerged since the 1990s, responsible for infections in both adults and neonates (6, 17, 32). Thus, the bacteria of these two clones have been exposed to different environmental and nutritional backgrounds during evolution. These constraints may have subjected the bacteria to different stressful conditions, resulting in the induction of different mutations, as observed for housekeeping genes, and probably also resulting in differences in horizontal gene transfer events, leading to marked differences in the virulence proprieties of the strains of these two clones.

Our data are consistent with the hypothesis that horizontal gene transfers related to transduction mechanisms may have played a major role in the emergence of clones able to infect skin, bone, and joints. Indeed, on the basis of the prophage content of the *S. agalactiae* strain genomes, we identified two major groups of strains responsible for SKI and OAI with (i) very distinctive prophage DNA fragment contents, resulting in clustering into two particular prophage DNA groups, and (ii) the largest number of prophage DNA fragments per strain in their genome (groups B and D) (Fig. 2).

Prophage DNA group D had the largest number of amplified prophage DNA fragments per strain and contained all the strains of ST-1 and 85% of the CC1 strains, this phylogenetic lineage being the most frequently implicated in SKI and OAI. In addition, CC1 strains from prophage DNA groups other than group D were rarely isolated from SKI or OAI cases, with only six such isolations observed. These strains belonged to prophage DNA groups from which only one or two prophage DNA fragments were amplified, consistent with a low prophage content in the genome. Therefore, lysogeny, which has been shown to play an important role in bacterial virulence and genome diversification in the genus *Streptococcus* (1, 8), may be a key genetic event affecting the virulence of CC1 *S. agalactiae* strains, leading to the emergence of strains particularly able to infect skin, bone, and joints.

CC23 was the second most frequently implicated lineage in SKI and OAI. Analysis of the prophage content of the genome of CC23 strains resulted in the grouping together of half these strains (14/30 strains) in prophage DNA group B, one of the prophage DNA groups with the largest number of similar amplified prophage DNA fragments, suggesting a role for lysogeny in the specialization of this group of strains. Within this prophage DNA group, the CC23 strains clustered with 64% of the CC19 strains (7/11 strains). These two groups of strains may therefore have been subjected to similar ecological conditions or similar constraints leading to lysogenization by similar phages. However, the CC23 strains of prophage DNA group B were frequently associated with SKI and OAI (10/14 strains), whereas the CC19 strains of this prophage DNA group were rarely isolated from patients with these diseases (2/7 strains). Thus, the prophage characteristics of prophage DNA group B recognized by PCR in this study either play no role in the propensity of CC23 strains to infect skin, bone, and joints or may modulate other virulence factors specifically carried by the genomes of the strains of the CC23 lineage. Our data tend to support the second hypothesis. Indeed, CC23 strains from prophage DNA groups B and D, which had the greatest amplified prophage DNA content, were frequently isolated from SKI and OAI (14/18 strains), whereas CC23 strains from other prophage DNA groups, in which prophage DNA fragment amplification was less frequent, were mostly isolated from cases of HCol (8/12 strains; $P = 0.014$).

In conclusion, our data suggest a role for *S. agalactiae* strains of two phylogenetic lineages, CC1 and CC23, in SKI and OAI in adults, particularly for strains exposed to particular transduction mechanisms in gene recombination. The impacts of lysogeny on the virulence of the strains of these two lineages may be markedly different. Further studies are therefore required to assess in detail the role of the observed prophage-like elements in the emergence of *S. agalactiae* clones displaying a particular tropism for skin, bone, or joints. Are these elements involved in the importation of new phage-encoded virulence factors or the modification of transcriptional control mechanisms for chromosomal virulence genes? Particular host signals, linked to risk factors for development of SKI or OAI, may also induce changes in gene expression due to phage transduction.

ACKNOWLEDGMENTS

N.V.D.M.-M. and R.Q. conceived and designed the experiments. M.S. (serotyping, MLST, prophage PCR, and PFGE) and A.-S.D. and L.A. (prophage PCR) performed the experiments. M.S., N.V.D.M.-M, and R.Q. analyzed the data. M.S. and R.Q. wrote the paper.

REFERENCES

1. **Banks, D. J., S. B. Beres, and J. M. Musser.** 2002. The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence. Trends Microbiol. **10:**515–521.
2. **Bidet, P., N. Brahimi, C. Chalas, Y. Aujard, and E. Bingen.** 2003. Molecular characterization of serotype III group B-*Streptococcus* isolates causing neonatal meningitis. J. Infect. Dis. **188:**1132–1137.
3. **Bisharat, N., N. Jones, D. Marchaim, C. Block, R. M. Harding, P. Yagupsky, T. Peto, and D. W. Crook.** 2005. Population structure of group B *Streptococcus* from a low-incidence region for invasive neonatal disease. Microbiology **151:**1875–1881.
4. **Blancas, D., M. Santin, M. Olmo, F. Alcaide, J. Carratala, and F. Gudiol.** 2004. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults: incidence, clinical characteristics, and outcome. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **23:**168–173.
5. **Blumberg, H. M., D. S. Stephens, M. Modansky, M. Erwin, J. Elliot, R. R. Facklam, A. Schuchat, W. Baughman, and M. M. Farley.** 1996. Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. J. Infect. Dis. **173:**365–373.
6. **Bohnsack, J. F., A. Whiting, M. Gottschalk, D. M. Dunn, R. Weiss, P. H. Azimi, J. B. Philips III, L. E. Weisman, G. G. Rhoads, and F.-Y. C. Lin.** 2008. Population structure of invasive and colonizing strains of *Streptococcus agalactiae* from neonates of six U.S. academic centers from 1995 to 1999. J. Clin. Microbiol. **46:**1285–1291.
7. **Brochet, M., E. Couvé, M. Zouine, T. Vallaeys, C. Rusniok, M. C. Lamy, C. Buchrieser, P. Trieu-Cuot, F. Kunst, C. Poyart, and P. Glaser.** 2006.

Downloaded from jcm.asm.org by Roland Quentin on April 12, 2010

Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. Microbes Infect. **8:**1227–1243.
8. **Brüssow, H., C. Canchaya, and W. D. Hardt.** 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **68:**560–602.
9. **Currie, B. J.** 2006. Group A streptococcal infections of the skin: molecular advances but limited therapeutic progress. Curr. Opin. Infect. Dis. **19:**132–138.
10. **Davies, H. D., S. Raj, C. Adair, J. Robinson, and A. McGeer.** 2001. Population-based active surveillance for neonatal group B streptococcal infections in Alberta, Canada: implications for vaccine formulation. Pediatr. Infect. Dis. J. **20:**879–884.
11. **Desiere, F., W. M. McShan, D. van Sinderen, J. J. Ferretti, and H. Brussow.** 2001. Comparative genomics reveals close genetic relationships between phages from dairy bacteria and pathogenic streptococci: evolutionary implications for prophage-host interactions. Virology **288:**325–341.
12. **Domelier, A. S., N. van der Mee-Marquet, P. Y. Sizaret, G. H. Arnaud, M. F. Lartigue, L. Méreghetti, and R. Quentin.** 2009. Molecular characterization and lytic activities of *Streptococcus agalactiae* bacteriophages and determination of lysogenic strain features. J. Bacteriol. **191:**4776–4785.
13. **Eickhoff, T., J. O. Klein, A. K. Daly, D. Ingall, and M. Finland.** 1964. Neonatal sepsis and other infections due to group B beta-hemolytic streptococci. N. Engl. J. Med. **271:**1221–1228.
14. **Farley, M. M.** 2001. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. Clin. Infect. Dis. **33:**556–561.
15. **Farley, M. M., R. C. Harvey, T. Stull, J. D. Smith, A. Schuchat, J. D. Wenger, and D. S. Stephens.** 1993. A population-based assessment of invasive disease due to group B *Streptococcus* in nonpregnant adults. N. Engl. J. Med. **328:**1807–1811.
16. **Glaser, P., C. Rusniok, C. Buchrieser, F. Chevalier, L. Frangeul, T. Msadek, M. Zouine, E. Couve, L. Lalioui, C. Poyart, P. Trieu-Cuot, and F. Kunst.** 2002. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. Mol. Microbiol. **45:**1499–1513.
17. **Harrison, L. H., D. M. Dwyer, and J. A. Johnson.** 1995. Emergence of serotype V group B streptococcal infection among infants and adults. J. Infect. Dis. **171:**513.
18. **Harrison, L. H., J. A. Elliott, D. M. Dwyer, J. P. Libonati, P. Ferrieri, L. Billmann, and A. Schuchat.** 1998. Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. Maryland Emerging Infection Program. Infect. Dis. **177:**998–1002.
19. **Hendrix, R. W., M. C. Smith, R. N. Burns, M. E. Ford, and G. F. Hatfull.** 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **96:**2192–2197.
20. **Héry-Arnaud, G., G. Bruant, P. Lanotte, S. Brun, A. Rosenau, N. van der Mee-Marquet, R. Quentin, and L. Mereghetti.** 2005. Acquisition of insertion sequences and the GBSi1 intron by *Streptococcus agalactiae* isolates correlates with the evolution of the species. J. Bacteriol. **187:**6248–6252.
21. **Héry-Arnaud, G., G. Bruant, P. Lanotte, S. Brun, B. Picard, A. Rosenau, N. van der Mee-Marquet, P. Rainard, R. Quentin, and L. Mereghetti.** 2007. Mobile genetic elements provide evidence for a bovine origin of clonal complex 17 of *Streptococcus agalactiae*. Appl. Environ. Microbiol. **73:**4668–4672.
22. **Holt, D. E., S. Halket, J. de Louvois, and D. Harvey.** 2001. Neonatal meningitis in England and Wales: 10 years on. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. **84:**F85–F89.
23. **Hood, M., A. Janney, and G. Dameron.** 1961. Beta hemolytic streptococcus group B associated with problems of perinatal period. Am. J. Obstet. Gynecol. **82:**809–818.
24. **Jones, N., J. F. Bohnsack, S. Takahashi, K. A. Oliver, M. S. Chan, F. Kunst, P. Glaser, C. Rusniok, D. W. Crook, R. M. Harding, N. Bisharat, and B. G. Spratt.** 2003. Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. J. Clin. Microbiol. **41:**2530–2536.
25. **Jones, N., K. A. Oliver, J. Barry, R. M. Harding, N. Bisharat, B. G. Spratt, T. Peto, and D. W. Crook.** 2006. Enhanced invasiveness of bovine-derived neonatal sequence type 17 group B *Streptococcus* is independent of capsular serotype. Clin. Infect. Dis. **42:**915–924.
26. **Kong, F., S. Gowan, D. Martin, G. James, and G. L. Gilbert.** 2002. Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing. J. Clin. Microbiol. **40:**216–226.
27. **Lancefield, R. C., and R. Hare.** 1935. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of haemolytic streptococci from parturient women. J. Exp. Med. **61:**335–349.
28. **Lawrence, J. G., R. W. Hendrix, and S. Casjens.** 2001. Where are the pseudogenes in bacterial genomes? Trends Microbiol. **9:**535–540.
29. **Lee, N. Y., J. J. Yan, J. J. Wu, H. C. Lee, K. H. Liu, and W. C. Ko.** 2005. Group B streptococcal soft tissue infections in non-pregnant adults. Clin. Microbiol. Infect. **11:**577–579.
30. **Lin, F. Y., A. Whiting, E. Adderson, S. Takahashi, D. M. Dunn, R. Weiss, P. H. Azimi, J. B. Philips III, L. E. Weisman, J. Regan, P. Clark, G. G. Rhoads, C. E. Frasch, J. Troendle, P. Moyer, and J. F. Bohnsack.** 2006. Phylogenetic lineages of invasive and colonizing strains of serotype III group B streptococci from neonates: a multicenter prospective study. J. Clin. Microbiol. **44:**1257–1261.
31. **Luan, S. L., M. Granlund, M. Sellin, T. Lagergård, B. G. Spratt, and M. Norgren.** 2005. Multilocus sequence typing of Swedish invasive group B *Streptococcus* isolates indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching. J. Clin. Microbiol. **43:**3727–3733.
32. **Manning, S. D., A. C. Springman, E. Lehotzky, M. A. Lewis, T. S. Whittam, and H. D. Davies.** 2009. Multilocus sequence types associated with neonatal group B streptococcal sepsis and meningitis in Canada. J. Clin. Microbiol. **47:**1143–1148.
33. **Martinaud, C., T. Gaillard, B. Graffin, Y. Muzellec, and P. Brison.** 2008. Vertebral osteomyelitis due to *Streptococcus agalactiae* ST-17. Ann. Biol. Clin. (Paris) **66:**87–89. (In French.)
34. **Mayon-White, R. T.** 1985. The incidence of GBS disease in neonates in different countries. Antibiot. Chemother. **35:**17–27.
35. **Musser, J. M., S. J. Mattingly, R. Quentin, A. Goudeau, and R. K. Selander.** 1989. Identification of a high-virulence clone of type III *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) causing invasive neonatal disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **86:**4731–4735.
36. **Nocard, M., and R. Mollereau.** 1887. Sur une mammite contagieuse des vaches laitieres. Ann. Inst. Pasteur **1:**109.
37. **Phares, C. R., R. Lynfield, M. M. Farley, J. Mohle-Boetani, L. H. Harrison, S. Petit, A. S. Craig, W. Schaffner, S. M. Zansky, K. Gershman, K. R. Stefonek, B. A. Albanese, E. R. Zell, A. Schuchat, and S. J. Schrag for the Active Bacterial Core Surveillance/Emerging Infections Program Network.** 2008. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999–2005. JAMA **299:**2056–2065.
38. **Quentin, R., H. Huet, F. S. Wang, P. Geslin, A. Goudeau, and R. K. Selander.** 1995. Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by multilocus enzyme genotype and serotype: identification of multiple virulent clone families that cause invasive neonatal disease. J. Clin. Microbiol. **33:**2576–2581.
39. **Russell, H., N. L. Norcross, and D. E. Kahn.** 1969. Isolation and characterization of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage. J. Gen. Virol. **5:**315–317.
40. **Schwartz, B., A. Schuchat, M. J. Oxtoby, S. L. Cochi, A. Hightower, and C. V. Broome.** 1991. Invasive group B streptococcal disease in adults—a population-based study in metropolitan Atlanta. JAMA **266:**1112–1114.
41. **Sendi, P., L. Johansson, and A. Norrby-Teglund.** 2008. Invasive group B streptococcal disease in non-pregnant adults: a review with emphasis on skin and soft-tissue infections. Infection **36:**100–111.
42. **Skoff, T. H., M. M. Farley, S. Petit, A. S. Craig, W. Schaffner, K. Gershman, L. H. Harrison, R. Lynfield, J. Mohle-Boetani, S. Zansky, B. A. Albanese, K. Stefonek, E. R. Zell, D. Jackson, T. Thompson, and S. J. Schrag.** 2009. Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990–2007. Clin. Infect. Dis. **49:**85–91.
43. **Sun, Y., F. Kong, Z. Zhao, and G. L. Gilbert.** 2005. Comparison of a 3-set genotyping system with multilocus sequence typing for *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*). J. Clin. Microbiol. **43:**4704–4707.
44. **Tettelin, H., V. Masignani, M. J. Cieslewicz, C. Donati, D. Medini, N. L. Ward, S. V. Angiuoli, J. Crabtree, A. L. Jones, A. S. Durkin, R. T. Deboy, T. M. Davidsen, M. Mora, M. Scarselli, I. Margarit y Ros, J. D. Peterson, C. R. Hauser, J. P. Sundaram, W. C. Nelson, R. Madupu, L. M. Brinkac, R. J. Dodson, M. J. Rosovitz, S. A. Sullivan, S. C. Daugherty, D. H. Haft, J. Selengut, M. L. Gwinn, L. Zhou, N. Zafar, H. Khouri, D. Radune, G. Dimitrov, K. Watkins, K. J. O'Connor, S. Smith, T. R. Utterback, O. White, C. E. Rubens, G. Grandi, L. C. Madoff, D. L. Kasper, J. L. Telford, M. R. Wessels, R. Rappuoli, and C. M. Fraser.** 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **102:**13950–13955.
45. **Tettelin, H., V. Masignani, M. J. Cieslewicz, J. A. Eisen, S. Peterson, M. R. Wessels, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, I. Margarit, T. D. Read, L. C. Madoff, A. M. Wolf, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. T. DeBoy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, M. R. Lewis, D. Radune, N. B. Fedorova, D. Scanlan, H. Khouri, S. Mulligan, H. A. Carty, R. T. Cline, S. E. Van Aken, J. Gill, M. Scarselli, M. Mora, E. T. Iacobini, C. Brettoni, G. Galli, M. Mariani, F. Vegni, D. Maione, D. Rinaudo, R. Rappuoli, J. L. Telford, D. L. Kasper, G. Grandi, and C. M. Fraser.** 2002. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **99:**12391–12396.
46. **Tyrrell, G. J., L. D. Senzilet, J. S. Spika, D. A. Kertesz, M. Alagaratnam, M. Lovgren, and J. A. Talbot.** 2000. Invasive disease due to group B streptococcal infection in adults: results from a Canadian, population-based, active laboratory surveillance study—1996. Sentinel Health Unit Surveillance System Site Coordinators. J. Infect. Dis. **182:**168–173.
47. **van der Mee-Marquet, N., A. S. Domelier, L. Mereghetti, P. Lanotte, A. Rosenau, W. van Leeuwen, and R. Quentin.** 2006. Prophagic DNA fragments in *Streptococcus agalactiae* strains in association with neonatal meningitis. J. Clin. Microbiol. **44:**1049–1058.
48. **van der Mee-Marquet, N., L. Fourny, L. Arnault, A. S. Domelier, M. Salloum, M. F. Lartigue, and R. Quentin.** 2008. Molecular characterization of human-colonizing *Streptococcus agalactiae* strains isolated from throat, skin, anal margin, and genital body sites. J. Clin. Microbiol. **46:**2906–2911.

Downloaded from jcm.asm.org by Roland Quentin on April 12, 2010