

Académie d'Orléans –Tours  
Université François-Rabelais

## FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Année 2013

N°

### Mémoire du diplôme d'études spécialisées de biologie médicale

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10/09/1990

### Thèse pour le DOCTORAT EN MEDECINE Diplôme d'Etat

*Par Mathilde FARCIS  
Née le 4 mai 1979 à Paris (14<sup>ème</sup>)*

Présentée et soutenue publiquement le 2 mai 2013

**Position phylogénétique des souches de  
*Streptococcus agalactiae* d'origine pulmonaire**

### Jury

Président de Jury : Monsieur le Professeur Laurent MEREGHETTI

Membres du jury : Monsieur le Professeur Francis BARIN  
Monsieur le Professeur Louis BERNARD  
Monsieur le Docteur Philippe LANOTTE  
Madame le Docteur Gaëlle BATY

## Résumé :

*Streptococcus agalactiae* ou streptocoque du groupe B est une bactérie fréquemment en cause dans les infections materno-fœtales et néonatales dans les pays développés. Il apparaît également comme un pathogène émergent dans les infections chez les personnes âgées depuis deux décennies. Chez le nouveau-né, l'utilisation de différentes méthodes génomiques a montré l'existence de clones à plus haut risque infectieux. Dans certaines infections des sujets adultes, il a également été montré une plus forte prévalence de certains clones.

L'objectif de notre travail était de savoir si les souches de streptocoque du groupe B d'origine pulmonaire constituaient un clone spécifique au sein de l'espèce. Dans cette perspective, 74 souches de streptocoque du groupe B isolées de prélèvements pulmonaires ont été analysées. Ces souches ont été isolées chez des patients adultes hospitalisés dans 4 CHU entre 2007 et 2011. Les souches ont été caractérisées par sérotypage capsulaire moléculaire et par MultiLocus Sequence Typing.

Notre travail montre que les souches de streptocoque du groupe B d'origine pulmonaire ne constituent pas un groupe spécifique. Ces souches sont principalement de sérotype V, Ia et Ib et appartiennent majoritairement aux complexes clonaux CC19, CC10 et CC23. Cette distribution est différente des souches impliquées en pathologie infectieuse néonatale, qui sont de sérotype III et Ia et appartiennent surtout au CC17. En revanche, cette distribution est proche des souches de streptocoque du groupe B impliquées dans d'autres types d'infections du sujet adulte. Par ailleurs, les souches présentes en portage pharyngé appartiennent également aux CC19, CC10 et CC23, ce qui suggère une voie descendante de colonisation.

**Mots clés :** *streptococcus agalactiae* - infections chez l'adulte - MLST - sérotype

**Title**

Phylogenetic position of *streptococcus agalactiae* strains  
from pulmonary origin

**Summary:**

*Streptococcus agalactiae* or group B streptococcus is a bacterium frequently involved in materno-fetal and neonatal infections in developed countries. It also appears as an emerging pathogen in infections of the elderly in the last two decades. With regards to the newborn, the use of different methods showed the existence of genomic clones with a higher risk of infection. In some adult infections, a higher prevalence of some clones was also shown.

The aim of our study was to know if strains of group B streptococcus from pulmonary origin constitute a specific clone. In this perspective, 74 strains of group B streptococci isolated from respiratory samples were analyzed. These strains were isolated from adult patients hospitalized in four hospitals between 2007 and 2011. The strains were characterized by capsular molecular serotyping and MultiLocus Sequence Typing.

Our work shows that strains of group B streptococcus from pulmonary origin do not constitute a specific group. These strains were mainly serotype V, Ia and Ib and mostly belong to clonal complexes CC19, CC10 and CC23. This distribution is different from the strains involved in neonatal infectious diseases, which are serotype III and Ia and belong mainly to the CC17. However, this distribution is close to the strains of group B streptococcus involved in other types of adult infections. In addition, strains of pharyngeal carriage also belong to CC19, CC10 and CC23, suggesting a down colonization.

**Key words :** *streptococcus agalactiae* – adult infections - MLST - serotype

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS  
**FACULTE DE MEDECINE DE TOURS**

**DOYEN**

**Professeur Dominique PERROTIN**

**VICE-DOYEN**

Professeur Daniel ALISON

**ASSESEURS**

Professeur Daniel ALISON, Moyens  
Professeur Christian ANDRES, Recherche  
Professeur Christian BINET, Formation Médicale Continue  
Professeur Laurent BRUNEREAU, Pédagogie  
Professeur Patrice DIOT, Recherche clinique

**SECRETAIRE GENERALE**

Madame Fanny BOBLETER

\*\*\*\*\*

**DOYENS HONORAIRES**

Professeur Emile ARON (†) – 1962-1966  
*Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962*  
Professeur Georges DESBUQUOIS (†)- 1966-1972  
Professeur André GOUAZÉ - 1972-1994  
Professeur Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004

**PROFESSEURS EMERITES**

Professeur Alain AUTRET  
Professeur Jean-Claude BESNARD  
Professeur Patrick CHOUTET  
Professeur Guy GINIES  
Professeur Olivier LE FLOCH  
Professeur Chantal MAURAGE  
Professeur Léandre POURCELOT  
Professeur Michel ROBERT  
Professeur Jean-Claude ROLLAND

**PROFESSEURS HONORAIRES**

MM. Ph. ANTHONIOZ - A. AUDURIER – Ph. BAGROS - G. BALLON – P.BARDOS - J. BARSOTTI  
A. BENATRE - Ch. BERGER –J. BRIZON - Mme M. BROCHIER - Ph. BURDIN - L. CASTELLANI  
J.P. FAUCHIER - B. GRENIER – M. JAN –P. JOBARD - J.-P. LAMAGNERE - F. LAMISSE – J. LANSAC  
J. LAUGIER - G. LELORD - G. LEROY - Y. LHUINTRE - M. MAILLET - Mlle C. MERCIER - E/H. METMAN  
J. MOLINE - Cl. MORAINÉ - H. MOURAY - J.P. MUH - J. MURAT - Mme T. PLANIOL - Ph. RAYNAUD  
Ch. ROSSAZZA - Ph. ROULEAU - A. SAINDELLE - J.J. SANTINI - D. SAUVAGE - M.J. THARANNE  
J. THOUVENOT - B. TOUMIEUX - J. WEILL.

## PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

MM.	ALISON Daniel	Radiologie et Imagerie médicale
	ANDRES Christian	Biochimie et Biologie moléculaire
	ANGOULVANT Denis	Cardiologie
	ARBEILLE Philippe	Biophysique et Médecine nucléaire
	AUPART Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	BABUTY Dominique	Cardiologie
Mme	BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; Radiothérapie
M.	BARON Christophe	Immunologie
Mme	BARTHELEMY Catherine	Pédopsychiatrie
MM.	BAULIEU Jean-Louis	Biophysique et Médecine nucléaire
	BERNARD Louis	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
	BEUTTER Patrice	Oto-Rhino-Laryngologie
	BINET Christian	Hématologie ; Transfusion
	BODY Gilles	Gynécologie et Obstétrique
	BONNARD Christian	Chirurgie infantile
	BONNET Pierre	Physiologie
Mme	BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
MM.	BOUGNOUX Philippe	Cancérologie ; Radiothérapie
	BRILHAULT Jean	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	BRUNEREAU Laurent	Radiologie et Imagerie médicale
	BRUYERE Franck	Urologie
	BUCHLER Matthias	Néphrologie
	CALAIS Gilles	Cancérologie ; Radiothérapie
	CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
	CHANDENIER Jacques	Parasitologie et Mycologie
	CHANTEPIE Alain	Pédiatrie
	COLOMBAT Philippe	Hématologie ; Transfusion
	CONSTANS Thierry	Médecine interne ; Gériatrie et Biologie du vieillissement
	CORCIA Philippe	Neurologie
	COSNAY Pierre	Cardiologie
	COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et Imagerie médicale
	COUET Charles	Nutrition
	DANQUECHIN DORVAL Etienne	Gastroentérologie ; Hépatologie
	DE LA LANDE DE CALAN Loïc	Chirurgie digestive
	DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
	DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique ; médecine d'urgence
	DESTRIEUX Christophe	Anatomie
	DIOT Patrice	Pneumologie
	DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & Cytologie pathologiques
	DUMONT Pascal	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	FAUCHIER Laurent	Cardiologie
	FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	FOUQUET Bernard	Médecine physique et de Réadaptation
	FRANCOIS Patrick	Neurochirurgie
	FUSCIARDI Jacques	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	GAILLARD Philippe	Psychiatrie d'Adultes
	GOGA Dominique	Chirurgie maxillo-faciale et Stomatologie
	GOUDEAU Alain	Bactériologie -Virologie ; Hygiène hospitalière
	GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
	GRUEL Yves	Hématologie ; Transfusion
	GUILMOT Jean-Louis	Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire
	GUYETANT Serge	Anatomie et Cytologie pathologiques
	HAILLOT Olivier	Urologie
	HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique ; médecine d'urgence (Néphrologie et Immunologie clinique)
	HERAULT Olivier	Hématologie ; transfusion
	HERBRETEAU Denis	Radiologie et Imagerie médicale
Mme	HOMMET Caroline	Médecine interne, Gériatrie et Biologie du vieillissement
MM.	HUTEN Noël	Chirurgie générale
	LABARTHE François	Pédiatrie
	LAFFON Marc	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	LARDY Hubert	Chirurgie infantile
	LASFARGUES Gérard	Médecine et Santé au Travail
	LEBRANCHU Yvon	Immunologie

	LEMARIE Etienne	Pneumologie
	LESCANNE Emmanuel	Oto-Rhino-Laryngologie
	LINASSIER Claude	Cancérologie ; Radiothérapie
	LORETTE Gérard	Dermato-Vénérologie
	MACHET Laurent	Dermato-Vénérologie
	MAILLOT François	Médecine Interne
	MARCHAND Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
	MARRET Henri	Gynécologie et Obstétrique
	MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
	MORINIÈRE Sylvain	O.R.L.
	MULLEMAN Denis	Rhumatologie
	PAGES Jean-Christophe	Biochimie et biologie moléculaire
	PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, Pharmacologie clinique
	PATAT Frédéric	Biophysique et Médecine nucléaire
	PERROTIN Dominique	Réanimation médicale ; médecine d'urgence
	PERROTIN Franck	Gynécologie et Obstétrique
	PISELLA Pierre-Jean	Ophtalmologie
	QUENTIN Roland	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
	ROBIER Alain	Oto-Rhino-Laryngologie
	ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
	ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	ROYERE Dominique	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
	RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention
	SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
	SALIBA Elie	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
Mme	SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et Médecine Nucléaire
MM.	SIRINELLI Dominique	Radiologie et Imagerie médicale
	THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
Mme	TOUTAIN Annick	Génétique
MM.	VAILLANT Loïc	Dermato-Vénérologie
	VELUT Stéphane	Anatomie
	WATIER Hervé	Immunologie.

### **PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE**

Mme LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie Médecine Générale

### **PROFESSEURS ASSOCIES**

MM. HUAS Dominique Médecine Générale  
LEBEAU Jean-Pierre Médecine Générale  
MALLET Donatien Soins palliatifs  
POTIER Alain Médecine Générale

### **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mmes ANGOULVANT Theodora Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique : addictologie  
BAULIEU Françoise Biophysique et Médecine nucléaire  
M. BERTRAND Philippe Biostatistiques, Informatique médicale et Technologies de Communication  
Mme BLANCHARD Emmanuelle Biologie cellulaire  
BLASCO Hélène Biochimie et biologie moléculaire  
MM. BOISSINOT Eric Physiologie  
DESOUBEAUX Guillaume Parasitologie et mycologie  
Mme DUFOUR Diane Biophysique et Médecine nucléaire  
M. EHRMANN Stephan Réanimation médicale  
Mmes FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie Anatomie et Cytologie pathologiques  
GAUDY-GRAFFIN Catherine Bactériologie - Virologie ; Hygiène hospitalière  
M. GIRAUDEAU Bruno Biostatistiques, Informatique médicale et Technologies de Communication  
Mme GOUILLEUX Valérie Immunologie  
MM. GUERIF Fabrice Biologie et Médecine du développement et de la reproduction  
GYAN Emmanuel Hématologie, transfusion

Mmes	LARTIGUE Marie-Frédérique LE GUELLEC Chantal MACHET Marie-Christine MARUANI Annabel	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière Pharmacologie fondamentale ; Pharmacologie clinique Anatomie et Cytologie pathologiques Dermatologie
MM.	PIVER Eric ROUMY Jérôme	Biochimie et biologie moléculaire Biophysique et médecine nucléaire in vitro
Mme	SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et Droit de la santé
M.	TERNANT David	Pharmacologie – toxicologie
Mme	VALENTIN-DOMELIER Anne-Sophie	Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière
M.	VOURC'H Patrick	Biochimie et Biologie moléculaire

### **MAITRES DE CONFERENCES**

Mmes	BOIRON Michèle ESNARD Annick	Sciences du Médicament Biologie cellulaire
M.	LEMOINE Maël	Philosophie
Mme	MONJAUZE Cécile	Sciences du langage - Orthophonie
M.	PATIENT Romuald	Biologie cellulaire

### **MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE**

Mmes	HUAS Caroline RENOUX-JACQUET Cécile	Médecine Générale Médecine Générale
M.	ROBERT Jean	Médecine Générale

### **CHERCHEURS C.N.R.S. – INSERM**

MM.	BIGOT Yves	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
	BOUAKAZ Ayache	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
Mmes	BRUNEAU Nicole CHALON Sylvie	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930 Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
MM.	COURTY Yves GAUDRAY Patrick GOUILLEUX Fabrice	Chargé de Recherche CNRS – U 618 Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239 Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
Mmes	GOMOT Marie HEUZE-VOURCH Nathalie	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930 Chargée de Recherche INSERM – U 618
MM.	LAUMONNIER Frédéric LE PAPE Alain	Chargé de Recherche INSERM - UMR CNRS-INSERM 930 Directeur de Recherche CNRS – U 618
Mmes	MARTINEAU Joëlle POULIN Ghislaine	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930 Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS-INSERM 930

### **CHARGES D'ENSEIGNEMENT**

#### ***Pour l'Ecole d'Orthophonie***

Mme	DELORE Claire	Orthophoniste
MM.	GOUIN Jean-Marie MONDON Karl	Praticien Hospitalier Praticien Hospitalier
Mme	PERRIER Danièle	Orthophoniste

#### ***Pour l'Ecole d'Orthoptie***

Mme	LALA Emmanuelle	Praticien Hospitalier
M.	MAJZOUB Samuel	Praticien Hospitalier

#### ***Pour l'Ethique Médicale***

Mme	BIRMELE Béatrice	Praticien Hospitalier
-----	------------------	-----------------------

## **SERMENT D'HIPPOCRATE**

**En présence des Maîtres de cette Faculté,  
de mes chers condisciples  
et selon la tradition d'Hippocrate,  
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur  
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.**

**Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,  
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.**

**Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux  
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira  
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas  
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.**

**Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,  
je rendrai à leurs enfants  
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.**

**Que les hommes m'accordent leur estime  
si je suis fidèle à mes promesses.  
Que je sois couvert d'opprobre  
et méprisé de mes confrères  
si j'y manque.**

# Remerciements

**A Monsieur le Professeur Laurent MEREGHETTI,**

Vous m'avez proposé ce sujet, je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée ainsi que pour votre aide précieuse au cours de la rédaction de ce travail. Vous avez accepté de présider cette thèse et de juger ce travail. Recevez ici ma sincère reconnaissance et tout mon respect.

**A Monsieur le Professeur Francis BARIN,**

Vous m'avez apporté un enseignement de qualité au cours de ces années d'internat. Vous avez accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance.

**A Monsieur le Professeur Louis BERNARD,**

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

**A Monsieur le Docteur Philippe LANOTTE**

Vous avez accepté de juger ce travail de thèse. Je vous remercie pour votre disponibilité. Recevez ici le témoignage de ma gratitude.

**A Madame le Docteur Gaëlle BATY,**

Tu as dirigé ce travail, je te remercie pour ta patience et ton accompagnement tout au long de ce travail. Trouve ici le témoignage de ma reconnaissance.

**A Monsieur le Professeur Alain GOUDEAU,**

Vous m'avez accueillie au sein de votre laboratoire et avez mis à ma disposition tout le matériel nécessaire à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie chaleureusement

Toute l'équipe du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Bretonneau pour leur gentillesse pendant ces années d'internat et leur aide lors de la réalisation de ce travail.

Pénélope et Jennifer pour leur importante participation à ce travail.

Véronique pour son aide et ses nombreux conseils, Hélène et Magali pour leur soutien, et Madame le Docteur Aline Sécher, pour sa confiance.

Merci à tous les internes de biologie médicale pour tous ces moments passés ensemble lors de ces années d'internat.

*Je remercie,*

*Mes parents, qui m'ont permis de poursuivre mes études et m'ont soutenu tout au long de ces nombreuses années.*

*Mes sœurs, Isabelle et Laurence, qui m'ont toujours encouragée et soutenue.*

*Ma famille, ma belle-famille et mes amis, dont la confiance n'a pas faibli durant toutes ces années d'études.*

*Séverin, qui a toujours été là pour moi et m'a supporté pendant toutes ces années.*

# Table des matières

1.	Introduction.....	1
2.	Généralités .....	2
2.1.	Streptocoque du groupe B .....	2
2.1.1.	Historique.....	2
2.1.2.	Taxonomie et nomenclature.....	3
2.1.3.	Caractères bactériologiques.....	3
2.1.4.	Pouvoir pathogène.....	4
2.1.5.	Sensibilité aux antibiotiques.....	4
2.1.6.	Marqueurs épidémiologiques .....	5
2.1.6.1.	Marqueurs phénotypiques.....	5
2.1.6.2.	Marqueurs génotypiques.....	6
2.1.6.2.1.	Sérotypage moléculaire.....	6
2.1.6.2.2.	Électrophorèse en champ pulsé .....	8
2.1.6.2.3.	MultiLocus Sequence Typing.....	8
2.2.	Streptocoque du groupe B et infections materno-fœtales .....	9
2.2.1.	Epidémiologie et sérotypes .....	9
2.2.1.1.	Incidence des infections materno-foetales.....	9
2.2.1.1.1.	Évolution de l'incidence des infections materno-fœtales.....	9
2.2.1.1.2.	Incidence actuelle.....	10
2.2.1.2.	Taux de mortalité .....	11
2.2.1.3.	Sérotypes capsulaires des souches impliquées dans les infections néonatales ...	12
2.2.1.4.	Colonisation vaginale à streptocoque du groupe B.....	13
2.2.1.5.	Transmission bactérienne materno-foetale.....	14
2.2.1.6.	Facteurs de risque des infections materno-fœtales à streptocoque du groupe B..	16
2.2.2.	Prévention de l'infection précoce à streptocoque du groupe B.....	16
2.2.2.1.	Dépistage du portage pendant la grossesse .....	16
2.2.2.1.1.	Recommandations américaines.....	16
2.2.2.1.2.	Recommandations françaises .....	17
2.2.2.2.	Antibioprophylaxie per-partum.....	17
2.2.2.2.1.	Recommandations américaines.....	18
2.2.2.2.2.	Recommandations françaises .....	19
2.2.2.2.3.	Modalités de l'antibioprophylaxie.....	19
2.2.3.	Diagnostic et prise en charge des infections materno-fœtales à streptocoque du groupe B.....	20

2.2.3.1.	Chorioamniotite .....	20
2.2.3.2.	Infection néonatale .....	21
2.2.3.2.1.	Infection néonatale précoce.....	21
2.2.3.2.2.	Infection néonatale tardive.....	22
2.2.3.3.	Complications maternelles infectieuses du post-partum .....	22
2.3.	Streptocoque du groupe B et infections chez l'adulte.....	23
2.3.1.	Epidémiologie et sérotypes .....	23
2.3.1.1.	Incidence des infections à streptocoque du groupe B chez l'adulte .....	24
2.3.1.2.	Démographie et taux de mortalité.....	24
2.3.1.3.	Sérotype capsulaire dans les infections invasives chez l'adulte .....	25
2.3.1.4.	Infections nosocomiales .....	26
2.3.1.5.	Colonisation par le streptocoque du groupe B chez l'adulte .....	26
2.3.1.6.	Facteurs de risque des infections chez l'adulte .....	26
2.3.2.	Aspects cliniques .....	28
3.	Objectif du travail.....	29
4.	Matériel et méthodes .....	30
4.1.	Souches bactériennes .....	30
4.2.	Extraction de l'ADN chromosomique.....	30
4.3.	Sérotypage moléculaire .....	31
4.3.1.	Principe.....	31
4.3.2.	PCR d'amplification.....	32
4.3.3.	Révélation par électrophorèse .....	33
4.4.	MultiLocus Sequence Typing .....	34
4.4.1.	Principe de la méthode utilisée .....	34
4.4.2.	PCR d'amplification.....	34
4.4.3.	Révélation par électrophorèse et purification des amplicons.....	35
4.4.4.	Réaction de séquençage .....	36
4.4.5.	Purification des produits de séquençage.....	36
4.4.6.	Séquençage et analyse des séquences.....	37
4.4.6.1.	Lecture des séquences .....	37
4.4.6.2.	Détermination des allèles et profils.....	38
4.4.6.3.	Détermination des complexes clonaux .....	38
4.4.6.4.	Réalisation des arbres phylogénétiques.....	40
4.4.6.4.1.	Méthode utilisant les séquences nucléotides.....	40
4.4.6.4.2.	Méthode utilisant les profils alléliques.....	41
5.	Résultats .....	42
5.1.	Sérotypes moléculaires des souches d'origine pulmonaire .....	42

5.2. Polymorphisme allélique des sept loci .....	43
5.3. Profils alléliques ou Sequence Types des souches d'origine pulmonaire .....	47
5.4. Complexes clonaux des souches d'origine pulmonaire .....	48
5.5. Corrélation entre Sequence Types et sérotypes des souches d'origine pulmonaire .....	51
5.6. Corrélation entre sérotypes et complexes clonaux des souches d'origine pulmonaire .....	52
5.7. Comparaison des sérotypes des souches d'origine pulmonaire avec des souches d'autres origines.....	53
5.8. Comparaison des Sequence Types des souches d'origine pulmonaire avec des souches d'autres origines .....	54
5.9. Comparaison des complexes clonaux des souches d'origine pulmonaire avec des souches d'autres origines .....	55
5.10. Structure de la population des souches de streptocoque du groupe B d'origine pulmonaire .....	56
5.11. Position phylogénétique des souches de streptocoque du groupe B d'origine pulmonaire au sein de l'espèce.....	58
6. Discussion .....	60
7. Conclusion.....	67
8. Bibliographie.....	68
9. Annexes .....	76

## Liste des annexes

- Annexe 1 Programmes du thermocycleur pour les différentes PCR
- Annexe 2 Tableaux des concentrations et volumes d'ADN
- Annexe 3 Tableaux des résultats des sérotypes, Sequence Types et complexes clonaux pour toutes les souches analysées
- Annexe 4 Nouveaux allèles et Sequence Type
- Annexe 5 Tableaux des résultats de tous les Sequence Types des souches d'origine pulmonaire
- Annexe 6 Arbres phylogénétiques

## Liste des tableaux

- Tableau 1 : Répartition des sérotypes des streptocoques du groupe B dans les infections chez l'adulte aux Etats-Unis et en Europe
- Tableau 2 : Amorces pour le sérotypage d'après Imperi et al
- Tableau 3 : Taille des fragments attendus en fonction du sérotype
- Tableau 4 : Gènes de ménage pour la technique MLST d'après Nicola Jones
- Tableau 5 : Amorces pour la technique MLST
- Tableau 6 : Résultats des sérotypes des souches d'origine pulmonaire
- Tableau 7 : Polymorphisme allélique des sept gènes de ménage pour toutes les souches analysées
- Tableau 8 : Polymorphisme des souches d'origine pulmonaire (a) et des souches de diverses origines (b).
- Tableau 9 : Résultats des STs des souches d'origine pulmonaire
- Tableau 10 : Résultats des complexes clonaux des souches d'origine pulmonaire
- Tableau 11 : Répartition des Sequence Types dans les complexes clonaux
- Tableau 12 : Corrélation entre les Sequence Types et les sérotypes
- Tableau 13 : Corrélation entre complexes clonaux et sérotypes

## Liste des figures

- Figure 1 : Séquences d'ADN de la région cps
- Figure 2 : Evolution de l'incidence des infections néonatales précoces et tardives de 1990 à 2008 aux Etats-Unis (CDC)
- Figure 3 : Répartition des sérotypes dans les infections materno-fœtales en France pendant la période 2006 - 2007 d'après Poyart et al
- Figure 4 : Schéma représentant les différentes entités des infections materno-fœtales et leur transmission
- Figure 5 : Répartition des sérotypes dans les infections chez l'adulte en France pendant la période 2007 - 2010 d'après Tazi et al
- Figure 6 : Schéma représentant les bandes électrophorétiques des sept gènes de ménage
- Figure 7 : Capture d'écran de l'onglet « Analyzed » du logiciel Sequence Scanner
- Figure 8 : Capture d'écran de la fenêtre « Diagram » du logiciel eBURST représentant un aperçu de la population analysée
- Figure 9 : Capture d'écran de la fenêtre de visualisation des arbres phylogénétiques du logiciel MEGA
- Figure 10 : Captures d'écran de la fenêtre de visualisation de l'arbre phylogénétique
- Figure 11 : Electrophorèse pour le sérotypage d'après Imperi et al représentant tous les sérotypes (Ia, Ib, II à IX)
- Figure 12 : Répartition des sérotypes des souches d'origine pulmonaire
- Figure 13 : Répartition des STs des souches d'origine pulmonaire
- Figure 14 : Répartition des complexes clonaux des souches d'origine pulmonaire
- Figure 15 : Diagramme eBURST représentant les souches d'origine pulmonaire parmi les autres souches étudiées
- Figure 16 : Répartition des sérotypes en fonction de l'origine des souches
- Figure 17 : Répartition des Sequence Type en fonction de l'origine des souches
- Figure 18 : Répartition des complexes clonaux en fonction de l'origine des souches
- Figure 19 : Arbre phylogénétique représentant les souches d'origine pulmonaire, réalisé à partir du supergène avec la méthode UPGMA sur le logiciel MEGA

- Figure 20 : Arbre phylogénétique représentant toutes les souches de streptocoque du groupe B, réalisé à partir du supergène avec la méthode UPGMA avec le logiciel MEGA
- Figure 21 : Répartition des sérotypes des souches d'origine pulmonaire chez l'adulte comparée aux données de la littérature de 2000 à 2012
- Figure 22 : Répartition des Complexes clonaux des souches des études réalisées à Tours chez l'adulte, comparée aux données de la littérature

## Liste des abréviations

AAP	American Academy of Pediatrics
ACOG	American College of Obstetrics and Gynecology
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ANAES	Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé
ARN	Acide RiboNucléique
CC	Complexe Clonal
CDC	Center for Disease Control
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
CO <sub>2</sub>	DiOxyde de Carbone
CPS	Capsular Polysaccharide Synthesis
DLV	Double Locus Variant
dNTP	désoxyNucléotide TriPhosphate
ECBU	Examen CytoBactériologique des Urines
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IV	Intra-Veineux
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
MLST	Multi-Locus Sequence Typing
NJ	Neighbour Joining
NT	Non Typable
ORL	Oto-Rhino-Laryngologiste
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PV	Prélèvement Vaginal
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SA	Semaine d'Aménorrhées
SGB	Streptocoque du groupe B
ST	Sequence Type
SLV	Single Locus Variant
TBE	Tris, Borate, EDTA
TE	Tris EDTA
TLV	Triple Locus Variant
UMR	Unité Mixte de Recherche

UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UV	Ultra Violet

# 1. Introduction

*Streptococcus agalactiae* ou streptocoque du groupe B (SGB) est une bactérie fréquemment en cause dans les infections materno-fœtales et néonatales dans les pays développés. Il apparaît également comme un pathogène émergent dans les infections chez les personnes âgées depuis deux décennies. Divers outils de typage épidémiologique développés au cours du temps ont montré l'existence de génogroupes particuliers impliqués dans les infections néonatales et dans certaines infections de l'adulte. Cependant, peu de données concernent les infections pulmonaires.

Dans ce travail, nous avons étudié les souches de streptocoque du groupe B d'origine pulmonaire provenant de patients hospitalisés dans plusieurs CHU entre 2007 et 2011, par les techniques de MultiLocus Sequence Typing et de sérotypage moléculaire.

Dans la première partie de notre travail, nous rappellerons les données de la littérature concernant le streptocoque du groupe B dans les infections materno-fœtales et dans les infections chez l'adulte. Dans une seconde partie consacrée au travail expérimental, nous présenterons les techniques et les résultats des analyses réalisées sur les souches d'origine pulmonaire.

## **2. Généralités**

### **2.1. Streptocoque du groupe B**

#### **2.1.1. Historique**

En 1887, Nocard et Mollereau décrivent pour la première fois, le streptocoque de la mammites bovine (1). En 1933, Rebecca Lancefield crée un système de classification des streptocoques en fonction des antigènes polysaccharidiques de la paroi (2) et classe le streptocoque de la mammites bovine dans le groupe B, groupe qu'elle sépare en 3 sérotypes : I, II et III (3) en 1934. En 1935, Lancefield et Hare découvrent que le streptocoque du groupe B est souvent retrouvé dans les fièvres du post-partum, et Colebrook et Purdie l'isolent pour la première fois dans le sang d'une femme atteinte de septicémie puerpérale en 1937.

A partir de 1958, les infections à streptocoque du groupe B sont documentées et on observe une augmentation de leur fréquence, en particulier chez les nouveau-nés et les nourrissons. Dans les années 1970, le taux de mortalité est proche de 50% dans les infections néonatales (4).

Dans les années 1980, des études démontrent que l'administration d'antibiotiques en intrapartum permet la prévention des infections néonatales précoces. De nombreuses recommandations sont alors élaborées par divers organismes pour prévenir la transmission verticale. Aux États-Unis, plusieurs publications se succèdent dès le début des années 1990 : The American Academy of Pediatrics (1992) (5), The American College of Obstetricians and Gynecologists (1996) (6) et Centers for Disease Control (1996) (7). En France, il faut attendre 2001 pour que l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé (8) publie ses recommandations.

Dès la mise en place des recommandations pour le dépistage, le diagnostic et la prophylaxie dans les années 1990, on observe une diminution importante de l'incidence des infections à streptocoques du groupe B.

Mais malgré ces recommandations, le streptocoque du groupe B reste à l'heure actuelle la première cause de sepsis néonatal.

Parallèlement aux infections néonatales, on observe une augmentation du nombre d'infections à streptocoque du groupe B chez l'adulte (9). L'incidence de ces infections est en augmentation ces dernières décennies, en particulier chez les personnes présentant des pathologies sous-jacentes.

### **2.1.2. Taxonomie et nomenclature**

L'espèce *Streptococcus agalactiae* appartient à l'ordre des Micrococcales, à la famille des *Streptococcaceae* et au genre *Streptococcus*.

Il appartient aux streptocoques pyogènes et produit une hémolyse bêta quand il est cultivé sur gélose au sang. Il possède l'antigène du groupe B de la classification de Lancefield.

### **2.1.3. Caractères bactériologiques**

Le streptocoque du groupe B est un cocci Gram positif de diamètre inférieur à 2 micromètres, disposé en paires (diplocoques) ou en chaînettes de longueur variable, disposition liée aux divisions successives des cellules selon un même plan (10).

En culture, il est relativement exigeant, se développant sur milieux riches type gélose Columbia additionnée de sang mouton ou cheval à une température optimale de 35-37°C, et sa croissance est favorisée par une atmosphère anaérobie ou enrichie en CO<sub>2</sub> (5 à 10%).

Après 24h de culture, on observe des colonies de taille moyenne (1 à 2 millimètres de diamètre), bombées, opaques, parfois pigmentées en orangé et présentant une zone étroite d'hémolyse bêta.

Il est dépourvu de catalase et de cytochrome oxydase et possède un métabolisme fermentant (production d'acide lactique à partir du glucose).

Parmi ces autres caractéristiques bactériologiques, il est immobile et asporulé, il hydrolyse l'hippurate, mais pas l'esculine et il présente une résistance à l'optochine et à la bacitracine.

#### **2.1.4. Pouvoir pathogène**

Initialement isolée de lésions mammaires de bovidés (11), cette bactérie infecte aussi bien l'homme que le bétail. Commensale de la flore génitale et digestive chez l'individu sain, c'est un streptocoque pyogène capable de donner des infections aiguës et invasives.

En pathologie humaine, il est impliqué dans les infections materno-foetales où, après contamination périnatale, il donne des septicémies, des pneumonies et des méningites néonatales.

Chez l'adulte, il provoque des infections variées telles que des infections urogénitales, des endocardites aiguës, des septicémies, des arthrites, des ostéomyélites, des infections des tissus mous, des méningites et plus rarement des endophtalmies, ou des pneumopathies.

#### **2.1.5. Sensibilité aux antibiotiques**

Habituellement sensible aux bêta-lactamines, ce germe présente cependant des résistances fréquentes aux cyclines, macrolides et apparentés.

Au niveau mondial, 31% des souches sont résistantes à l'érythromycine et 23% des souches à la clindamycine.

La prévalence de la résistance parmi les isolats invasifs de streptocoque du groupe B aux Etats-Unis allait de 25% à 32% pour l'érythromycine et de 13% à 20% pour la clindamycine dans les rapports publiés au cours de la période 2006-2009 (12–14).

En France, sur la période de 2007 à 2010, la résistance aux macrolides a augmenté de façon significative, passant de 20% en 2007 à 35,3% en 2010 (15–17).

Quant à la résistance à la tétracycline, elle est retrouvée dans environ 85% des souches (18–20).

Les tests de sensibilité aux antibiotiques doivent donc être réalisés chez les patients ayant un antécédent d'anaphylaxie après administration d'une pénicilline ou d'une céphalosporine pour rechercher une éventuelle résistance aux macrolides et apparentés qui sont utilisés comme alternative.

## **2.1.6. Marqueurs épidémiologiques**

Il existe deux types de marqueurs : les marqueurs phénotypiques, qui prennent en compte les caractères exprimés par la bactérie et les marqueurs génotypiques, qui sont basés sur l'analyse de l'ADN ou ARN bactérien.

### **2.1.6.1. Marqueurs phénotypiques**

Les techniques de recherche de marqueurs phénotypiques sont en général faciles à mettre en œuvre. Parmi les techniques existantes, le sérotypage est la plus utilisée. Basée sur la présence ou l'absence de déterminants antigéniques capsulaires, c'est la première méthode de typage des streptocoques bêta-hémolytiques, proposée par R. Lancefield en 1934. À cette époque, la méthode reposait sur la recherche de précipitines entre la bactérie et le sérum de lapin immunisé (3).

Actuellement, les techniques utilisent des particules de latex sensibilisées avec des anticorps spécifiques des dix sérotypes existants (Ia, Ib et II à IX) (21), permettant ainsi le typage de presque 90% des souches.

### **2.1.6.2. Marqueurs génotypiques**

Les techniques génotypiques sont basées sur l'analyse de l'ADN ou ARN bactérien.

#### **2.1.6.2.1. Sérotypage moléculaire**

Le polysaccharide capsulaire possède une structure et une composition différentes en fonction du sérotype, dues à la variabilité des gènes du locus *cps* (Capsular Polysaccharide Synthesis). Ces gènes codent pour les enzymes nécessaires à la synthèse de la capsule polysaccharidique. Cette région contient des gènes conservés d'un sérotype à l'autre, et d'autres très variables; de plus, tous les sérotypes ne possèdent pas tous les gènes du locus *cps* (22). Les gènes *cpsA* à *cpsE*, *cpsL*, *neuB*, *neuC*, *neuD* et *neuA* (représentés en blanc sur la figure 1) sont conservés pour tous les types capsulaires alors que les gènes présents dans la région située entre les gènes *cpsG* et *cpsK* sont différents pour chaque sérotype connu. La méthode de sérotypage moléculaire analyse les gènes de cette région.

Il existe dix types capsulaires décrits; ils possèdent des propriétés antigéniques différentes et donc des régions *cps* différentes. Le type capsulaire IX a été décrit en 2007 (21) et n'est pas représenté sur la figure. Il possède une région *cps* semblable à celle du sérotype V mais avec un gène *cpsH* qui diffère de 5 nucléotides.

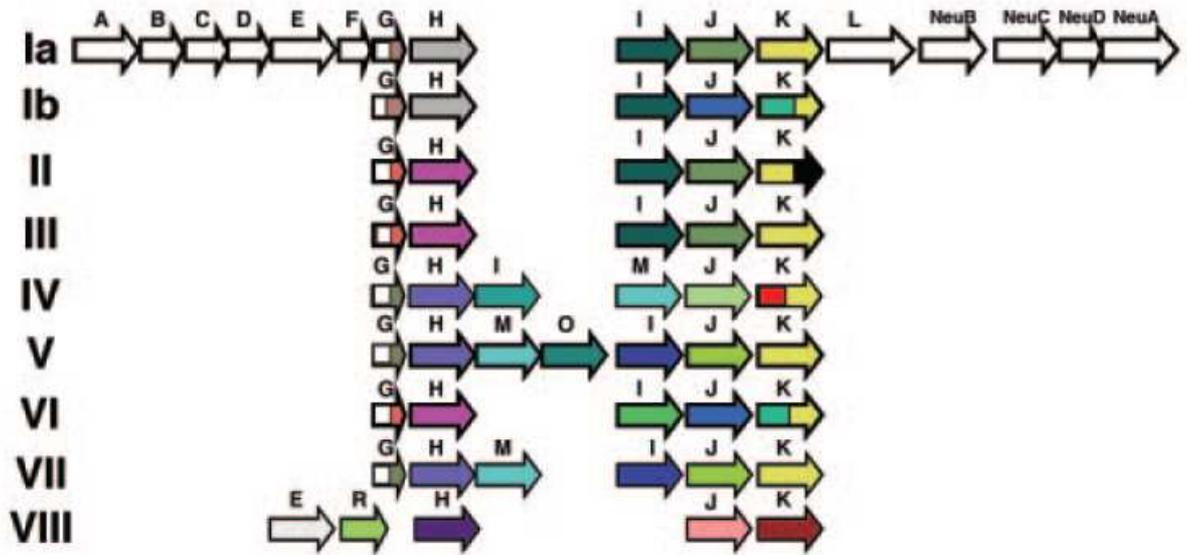


Figure 1 : Séquences d'ADN de la région *cps* – Cieslewicz et al. (22)

Il existe plusieurs techniques de sérotypage moléculaire décrites par différents auteurs :

- Kong et al. ont décrit initialement une méthode utilisant une PCR multiplex ciblant partiellement les gènes de capsule du streptocoque du groupe B, associée au séquençage (23). Une technique de révélation plus simple par hybridation avec des sondes biotinylées a été ensuite mise au point (24,25).
- Manning et al. (26) ont proposé une technique avec une PCR ciblant les gènes de synthèse de la capsule polysaccharidique suivie d'une digestion par des enzymes de restriction à nombre de sites de coupure élevé (RFLP) et révélée par une électrophorèse simple.
- Les techniques proposées par Poyart et al. (27) et Imperi et al. (28) reposent sur une PCR multiplex suivie d'une électrophorèse.

Dans toutes ces techniques, la taille des différents fragments obtenus permet de déterminer le sérotype moléculaire.

#### 2.1.6.2.2. Électrophorèse en champ pulsé

Le principe de l'électrophorèse en champs pulsé (PFGE) repose sur la digestion du génome bactérien entier par des enzymes de restriction avec faible nombre de sites de coupure, produisant des fragments de grande taille (entre 10 et 800 kb), suivie d'une électrophorèse utilisant deux champs électriques activés alternativement permettant de séparer les fragments par rapport à leur taille.

Le profil de restriction obtenu est un profil de macro-restriction intéressant tout le génome bactérien. (10,29–31).

#### 2.1.6.2.3. MultiLocus Sequence Typing

Le MultiLocus Sequence Typing (MLST) (32,33) est la méthode de référence pour étudier la diversité génétique des populations bactériennes, y compris le streptocoque du groupe B.

Le principe repose sur l'amplification et le séquençage de sept gènes dits « de ménage ». Les séquences sont ensuite comparées aux bases de données MLST et un profil allélique est attribué à chaque combinaison d'allèles. Cette méthode a été utilisée pour typer les souches et étudier la structure de la population d'un certain nombre de pathogènes bactériens humains. Cette technique est particulièrement adaptée pour les études épidémiologiques, car elle fournit des données qui peuvent facilement être comparées entre elles et permettent de construire des arbres phylogénétiques. Les données de séquences d'ADN obtenues avec MLST sont stockées dans une base de données sur Internet. Cette méthode est suffisamment discriminatoire pour les études épidémiologiques et fournit un moyen précis de caractérisation des isolats (33).

Il existe une relation entre ST et sérotype capsulaire, mais un sérotype capsulaire n'est généralement pas limité à un ST spécifique, et inversement (33). Les STs les plus communs chez l'homme sont les ST-1, ST-17, ST-19 et ST-23. ST-19 et ST-1 contiennent plusieurs sérotypes capsulaires différents et sont significativement associés au portage. ST-17, plus homogène, est composé essentiellement de souches de sérotype III et est principalement associé aux infections néonatales. ST-23 contient majoritairement des souches de sérotype Ia et est retrouvé dans des souches de portage et des souches d'infection néonatale.

## **2.2. Streptocoque du groupe B et infections materno-fœtales**

L'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé définit l'infection materno-foetale comme une infection néonatale transmise par la mère, qu'elle présente ou non des signes d'infection (8). Elle regroupe plusieurs entités : les infections néonatales précoces et tardives, ainsi que les chorioamniotites et les complications infectieuses maternelles du post-partum.

### **2.2.1. Epidémiologie et sérotypes**

#### **2.2.1.1. Incidence des infections materno-foetales**

##### **2.2.1.1.1. Évolution de l'incidence des infections materno-foetales**

En Europe, comme aux Etats Unis, l'incidence des infections néonatales précoces a diminué de 86% après la mise en place des mesures préventives, passant de 1,92 cas pour 1000 naissances vivantes en 1994 à 0,18 cas pour 1000 naissances vivantes en 2009 (Figure 2) (34,35). Ces mesures ont aussi permis de prévenir certaines infections du post-partum chez la mère, mais elles n'ont pas permis la diminution des infections néonatales tardives. Ainsi, l'incidence de ces

infections néonatales tardives est demeurée relativement stable au cours des 20 dernières années aux Etats-Unis (0,4 cas pour 1000 naissances vivantes) et a même augmenté de 0,11 cas pour 1000 naissances vivantes en 1996 à 0,81 en 2009 dans certains pays d'Europe (34–37).

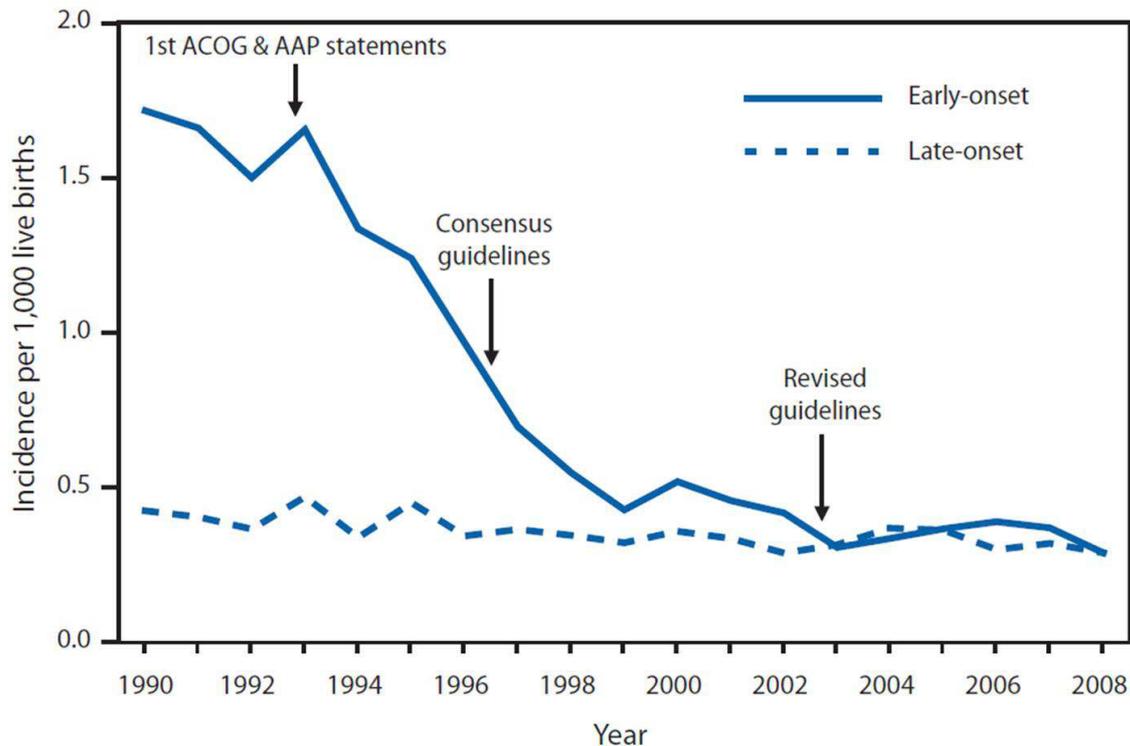


Figure 2 : Evolution de l'incidence des infections néonatales précoces et tardives de 1990 à 2008 aux Etats-Unis - CDC (35).

#### 2.2.1.1.2. Incidence actuelle

Dans le monde, l'incidence des infections à streptocoque du groupe B chez les nourrissons âgés de moins de 3 mois est de 0,53 pour 1000 naissances vivantes, avec une incidence pour les infections précoces de 0,43 et pour les infections tardives de 0,24 (38).

Aux Etats-Unis, l'incidence actuelle des infections néonatales est de 0,34 cas pour 1000 naissances vivantes et celle des infections maternelles de 0,12 cas pour 1000 naissances vivantes (14,39).

En Europe, en 2008-2009, l'incidence totale des infections néonatales est comprise entre 0,4 et 2 pour 1000 naissances vivantes, avec une incidence pour les infections précoces de 0,18 et pour les infections tardives de 0,81 pour 1000 naissances vivantes (34,38).

En France, le streptocoque du groupe B est la cause de 50% des infections néonatales et de 15 % des infections maternelles, et les infections materno-fœtales représentent les 2/3 des infections à streptocoque du groupe B (40). L'incidence des infections materno-fœtales est de 0,4 à 2 cas pour 1000 naissances (8,41,42), 0,75 cas pour 1000 naissances vivantes pour les infections précoces à streptocoque du groupe B et 0,36 cas pour 1000 naissances vivantes pour les infections tardives, celle des chorioamniotites à streptocoque du groupe B à 0,87% et celle des endométrites à streptocoque du groupe B de 0,11% à 0,25% (40,43).

#### **2.2.1.2. Taux de mortalité**

Le taux actuel de mortalité global des infections néonatales est de 9,6% avec un taux pour les infections précoces de 12,1% et pour les infections tardives de 6,8% (38). Ces taux varient en fonction du terme et du poids de naissance.

Aux Etats-Unis, le taux de mortalité est d'environ 4% à 6% avec pour les infections précoces, un taux de 4% à 6,8% (à terme 2 à 2,6%, chez les prématurés 10 à 30% en fonction de l'âge gestationnel) et pour les infections tardives, un taux de 2,8% à 4,7% (à terme 1,4% chez les prématurés 5,3%) (14,35).

En France, le taux de mortalité des infections précoces est de 6% à terme, de 42% chez les prématurés et de 36% chez les hypotrophes (40). Pour les infections tardives, le taux de mortalité est compris entre 2 à 6%.

Les séquelles neurosensorielles sont présentes dans près de 50% des cas et sont plus fréquentes en cas de méningite.

### 2.2.1.3. Sérotypes capsulaires des souches impliquées dans les infections néonatales

D'après les nombreuses études sur la répartition des sérotypes des souches du streptocoque du groupe B, les proportions restent stables dans le temps et les sérotypes prédominants impliqués dans les septicémies néonatales sont les sérotypes III, Ia, Ib, II et V (38).

En Europe, la distribution des sérotypes est similaire dans la plupart des pays (34), et les sérotypes III et Ia représentent près de 80% des isolats alors qu'aux Etats-Unis (14), la prévalence du sérotype V atteint presque 30%.

En France (16), le sérotype III est très majoritaire (61,5%), suivi par le sérotype Ia (28,2%) (Figure 3).

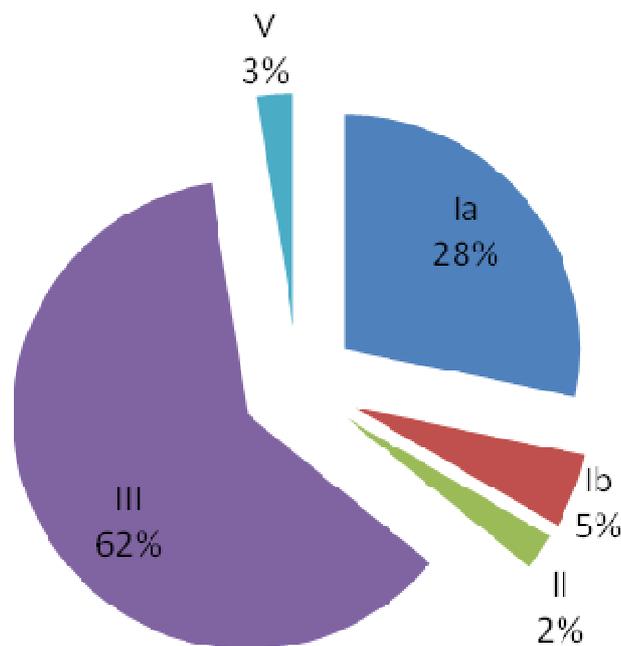


Figure 3 : Répartition des sérotypes dans les infections materno-fœtales en France pendant la période 2006 - 2007 d'après Poyart et al.

#### **2.2.1.4. Colonisation vaginale à streptocoque du groupe B**

L'infection néonatale survient avec des germes non pathogènes pour la femme enceinte, dont le portage vaginal n'est pas synonyme d'infection mais de colonisation maternelle (8). La colonisation vaginale par le streptocoque du groupe B est le principal facteur de risque d'infection néonatale précoce. Plus la colonisation vaginale est importante, plus elle est associée à un risque de transmission élevé et donc d'infection précoce (35,40).

La colonisation peut être transitoire, intermittente ou persistante (44) et le statut d'une femme enceinte vis-à-vis du streptocoque du groupe B peut changer au cours de la grossesse. La colonisation en début de grossesse n'est donc pas prédictive de la colonisation à streptocoque du groupe B en fin de grossesse (35).

La bactériurie à streptocoque du groupe B chez une femme enceinte est un marqueur de colonisation et a été associée à un risque accru d'infection néonatale précoce à streptocoque du groupe B quel que soit le trimestre. Le streptocoque du groupe B est retrouvé dans les urines de 2% à 7% des femmes enceintes (35,45). Des études ont montré que certaines femmes présentant une bactériurie à streptocoque du groupe B au cours du premier trimestre pouvait avoir un dépistage recto-vaginal négatif à 35-37 SA ou au moment de l'accouchement (45) et que malgré l'administration d'antibiotique pour traiter la bactériurie au cours de la grossesse, le streptocoque du groupe B n'est pas complètement éliminé des voies génito-urinaires et gastro-intestinales et la recolonisation est fréquente.

Ainsi, pour les femmes ayant présenté une bactériurie à streptocoque du groupe B ou un portage au cours de leur grossesse, le dépistage à 35-37 semaines d'aménorrhée est inutile car la prophylaxie au moment de l'accouchement sera systématique.

La prévalence du portage du streptocoque du groupe B chez la femme enceinte est comprise entre 5 et 36% dans les pays européens. En ce qui concerne l'Europe de l'ouest, elle est comprise entre 11 et 21% (46) et pour la France, plus particulièrement, elle se situe entre 10% et 15% (8,40). Ces variations de prévalence s'expliquent en partie par une différence de sensibilité des techniques de mise en évidence de la bactérie.

### **2.2.1.5. Transmission bactérienne materno-foetale**

La transmission verticale cause principalement des infections néonatales précoces, alors que l'origine des bactéries provoquant les infections tardives est moins bien comprise (37).

La transmission verticale de la mère au fœtus ou au nouveau-né peut se faire via plusieurs voies : (8,35,37) la contamination par passage à travers la filière génitale au cours de l'accouchement est la voie la plus fréquente. La voie hématogène trans-placentaire au décours d'une infection maternelle (bactériémie, endométrite, pyélonéphrite aiguë) et la voie ascendante, où une bactérie présente dans le vagin pendant la grossesse remonte vers l'utérus jusqu'à la cavité amniotique à travers les membranes intactes ou rompues, (Figure 4) peuvent conduire à des infections intra-utérines (chorioamniotites), pouvant causer le décès du fœtus ou une infection à un stade avancé chez le nouveau-né.

Il existe aussi une transmission horizontale de la mère à l'enfant pendant le post-partum. Dans ce cas, l'allaitement a été identifié comme un facteur de risque de transmission. La transmission horizontale peut aussi expliquer l'infection chez les nourrissons nés de femmes non colonisées, où l'enfant est contaminé par une personne de l'entourage ou le personnel soignant (37).

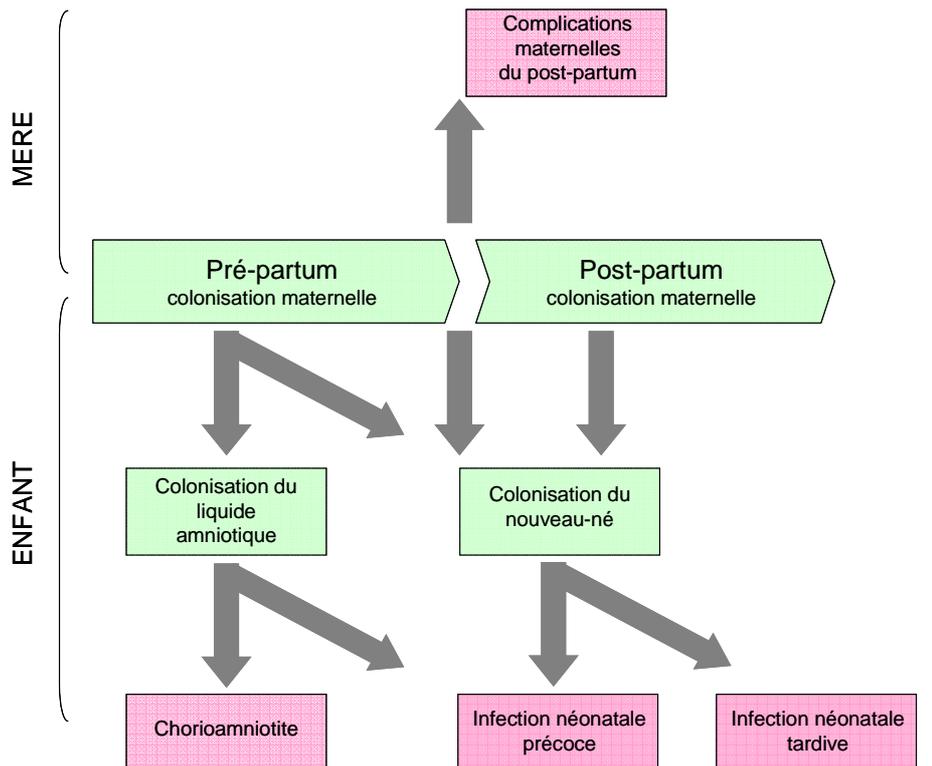


Figure 4 : Schéma représentant les différentes entités des infections materno-fœtales et leur transmission.

La transmission verticale entre la mère et le nouveau-né se produit dans 30 à 70% des cas, soit environ 50% des nouveau-nés colonisés nés de femmes avec un portage vaginal positif (40). En l'absence de toute intervention, on estime que 1% à 2% des nourrissons colonisés vont développer une infection précoce à streptocoque du groupe B (35).

Par ailleurs, chez 5,6% des nouveau-nés colonisés, le streptocoque du groupe B n'a pas été retrouvé dans les prélèvements vaginaux de la mère pendant la grossesse (47).

### **2.2.1.6. Facteurs de risque des infections materno-fœtales à streptocoque du groupe B**

Parmi les facteurs de risques des infections néonatales précoces à streptocoque du groupe B (35,48–50), on retrouve :

- la colonisation des voies génito-urinaires par le streptocoque du groupe B,
- la rupture prématurée des membranes,
- la durée de la rupture des membranes supérieure à 12 heures,
- l'infection intra-amniotique,
- l'antécédent d'un enfant avec une infection invasive à streptocoque du groupe B,
- la température intrapartum supérieure à 37,5°C,
- l'âge gestationnel inférieur à 37 semaines d'aménorrhée,
- le jeune âge et l'ethnie de la mère,
- les manœuvres obstétricales ou un nombre élevé d'examen vaginaux après le début du travail ou de la rupture des membranes,
- le faible niveau d'anticorps maternels spécifiques de la capsule du streptocoque du groupe B.

### **2.2.2. Prévention de l'infection précoce à streptocoque du groupe B**

#### **2.2.2.1. Dépistage du portage pendant la grossesse**

##### **2.2.2.1.1. Recommandations américaines**

Le dépistage systématique à 35 - 37 semaines de grossesse du portage vaginal du streptocoque du groupe B est réalisé par écouvillonnage de la partie inférieure du vagin et du rectum (35). L'écouvillon estensemencé dans un bouillon sélectif, incubé pendant 18 à 24 heures à une température de 35 à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub> ou en air ambiant. A 24 heures, il est repiqué sur une gélose appropriée (gélose

trypticase soja + sang de mouton 5%, gélose Colombia avec colistine et acide nalidixique, ou une gélose chromogène commerciale). Le streptocoque doit être identifié à 24 - 48 h par agglutination et il est recommandé, pour les femmes allergiques aux bêta-lactamines, de réaliser un antibiogramme avec détection de la résistance inductible à la clindamycine. Le dépistage systématique de la bactériurie asymptomatique est recommandé chez les femmes enceintes.

#### 2.2.2.1.2. Recommandations françaises

Le dépistage systématique du portage du streptocoque du groupe B est recommandé en fin de grossesse (entre 34 et 38 semaines d'aménorrhée) (8), par écouvillonnage de l'ensemble de la cavité vaginale. Le prélèvement rectal n'est pas recommandé dans le cadre du dépistage. L'ensemencement dans un bouillon d'enrichissement n'est pas nécessaire au dépistage des femmes à risque et le résultat doit être rendu en semi quantitatif (8,40).

Le dépistage systématique du streptocoque du groupe B est inutile chez les patientes à risque, car l'antibiothérapie prophylactique per-partum devra être systématique. De même, le traitement du portage asymptomatique à distance de l'accouchement n'est pas recommandé car il ne diminue pas le taux de portage à l'accouchement.

#### 2.2.2.2. Antibio prophylaxie per-partum

Dans les années 1980, les essais cliniques ont montré que l'administration d'antibiotiques pendant le travail par voie intraveineuse chez les femmes à risque de transmission de streptocoque du groupe B réduit la transmission verticale du streptocoque du groupe B (diminution de la colonisation du nourrisson et des infections précoces) (51,52). L'efficacité est de 86% à 89% chez les enfants nés de mères ayant reçu une prophylaxie intrapartum active contre streptocoque du groupe B (50).

#### 2.2.2.2.1. Recommandations américaines

Les premières recommandations ont été émises dans les années 1990 par l'American Academy of Pediatrics (AAP) (5), l'American Congress of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) (6) et le Centers for Disease Control (CDC) (7). Depuis, ces recommandations sont révisées régulièrement et le dépistage de toutes les femmes enceintes à 35-37 semaines de grossesse a été institué pour optimiser l'administration de l'antibioprophylaxie intrapartum.

D'après les dernières recommandations du CDC (35), les indications de l'antibioprophylaxie intrapartum contre le streptocoque du groupe B sont :

- un antécédent de nouveau-né avec une infection invasive à streptocoque du groupe B lors d'une précédente grossesse,
- une bactériurie à streptocoque du groupe B retrouvée au cours de n'importe quel trimestre de la grossesse en cours,
- un dépistage recto-vaginal positif en fin de grossesse,
- en cas de statut inconnu pour le streptocoque du groupe B au début du travail si l'un des éléments suivants est présent :
  - un accouchement prématuré (âge gestationnel avant 37 semaines de grossesse),
  - une rupture des membranes supérieure à 18 heures,
  - une température intrapartum supérieure à 38°C,
  - une PCR positive pour la recherche de streptocoque du groupe B dans le prélèvement vaginal réalisé au moment de l'accouchement.

En revanche, la prophylaxie intrapartum n'est pas indiquée s'il y a eu une colonisation ou une bactériurie à streptocoque du groupe B au cours d'une grossesse précédente, si le dépistage vaginal et rectal du streptocoque du groupe B est négatif en fin de grossesse et en cas d'accouchement par césarienne débuté avant le début du travail chez une femme avec membranes amniotiques intactes, indépendamment de leur statut vis-à-vis du streptocoque du groupe B ou de l'âge gestationnel.

#### 2.2.2.2.2. Recommandations françaises

L'antibiothérapie prophylactique per-partum contre le streptocoque du groupe B est recommandée (8) dans les situations suivantes :

- un dépistage positif pour la grossesse en cours
- chez les patientes à risque :
  - présence d'un antécédent d'infection néonatale à streptocoque du groupe B au cours d'une grossesse précédente,
  - découverte d'une bactériurie à streptocoque du groupe B au cours de la grossesse en cours,
- en l'absence de dépistage du streptocoque du groupe B et si l'un des facteurs de risque suivants est présent :
  - température maternelle au cours du travail supérieure à 38°C,
  - durée de la rupture des membranes supérieure à 12 heures,
  - accouchement survenant avant 37 semaines d'aménorrhée.

L'antibioprofylaxie n'est en revanche pas indiquée si la culture est négative même en cas d'accouchement prématuré, sauf en cas de rupture prématurée des membranes.

#### 2.2.2.2.3. Modalités de l'antibioprofylaxie

La prophylaxie doit être débutée le plus précocement, au début du travail ou au moment de la rupture des membranes, par voie intraveineuse, pendant une durée au moins supérieure à 4 heures (8,35).

Parmi les molécules utilisées, la pénicilline G reste l'antibiotique de référence pour la prophylaxie avec comme alternative l'ampicilline. L'ANAES propose le schéma suivant : amoxicilline en IV avec une dose de charge de 2 g, puis 1 g toutes les 4 heures jusqu'à l'expulsion.

En cas d'allergie aux bêta-lactamines, l'antibioprophylaxie doit être adaptée à l'antibiogramme : si la souche est sensible aux macrolides et apparentés, la clindamycine peut être utilisée à la dose de 900 mg, toutes les 8 heures, jusqu'à l'accouchement. En cas de résistance aux macrolides et apparentés, la vancomycine est l'alternative recommandée, à la dose de 1g en IV au début du travail puis 1g toutes les 12 h et 1g 12 h après la délivrance.

### **2.2.3. Diagnostic et prise en charge des infections materno-fœtales à streptocoque du groupe B**

#### **2.2.3.1. Chorioamniotite**

La chorioamniotite est une infection du placenta et des membranes et concerne donc aussi bien la mère que le fœtus (8,53,54). La chorioamniotite est le premier diagnostic à exclure en cas de fièvre maternelle en cours de grossesse. C'est une urgence obstétricale. Les principaux signes cliniques sont, chez la mère, de la fièvre (supérieure à 38°C), une tachycardie, une sensibilité et/ou des contractions utérines, un syndrome inflammatoire avec une hyperleucocytose et chez le fœtus, des troubles du rythme cardiaque. Le liquide amniotique est nauséabond, fétide ou purulent et l'examen bactériologique y retrouve la présence de germes pathogènes. L'infection est souvent d'origine ascendante et rarement d'origine hémotogène (8).

Une bi-antibiothérapie curative maternelle per-partum administrée en cas de chorioamniotite permet de diminuer le pourcentage de sepsis périnatal ou néonatal de 5,7 à 21 % à moins de 2,8 % (55). Elle doit être instaurée rapidement, sur une durée de plus de 3 heures avant l'accouchement, après bilan bactériologique (ECBU, PV, hémocultures) et bilan fœtal. Elle doit être suffisamment large pour couvrir les bactéries pathogènes en cause et doit avoir une bonne diffusion intra-amniotique. Plusieurs schémas sont possibles mais il n'existe pas de consensus. L'association d'une bêta-lactamine avec un aminoside est le schéma le plus utilisé : amoxicilline ou

ceftriaxone + gentamicine. En cas d'allergie vraie aux bêta-lactamines on peut utiliser la clindamycine ou la vancomycine associée à la gentamicine.

### **2.2.3.2. Infection néonatale**

#### **2.2.3.2.1. Infection néonatale précoce**

Les infections néonatales précoces sont définies comme des infections survenant entre la naissance et le 6<sup>ème</sup> jour de vie, mais la majorité des cas se déclare dans les 24 à 48 premières heures. La contamination du nouveau-né se fait principalement au moment de l'accouchement par inhalation du liquide amniotique (56). Les bactéries se développent dans le poumon, provoquant des signes respiratoires dans les 24 heures après la naissance puis traversent la membrane alvéolo-capillaire. S'en suit une phase d'invasion intra-vasculaire qui conduit à un sepsis avec des troubles hémodynamiques, une insuffisance cardiaque, une acidose lactique et une défaillance multi-viscérale. Ces infections se présentent comme une septicémie sans signe de localisation dans près de 8 cas sur 10 (14), septicémie qui peut être associée à une pneumonie et moins fréquemment à une méningite (10%), clinique pouvant conduire au décès ou provoquer de graves séquelles néonatales, notamment neurologiques et pulmonaires (8,40).

Actuellement les stratégies de prévention contre le streptocoque du groupe B disponibles n'empêchent pas tous les cas d'infections néonatales précoces et à l'ère du dépistage universel, la majorité des infections précoces à streptocoque du groupe B surviennent chez des nourrissons nés de femmes ayant eu un dépistage prénatal négatif (57). La détection précoce de l'infection, par les signes cliniques et paracliniques de l'enfant, la présence de facteurs de risque maternels d'infection à streptocoque du groupe B et l'initiation d'un traitement approprié sont donc nécessaires pour réduire la morbidité et la mortalité.

Tout nouveau-né avec des signes de sepsis doit recevoir un traitement antibiotique par voie intra-veineuse, actif sur les germes en cause dans les septicémies néonatales, après réalisation des examens bactériologiques (hémoculture, ponction lombaire). Les nouveau-nés bien portant mais dont les mères ont été soupçonnées de chorioamniotite doivent recevoir des antibiotiques en attendant les résultats bactériologiques car la chorioamniotite est un facteur de risque important pour l'infection néonatale précoce à streptocoque du groupe B et peut refléter une infection du nouveau-né qui aurait débuté avant la naissance (35).

#### 2.2.3.2.2. Infection néonatale tardive

Les infections néonatales tardives apparaissent entre une semaine et 3 mois après la naissance (soit entre J7 et J90). L'aspect clinique de ces infections néonatales est plus polymorphe. Elles se traduisent par une bactériémie (2/3 des cas), une méningite (1/3 des cas) (14) pouvant conduire à des séquelles neurologiques mais parfois par une ostéite, une cellulite, ou une infection pulmonaire.

#### 2.2.3.3. Complications maternelles infectieuses du post-partum

Le streptocoque du groupe B est l'une des principales causes d'infections maternelles du post-partum. Parmi ces infections, on retrouve les endométrites et les infections urinaires (43) qui sont les plus fréquentes. Les endométrites obstétricales sont devenues rares depuis l'application des mesures préventives mais peuvent avoir de graves conséquences sur la fertilité ultérieure. Les facteurs favorisant les plus courants sont la rupture prématurée des membranes et les manœuvres endo-utérines.

Les signes cliniques apparaissent 3 à 5 jours après l'accouchement et consistent en une fièvre modérée à 38°C, des douleurs pelviennes peu intenses, des lochies abondantes et malodorantes associées ou non à des métrorragies. Si elle n'est pas traitée à temps, l'endométrite peut se compliquer d'une salpingite, d'une péritonite ou d'une septicémie. Le diagnostic est clinique et l'examen bactériologique vaginal a surtout pour but d'identifier le germe en cause pour adapter l'antibiothérapie.

En cas de suspicion d'infection maternelle du post-partum à streptocoque du groupe B, un bilan maternel comprenant un examen bactériologique vaginal et des hémocultures (si la fièvre est supérieure à 38,5°C), doit être réalisé. Puis une antibiothérapie, à large spectre et compatible avec l'allaitement, de type amoxicilline + acide clavulanique, intraveineuse, adaptée secondairement aux résultats bactériologiques, doit être débutée.

Mais, dans les pathologies maternelles aussi, la prévention, avec le contrôle systématique de l'écologie vaginale au cours de la grossesse et l'administration d'une antibioprophylaxie en per-partum, joue un rôle très important sur la diminution de l'incidence de ces infections.

## **2.3. Streptocoque du groupe B et infections chez l'adulte**

### **2.3.1. Epidémiologie et sérotypes**

Actuellement, les infections chez l'adulte représentent environ 40% des cas d'infection invasive à streptocoque du groupe B (58). Les infections pulmonaires à streptocoque du groupe B chez l'adulte sont relativement rares, elles représentent moins de 10% des infections à streptocoque du groupe B chez l'adulte et ont donc été peu étudiées.

### **2.3.1.1. Incidence des infections à streptocoque du groupe B chez l'adulte**

L'incidence des infections invasives à streptocoque du groupe B chez les adultes est en augmentation dans plusieurs pays.

Aux Etats-Unis, l'incidence est passée de 2,4 cas pour 100.000 personnes en 1982 à 7,3 cas pour 100.000 personnes en 2007 (14,59,60). En Europe, elle est passée de moins de 0,5 pour 100.000 habitants en 1988 à 3,1 pour 100.000 habitants en 2006 (61–64).

Mais, d'après les différentes études, l'incidence des infections invasives à streptocoque du groupe B chez l'adulte varie de 3 à plus de 20 pour 100.000 personnes, en fonction de l'âge, du sexe, de la santé du patient et de la localisation de l'infection (62).

### **2.3.1.2. Démographie et taux de mortalité**

L'incidence des infections invasives à streptocoque du groupe B est particulièrement élevée chez les personnes âgées de plus de 65 ans (14,60). En effet, l'âge moyen des patients varie de 59 à 63 ans en fonction des études (15,59,65–67) et les bactériémies surviennent dans 84,8 % des cas chez le sujet de plus de 50 ans. Cette bactérie est donc bien un pathogène opportuniste pour les sujets les plus fragiles (68).

Le rapport homme/femme (sex ratio) est de 0,44 à 0,51 (62,65,67).

Le taux de mortalité des infections invasives à streptocoque du groupe B chez les adultes varie de 5 à plus de 15% en fonction de l'âge (58,60,62) et de la localisation de l'infection.

### 2.3.1.3. Sérotype capsulaire dans les infections invasives chez l'adulte

D'après les études épidémiologiques menées depuis 2 décennies, la distribution des sérotypes est restée stable au cours du temps et les sérotypes Ia, III et V représentent près de  $\frac{3}{4}$  des souches. Dans les études réalisées aux Etats-Unis, le sérotype le plus répandu semble être le sérotype V, alors qu'en Europe, c'est le sérotype III (14,58,60–62). (Tableau 1)

Tableau 1 : Répartition des sérotypes des streptocoques du groupe B dans les infections chez l'adulte aux Etats-Unis et en Europe du Nord

	États-Unis	Europe du Nord
Ia	24 à 24,3 %	14,6 à 19,7 %
Ib	12,20%	9,2 à 15,1 %
II	11,9 à 13,4 %	
III	11,4 à 16,5 %	24,4 à 29,4 %
V	27,5 à 31 %	18,7 à 24,1 %
Non typables	7,10%	

En France pendant la période 2007-2010, les sérotypes III, V et Ia représentaient 71,8% des cas (Figure 5).

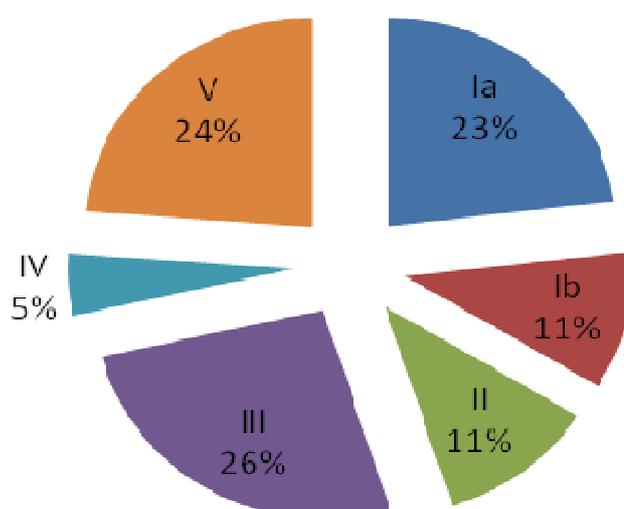


Figure 5 : Répartition des sérotypes dans les infections chez l'adulte en France pendant la période 2007 - 2010 d'après Tazi et al (15)

#### **2.3.1.4. Infections nosocomiales**

Les infections nosocomiales représentent, selon les études entre 10% et 35% des infections à streptocoque du groupe B (9,59,65,66,69–72).

Parmi les infections nosocomiales, 45% des patients avaient subi un geste invasif (chirurgie, cystoscopie, ou biopsie), 18% avaient des cathéters centraux et 9% des cathéters urinaires (73).

#### **2.3.1.5. Colonisation par le streptocoque du groupe B chez l'adulte**

La prévalence du portage recto-vaginal est d'environ 25% chez les jeunes adultes en bonne santé hors grossesse et de 12% à 22% en fonction des études dans les populations plus âgées. Elle ne diffère donc pas de façon significative de celle observée chez les femmes enceintes (15% à 35%) (58,74). La répartition des sérotypes des souches de portage recto-vaginal est la suivante : Ia (22,8%), III (12,3%), V (47,3%), NT (12,3%). La prévalence du portage du streptocoque du groupe B au niveau cutané est de 2% (75). Quant à la prévalence du portage pharyngé, elle est aussi de 2% chez les personnes âgées (58,76) et parmi les souches retrouvée au niveau de la gorge, on retrouve les profils alléliques suivants : ST-1, ST-8, ST-23 (75).

#### **2.3.1.6. Facteurs de risque des infections chez l'adulte**

Bien que l'infection à streptocoque du groupe B puisse survenir chez des adultes en bonne santé, la majorité des cas survient chez les patients qui ont d'importantes pathologies sous-jacentes (77–79).

La fréquence des pathologies sous-jacentes est de 69,2% à 92% (14,59–61,63,66,67,73,79). Parmi les plus fréquemment rencontrées, on retrouve :

- le diabète (15 à 60 % des patients selon les études) plus particulièrement chez ceux présentant une insuffisance vasculaire périphérique,
- le cancer (7 à 23 %) avec comme origine fréquemment retrouvée, les seins, la peau, une origine hématologique,
- les hépatopathies dont la cirrhose et l'éthylisme chronique (7 à 19%),
- l'insuffisance rénale chronique et les uropathies (20,3%),
- les maladies cardiovasculaires (11,3%),
- les maladies respiratoires chroniques (6%),
- un traitement immunosuppresseur (4%) dont corticostéroïdes,
- les maladies neurologiques.

On retrouve aussi dans le contexte clinique un antécédent de chirurgie (12 à 17 %) ou une notion de décubitus ou d'hospitalisation de longue durée. (58,64,65). La neutropénie est aussi évoquée dans certaines publications (79).

En résumé, les adultes à risque de contracter une infection grave à streptocoque du groupe B semblent être les adultes ayant un déficit immunitaire (14,62). Les personnes âgées représentent plus de 40% des personnes atteintes par des infections invasives à streptocoques du groupe B probablement en raison de l'augmentation des pathologies sous-jacentes associées avec l'âge (65).

### 2.3.2. Aspects cliniques

Le streptocoque du groupe B donne des pathologies variées chez l'adulte (15,60,65–67,70,73) :

- des infections de la peau et des tissus mous (13% à 42%) : abcès, cellulites, fasciites, infections de plaies ou d'ulcères,
- des infections ostéo-articulaires (7% à 22%) : arthrites, bursites, ostéomyélites, spondylarthrites, infections sur prothèse articulaire,
- des infections pulmonaires (3 à 13%),
- des bactériémies sans point d'appel infectieux (8 à 43%),
- des infections des voies urinaires (8 à 33%),
- des péritonites (3 à 10%),
- des méningites (2 à 9%),
- des endocardites (4 à 10%),
- d'autres infections : péricardites, myocardites, endophtalmies, infections sur cathéters intraveineux.

Les infections pulmonaires à Streptocoque du groupe B surviennent généralement chez des patients plus âgés ou des adultes souffrant d'un dysfonctionnement du système nerveux central ou de pathologie ORL locale, provoquant des troubles de la déglutition (par exemple cancer du larynx) (58,59,80). L'inhalation serait probablement le mécanisme impliqué dans la survenue des infections des voies respiratoires inférieures. La pneumonie est souvent associée aux soins, le taux de mortalité est élevé et l'isolement concomitant d'un autre organisme, en particulier *Staphylococcus aureus*, est fréquent. Les radiographies thoraciques révèlent des infiltrats lobaires ou multi-lobaires qui ne sont habituellement pas associés à des réactions pleurales ou à une nécrose des tissus du poumon.

### **3. Objectif du travail**

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe « Bactéries et risque materno-fœtal » de l'UMR INRA 1282 « Infectiologie et santé Publique ». Il s'inscrit dans la thématique générale de l'équipe qui vise à comprendre les spécificités des souches impliquées dans les infections néonatales et des sujets adultes par rapport aux souches de colonisation.

L'objectif de notre travail a été de rechercher si les souches de streptocoque du groupe B isolées de l'écosystème pulmonaire représentaient un groupe particulier au sein de l'espèce. Dans cette perspective, les souches isolées de prélèvements pulmonaires de divers CHU entre 2007 et 2011 ont été analysées par typage capsulaire moléculaire et par MultiLocus Sequence Typing et comparées à des souches de colonisation ou isolées d'autres infections.

## **4. Matériel et méthodes**

### **4.1. Souches bactériennes**

Les 74 souches étudiées proviennent de prélèvements respiratoires de patients hospitalisés entre 2007 et 2011 dans les Centres Hospitalo-Universitaires d'Amiens, de Brest, de Toulouse et de Tours. Les souches ont été conservées en bouillon K3 Schaedler additionné de 15 % de glycérol à – 80 °C. Elles ont été ensemencées sur des géloses Trypticase-Soja additionnées de 5% de sang de cheval (Biomérieux) et incubées pendant 24h à 37°C sous CO<sub>2</sub>.

Les résultats de nos 74 souches ont été comparés avec ceux de 186 souches de streptocoque du groupe B préalablement étudiées et provenant de diverses origines. Elles comprenaient 59 souches néonatales provenant de liquide céphalo-rachidien (NL), 5 souches néonatales provenant de liquide gastrique (NG), 71 souches de portage vaginal (V), 17 souches provenant d'hémocultures d'adultes atteints d'endocardite aiguë (AH) et 34 souches provenant de bovins (B) (Annexe 3).

### **4.2. Extraction de l'ADN chromosomique**

Deux ml de tampon de lyse (NaCl 1M, Tris HCl 10 mM, EDTA 5mM, pH 8, Triston X100 au 1/200) ont été déposés sur les cultures, le mélange a ensuite été homogénéisé avec un râteau et 700 µl du lysat ont été récupérés dans des tubes Ependorf. Ont ensuite été ajoutés, 20 µl de protéinase K (5mg / 100ml) et 20 µl de lysozyme (100mg / ml) préparé extemporanément dans du TE 1X (1,2 g de Trisma à 10 mM, 0.37 g d'EDTA à 1mM). Le mélange a été vortexé puis mis au bain marie à sec à 37°C pendant une heure puis à 60°C pendant une heure.

Dans chaque tube, sous une hotte, 740 µl de mélange phénol/chloroforme/acide isoamylique, préalablement décanté, ont été ajoutés, puis

les tubes ont été vortexés et centrifugés pendant 15 minutes à 15 000 g à 4°C. Toujours sous hotte, la phase supérieure (environ 500 µl) a été récupérée dans de nouveaux tubes et 500 µl du mélange phénol/chloroforme/acide isoamylique ont à nouveau été rajoutés. Les tubes ont été vortexés et centrifugés pendant 15 minutes à 15 000 g à 4°C et la phase supérieure (environ 500 µl) a été récupérée.

Un ml d'éthanol absolu et 50 µl de NaCl à 1 molaire ont été ajoutés et le mélange a été vortexé puis mis au congélateur à – 80 °C pendant 10 minutes avant d'être centrifugé pendant 15 minutes à 15 000 g à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot mis à sécher pendant 12 h. L'ADN a enfin été remis en suspension dans 100 µl de TE 1X puis conservé à 4 °C.

La quantité d'ADN a ensuite été mesurée par spectrophotométrie (Nanodrop®) puis l'ADN a été dilué avec de l'eau ultra pure afin d'obtenir une concentration finale d'ADN de 10 micromoles/litre. Les résultats des mesures et des calculs pour les 42 souches que j'ai techniqué sont présentés en annexe (Annexe 1).

### **4.3. Sérotypage moléculaire**

#### **4.3.1. Principe**

Le sérotypage moléculaire a été réalisé par PCR multiplex selon la méthode décrite par Imperi et al. (28)

Il s'agit d'une technique de PCR multiplex ciblant différents gènes impliqués dans la synthèse du polysaccharide capsulaire.

Les 19 amorces utilisées ciblent différents gènes de la région *CPS* (tableau 2). Les amorces *cpsL-F* et *cpsL-R* ciblent une partie d'un gène conservé chez streptocoque du groupe B (*cpsL*) : les amplicons sont identiques pour tous les sérotypes et servent de contrôle interne à la réaction. Les autres amorces ciblent des régions variables. Les amplicons ont été identifiés après migration en gel d'agarose.

Les résultats précédemment obtenus au laboratoire ont montré qu'il existait un phénomène d'amplification préférentielle pour les amorces *cpsG*. La technique a donc été modifiée et rédigée en deux protocoles : le protocole 1 sans les amorces *cpsG* et le protocole 2 avec uniquement les amorces *cpsG*. Le protocole 1 permet d'identifier les types capsulaires Ib, V, VI, VII et IX, le protocole 2 permet d'identifier les types capsulaires Ia et III.

#### 4.3.2. PCR d'amplification

Pour un volume final de 25 µl, le mélange réactionnel était composé de 5 µL d'ADN à 5 nM, 5 µL de dNTP à 1 mM, 2 µL de magnésium à 25 mM et 2,5 µL de tampon de PCR 10X. Au mélange, ont été ajouté, pour le protocole 1, 0,4 µL d'amorces pour les amorces 1 et 16 et 0,25 µL d'amorces pour les amorces 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19 (Tableau 1) et pour le protocole 2, 0,25 µL d'amorces pour les amorces 6, 7, 8 (Tableau 1).

Tableau 2 : Amorces pour le sérotypage d'après Imperi et al. (28)

	Nom amorces	séquence 5' → 3'
1	<i>cpsI</i> -Ia-6-7-F	GAATTGATAACTTTTGTGGATTGCGATGA
2	<i>cpsI</i> -6-R	CAATTCTGTCCGACTATCCTGATG
3	<i>cpsI</i> -7-R	TGTCGCTTCCACACTGAGTGTTGA
4	<i>cpsL</i> -F	CAATCCTAAGTATTTTCGGTTCATT
5	<i>cpsL</i> -R	TAGGAACATGTTTATTAACATAGC
6	<i>cpsG</i> -F	ACATGAACAGCAGTTCAACCGT
7	<i>CpsG</i> -R	ATGCTCTCCAAACTGTTCTTGT
8	<i>CpsG</i> -2-3-6-R	TCCATCTACATCTTCAATCCAAGC
9	<i>CpsN</i> -5-F	ATGCAACCAAGTGATTATCATGTA
10	<i>CpsN</i> -5-R	CTCTTCACTCTTTAGTGTAGGTAT
11	<i>CpsJ</i> -8-F	TATTTGGGAGGTAATCAAGAGACA
12	<i>CpsJ</i> -8-R	GTTTGGAGCATTCAAGATAACTCT
13	<i>cpsJ</i> -2-4-F	CATTTATTGATTCAGACGATTACATTGA
14	<i>cpsJ</i> -2-R	CCTCTTTCTCTAAAATATTCCAACC
15	<i>cpsJ</i> -4-R	CCTCAGGATATTTACGAATTCTGTA
16	<i>cpsI</i> -7-9-F	CTGTAATTGGAGGAATGTGGATCG
17	<i>cpsI</i> -9-R	AATCATCTTCATAATTTATCTCCCATT
18	<i>cpsJ</i> -Ib-F	GCAATTCTTAACAGAATATTCAGTTG
19	<i>cpsJ</i> -Ib-R	GCGTTTCTTTATCACATACTCTTG

Après une étape de dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, 15 cycles ont été réalisés avec les étapes suivantes : dénaturation à 95°C pendant 60 secondes, hybridation à 54°C pendant 60 secondes, élongation à 72°C pendant 2 minutes. Puis 25 nouveaux cycles sont réalisés avec ce schéma : dénaturation à 95°C pendant 60 secondes, hybridation à 56°C pendant 60 secondes, élongation à 72°C pendant 2 minutes. Une étape d'élongation finale à 72°C de 10 minutes termine la PCR. (Annexe 1).

### 4.3.3. Révélation par électrophorèse

La révélation des amplicons a été réalisée par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% en tampon TBE1X auquel a été ajouté du Bromure d'éthidium ou de Gel Red (SYBR SAFE DNA Gel Stain – Fischer Scientific). Le gel a été mis à migrer dans du tampon TBE1X pendant 2h à 120 Volt. Les résultats ont été lus par transillumination et mettent en évidence des bandes de différente taille en fonction du sérotype (Tableau 3).

Tableau 3 : Taille des fragments attendus en fonction du sérotype **(28)**

la	lb	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
688 bp (cpsL)	688 bp (cpsL) 621 bp (cpsJ)	688 bp (cpsL)							
					582 bp (cpsN)				
		465 bp (cpsJ)		538 bp (cpsJ)		470 bp (cpsI)			
			352 bp (cpsG)			352 bp (cpsG)		438 bp (cpsJ)	
272 bp (cpsG)	272 bp (cpsG)	272 bp (cpsG)		272 bp (cpsG)	272 bp (cpsG)		272 bp (cpsG)		272 bp (cpsG)
							179 bp (cpsI)		229 bp (cpsI)

## 4.4. MultiLocus Sequence Typing

### 4.4.1. Principe de la méthode utilisée

Sept gènes de ménage (Tableau 4) ont été amplifiés par PCR puis séquencés. La combinaison d'allèles de ces sept loci constitue un profil allélique ou Sequence Type (ST) (33).

Tableau 4 : Gènes de ménage pour la technique MLST d'après Nicola Jones (33)

Locus	Fonction du gène	Taille du fragment séquencé (bp)	% G + C	Position dans le génome du SGB (bp)
adhP	Alcohol dehydrogenase	498	43.1	72286
pheS	Phenylalanyl tRNA synthetase	501	37.1	912817
atr	Amino acid transporter	501	36.9	560085
glnA	Glutamine synthetase	498	35.7	1868862
sdhA	Serine dehydratase	519	41.4	2179923
glcK	Glucose kinase	459	42.6	538770
tkt	Transketolase	480	38.9	287111

### 4.4.2. PCR d'amplification

Pour un volume final de 50 µl, le mélange réactionnel était composé de 10 µl d'ADN à 5 nM, 2,5 µl d'amorces R et F à 10 µM (Tableau 5), 0,4 µl de polymérase 5 U/µl (Ampli Taq DNA Polymerase - Applied), 5 µl de tampon de PCR 10X, 3 µl de magnésium à 25 mM.

Après une étape de dénaturation à 94°C pendant 1 minute et 30 secondes, 30 cycles ont été réalisés avec les étapes suivantes : dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, hybridation à 50°C pendant 30 secondes, élongation à 72°C pendant une minute. Une étape d'élongation finale à 72°C de 4 minutes termine la PCR (Annexe 1).

Tableau 5 : Amorces pour la technique MLST (Eurogentec®)

Amorces Nucléotidiques pour MLST			
Locus	Nom et séquence de l'amorce		Taille de l'amplicon (bp)
	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	
adhP	GTT GGT CAT GGT GAA GCA	ACT GTA CCT CCA GCA CGA AC	672
pheS	GAT TAA GGA GTA GTG GCA CA	TTG AGA TCG CCC ATT GAA AT	723
atr	CGA TTC TCT CAG CTT TGT TA	AAG AAA TCT CTT GTG CGG AT	627
glnA	CCG GCT ACA GAT GAA CAA TT	CTG ATA ATT GCC ATT CCA CG	589
sdhA	AGA GCA AGC TAA TAG CCA AC	ATA TCA GCA GCA ACA AGT GC	646
glcK	CTC GGA GGA ACG ACC ATT AA	CTT GTA ACA GTA TCA CCG TT	607
tkl	CCA GGC TTT GAT TTA GTT GA	AAT AGC TTG TTG GCT TGA AA	859

#### 4.4.3. Révélation par électrophorèse et purification des amplicons

La vérification de l'amplification des allèles a été effectuée grâce à une migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1% additionné de Bromure d'éthidium ou de Gel Red (SYBR SAFE DNA Gel Stain – Fischer Scientific) pendant une heure dans un tampon TBE 1X (Tris-Borate 89 mM, EDTA 2,5 mM). Les fragments amplifiés ont ensuite été visualisés par transillumination UV. Les fragments obtenus ont des tailles allant de 589 à 859 paires de bases en fonction des gènes (Figure 6).

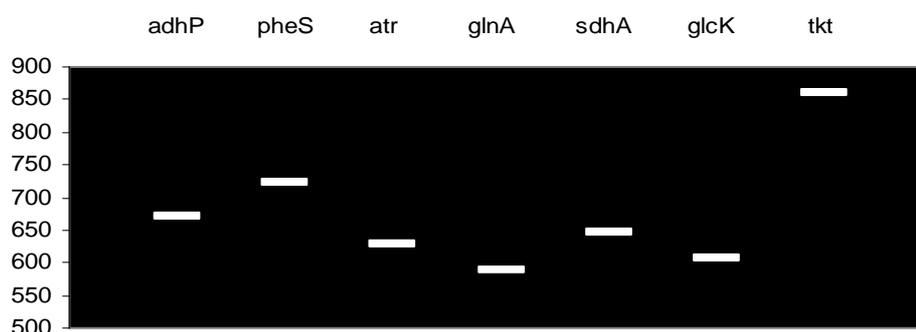


Figure 6 : Schéma représentant les bandes électrophorétiques des sept gènes de ménage

La purification est réalisée sur micro-colonnes (Amicon ultra 0,5 30kDa – Millipore). 460 µl d'eau ultra pure auxquels sont rajoutés 40 µl d'ADN amplifié sont déposés dans les filtres des micro-colonnes et centrifugés à 14.000 G pendant 15 min. Les filtres sont ensuite retournés sur des colonnes neuves et centrifugés à 1.000 G pendant 2 min. L'ADN ainsi récupéré est conservé au congélateur à – 20 °C.

#### **4.4.4. Réaction de séquençage**

Pour un volume final de 10 µl, le mélange était composé de 1 µl de Big Dye Terminator (ABI Prism Big Dye Terminator V 3.1 – Life Technologies), 2µl de tampon fourni avec le coffret, 1 µl d'amorces R ou F à 5 micromolaires. Les amorces utilisées sont les mêmes que pour la PCR d'amplification. Pour l'eau et ADN : les volumes dépendent de l'intensité des bandes au moment de la révélation.

Après une étape de dénaturation à 94°C pendant 1minute et 30 secondes, 30 cycles sont réalisés avec les étapes suivantes : dénaturation à 96°C pendant 10 secondes, hybridation à 50°C pendant 10 secondes, élongation à 60°C pendant 4 minutes (Annexe 1).

#### **4.4.5. Purification des produits de séquençage**

La purification des produits de séquençage a été réalisée sur résine Sephadex (Sephadex G50 superfine – VWR International) selon le protocole suivant :

La résine a été déposée dans des micropuits (Plaque Filter Multiscreen – Millipore), 300 µl d'eau stérile ont ensuite été distribués dans chaque puit. La plaque est ensuite conservée à température ambiante pendant deux heures, le temps que la résine gonfle. La plaque est ensuite centrifugée à 2500 g pendant 5 min et les ADN peuvent être déposés dans les puits. La plaque est remise à centrifuger à 2500 g pendant 5 min. Enfin, les ADN sont récupérés et déposés sur des microplaques (Micro Amp 96 well Reaction Plaque – Life Technologies) et additionnés d'eau stérile de façon à ce que le volume final dans les puits soit supérieur à 10 µl.

#### 4.4.6. Séquençage et analyse des séquences

Les plaques ont été déposées dans le séquenceur (Genetic Analyzer 3130xl – Applied Biosystems), puis analysées. Les résultats sont analysés avec le logiciel Sequence Scanner puis les séquences sont ensuite comparées avec la base de données PubMLST et analysées avec les logiciels eBURST, MEGA et START.

##### 4.4.6.1. Lecture des séquences

Les séquences nucléotidiques ont été lues avec le logiciel Sequence Scanner (Applied Biosystems ®) qui est un logiciel d'analyse de séquence permettant d'importer, de visualiser, d'éditer et d'exporter des données de séquence.

Les nucléotides lus avec certitude sont représentés en bleu, alors que ceux avec un doute sont représentés en jaune ou rouge (Figure 7). La séquence peut ensuite être comparée à la base de données PubMLST.

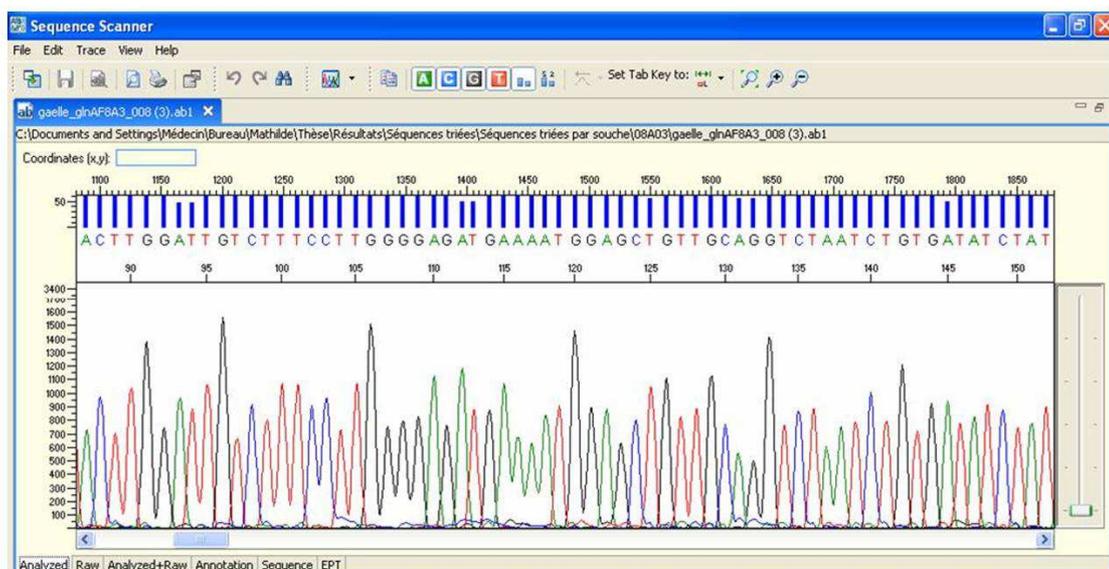


Figure 7 : Capture d'écran de l'onglet « Analyzed » du logiciel Sequence Scanner.

#### **4.4.6.2. Détermination des allèles et profils**

La détermination des allèles et des profils a été réalisée sur le site PubMLST (<http://pubmlst.org/sagalactiae>) qui héberge les bases de données MLST et des outils d'analyse accessibles au public permettant, entre autre, de déterminer les allèles et les STs d'après les séquences d'ADN.

Pour la détermination des allèles, le résultat de la recherche donne le numéro de l'allèle de la base de données possédant la séquence la plus proche de celle analysée, ainsi que les différences entre les deux (mismatches et gaps), s'il y en a.

Une fois tous les allèles déterminés pour une souche, on peut soumettre le profil. Le résultat de la recherche donne le numéro du Sequence Type de la base de données avec le plus de correspondance avec le profil analysé.

#### **4.4.6.3. Détermination des complexes clonaux**

Pour la détermination des complexes clonaux, nous avons utilisé le logiciel eBURST v3 (<http://eburst.mlst.net/>) qui est une application permettant d'émettre une hypothèse sur la façon dont chaque complexe clonal a pu émerger et se diversifier. L'algorithme identifie des groupes de STs et essaye d'identifier le génotype fondateur de chaque groupe.

Un groupe est composé de STs ayant un niveau de similitude dans leur profil allélique et pouvant partager un même « fondateur ». Un groupe est considéré comme un complexe clonal si tous les membres possèdent des allèles identiques pour 6 des 7 loci avec au moins un autre membre du groupe. Le principal fondateur d'un groupe est défini comme le ST qui possède 6 loci sur 7 identiques avec le plus grand nombre d'autres STs. Dans de nombreux cas, le fondateur primaire est aussi le ST le plus répandu au sein du groupe.

Les résultats de l'analyse comprennent, le nombre total de groupes ou complexes clonaux, pour chaque groupe : le nombre d'isolats et de ST dans le groupe et le fondateur principal ainsi que la liste de tous les STs du groupe, avec le nombre d'isolats pour chaque ST, le nombre de descendants directs (SLV) et indirects (DLV et TLV). La distance moyenne entre ST d'un même groupe est également représentée. Les ST qui partagent moins de six allèles avec les autres STs sont indiqués comme ST uniques ou singletons.

Dans le diagramme (Figure 8), chaque groupe est représenté avec le fondateur principal en bleu et les STs fondateurs de sous-groupe en jaune. La surface du cercle est proportionnelle à la prévalence du ST dans la population étudiée. Tous les descendants des fondateurs sont représentés disposés en cercle. Tous les STs reliés entre eux possèdent les mêmes allèles pour six des sept loci avec au moins un autre isolat dans le groupe et sont donc considérés comme appartenant au même complexe clonal. La population entière peut être représentée sur un diagramme unique, appelé « Instantané de la population ».

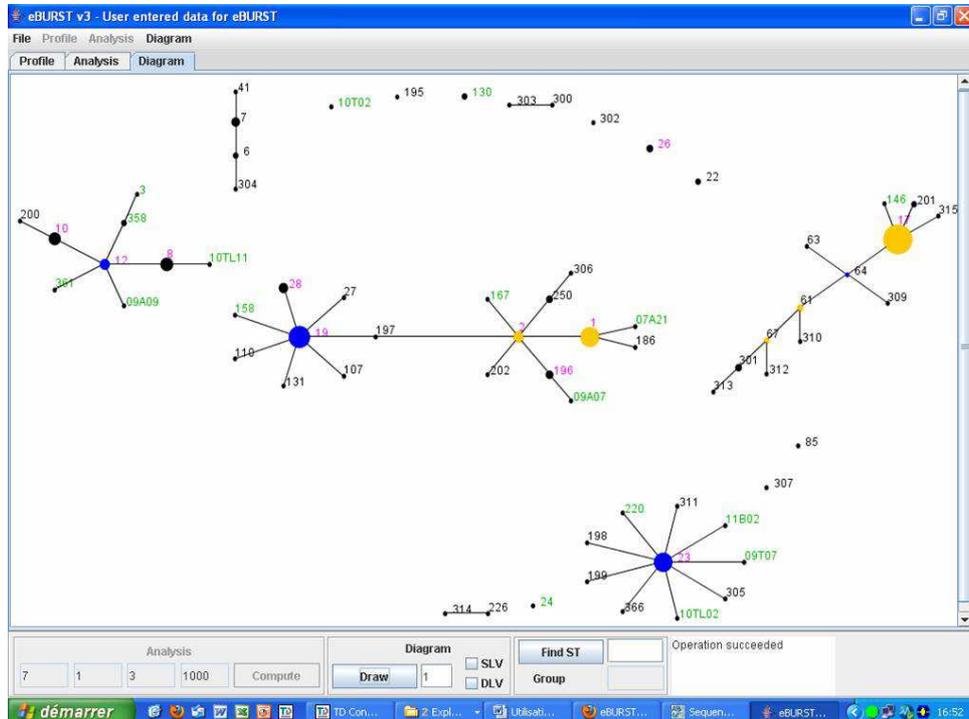


Figure 8 : Capture d'écran de la fenêtre « Diagram » du logiciel eBURST représentant un aperçu de la population analysée.

#### 4.4.6.4. Réalisation des arbres phylogénétiques

Les arbres phylogénétiques ont pour but de comprendre les relations de parenté. Ils ont été réalisés avec les logiciels MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 5) et START (Sequence Type Analysis and Recombinational Tests), avec les méthodes UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) ou Neighbour Joining (Neighbor Joining – NJ) qui sont des méthodes dites de distance, c'est-à-dire basées sur les similarités entre paires de séquences.

##### 4.4.6.4.1. Méthode utilisant les séquences nucléotides

MEGA est un logiciel qui permet la réalisation d'arbres phylogénétiques. Le format des données à charger est un supergène obtenu par concatémérisation des sept gènes de ménage dans un ordre bien précis (*adhP* – *pheS* – *atr* – *glnA* – *sdhA* – *glcK* - *tkt*), mis au format adéquat pour être analysé avec le logiciel. Une fois les données mises en forme et chargées, les arbres phylogénétiques réalisés peuvent être visualisés et modifiés (Figure 9).

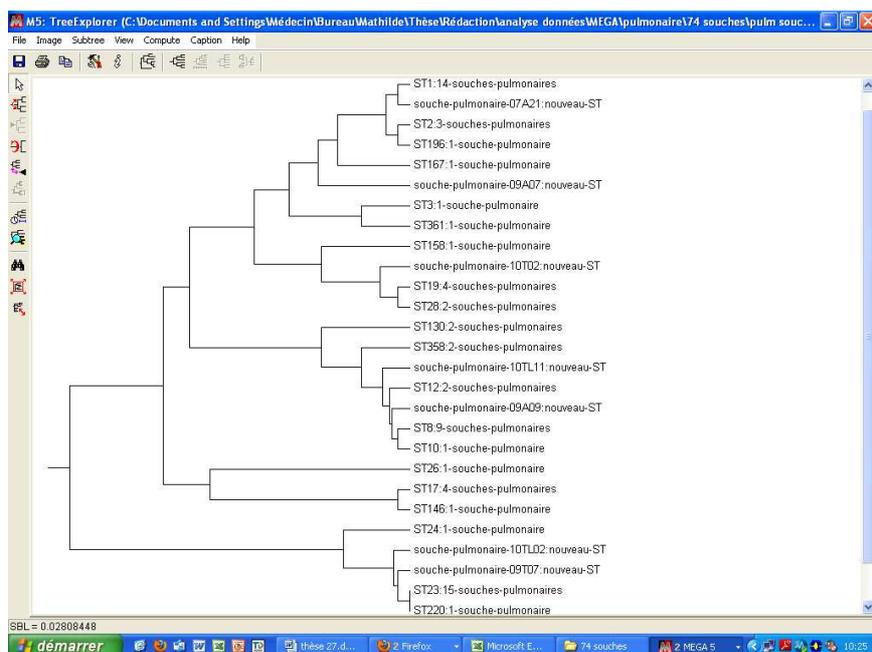


Figure 9 : Capture d'écran de la fenêtre de visualisation des arbres phylogénétiques du logiciel MEGA

#### 4.4.6.4.2. Méthode utilisant les profils alléliques

Le logiciel START est une application que l'on trouve sur le site PubMLST (<http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>), permettant la réalisation d'arbres phylogénétiques. Dans un premier temps, il faut saisir le schéma MLST pour le streptocoque du groupe B en rentrant la description des loci utilisés et l'emplacement des fichiers d'allèles et de profils enregistrés dans les formats adéquats. Puis dans un deuxième temps, il faut charger les données concernant les profils, les séquences alléliques et enfin les données à analyser. Puis on choisit, pour la réalisation des arbres, la méthode UPGMA ou NJ ainsi que l'utilisation soit des profils soit d'un supergène issu de la concatémérisation des allèles (Figure 10).

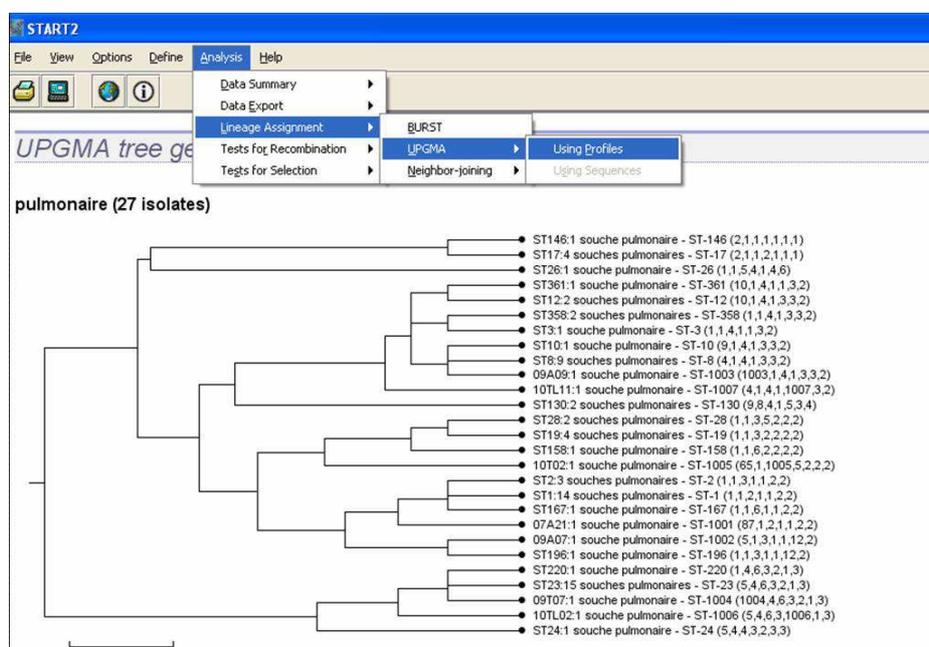


Figure 10 : Captures d'écran de la fenêtre de visualisation de l'arbre phylogénétique

## 5. Résultats

Dans un souci d'exhaustivité, pour inclure l'ensemble des données sur les souches de streptocoque du groupe B d'origine pulmonaire, les résultats présentés ci-après intègrent également des résultats de manipulations réalisées par d'autres opérateurs.

Par ailleurs, la totalité des résultats concernant les sérotypes, Sequence Types et Complexes Clonaux est présentée dans l'annexe 2.

### 5.1. Sérotypes moléculaires des souches d'origine pulmonaire

Les images obtenues après électrophorèse et révélation par trans-illumination montrent des fragments de taille variable, allant de 179 à 688 paires de bases en fonction des sérotypes (Figure 11).

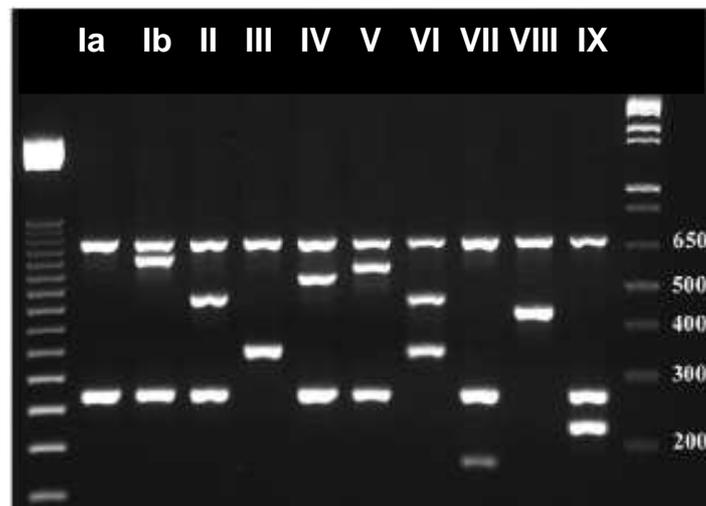


Figure 11 : Electrophorèse pour le sérotypage d'après Imperi et al (28) représentant tous les sérotypes (Ia, Ib, II à IX)

En fonction des fragments obtenus, nous avons pu déterminer les sérotypes de 73 des 74 souches testées. Une seule souche est non typable avec la méthode de typage moléculaire utilisée. Parmi les souches d'origine pulmonaire, les sérotypes les plus représentés sont les sérotypes Ia (21 souches soit 28,4%), V (20 souches soit 27,0%), Ib (13 souches soit 17,6%) et représentent 73% des souches analysées. Les sérotypes II et III représentent chacun près de 10% des souches. Les sérotypes IV et VIII sont présents dans moins de 3% des souches et les sérotypes VI, VIII et IX n'ont pas été retrouvés (Tableau 6 et figure 12).

Tableau 6 : Résultats des sérotypes des souches d'origine pulmonaire

Sérotypes	nb	%
Ia	21	28,4
Ib	13	17,6
II	8	10,8
III	8	10,8
IV	2	2,7
V	20	27,0
VII	1	1,4
NT	1	1,4

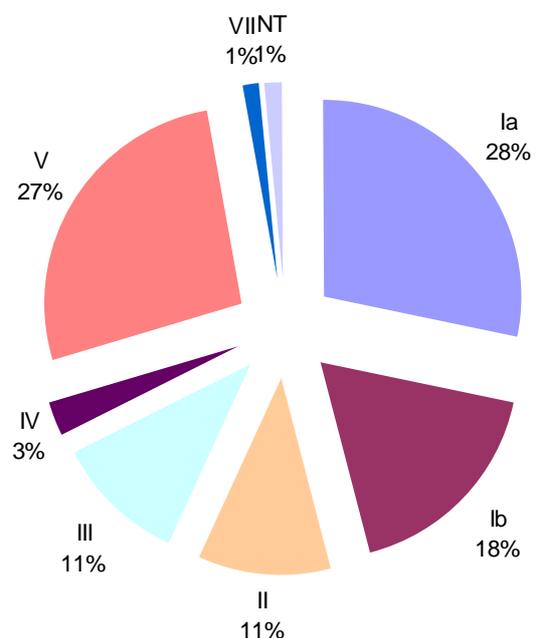


Figure 12 : Répartition des sérotypes des souches d'origine pulmonaire

## 5.2. Polymorphisme allélique des sept loci

L'analyse des séquences a permis de mettre en évidence, pour les souches d'origine pulmonaire, 12 allèles différents pour le gène *adhP*, 5 pour les gènes *pheS* et *glnA*, 11 pour le gène *atr*, 13 pour le gène *sdhA*, et 8 pour les gènes *glcK* et *tkl* (Tableau 7).

Tableau 7 : Polymorphisme allélique des sept gènes de ménage pour toutes les souches analysées

Souches de diverses origines

allèles	position sur 498 pb													nb de souches
	57	111	150	211	213	221	230	244	255	384	396	464	63	
1	C	G	A	A	T	C	C	G	C	A	A	G	63	
2	C	G	G	A	C	C	C	G	T	A	A	G	59	
4	C	A	G	A	T	C	T	G	T	A	A	G	2	
5	C	G	G	G	C	C	C	G	T	A	A	G	15	
adhP	9	C	A	G	A	T	C	C	G	T	A	G	14	
10	C	A	G	A	T	C	C	G	T	G	A	G	11	
13	C	G	G	A	T	C	C	G	C	A	A	G	18	
15	C	G	A	A	T	T	C	G	C	A	A	G	1	
16	T	G	G	A	T	C	C	G	T	A	A	G	2	
40	C	G	A	A	T	C	C	G	C	A	A	T	1	
56	C	A	G	A	T	C	C	A	C	A	A	G	3	

allèles	position sur 501 pb							nb de souches
	201	231	294	336	341	393	168	
1	G	C	C	G	A	A	168	
3	G	T	T	C	A	A	2	
4	G	T	T	G	G	C	15	
7	T	T	T	G	G	C	1	
23	G	T	C	G	A	A	3	

allèles	position sur 501 pb													nb de souches		
	33	96	116	132	153	267	276	292	300	340	341	351	366		378	397
1	G	G	C	G	G	A	G	A	C	G	C	A	A	G	C	74
2	A	G	C	G	G	G	G	T	A	C	T	A	A	A	C	23
3	A	G	C	G	G	T	A	T	A	C	T	A	A	C	50	
4	G	G	C	G	G	A	G	A	C	G	C	T	A	A	C	17
5	G	G	C	A	A	G	A	C	G	C	T	A	G	C	5	
6	G	G	C	G	G	A	G	A	C	G	C	T	G	A	C	17
12	A	G	C	G	G	G	G	T	A	C	T	A	A	C	1	
17	G	A	C	G	G	A	G	A	C	G	C	A	A	G	C	1
25	G	G	C	G	G	A	G	A	C	G	C	A	A	G	T	2
34	G	G	T	G	G	A	G	A	C	G	C	T	G	A	C	1
35	G	G	T	G	G	A	G	A	C	G	T	G	A	C	1	

Souches pulmonaires

allèle	position sur 498 pb													nb de souches
	19	23	111	150	211	213	230	255	268	328	384	396	31	
1	C	A	G	A	A	T	C	C	T	C	A	A	31	
2	C	A	G	G	A	C	C	T	T	C	A	A	5	
4	C	A	G	A	T	T	T	T	C	A	A	10		
5	C	A	G	G	C	C	T	T	C	A	A	18		
9	C	A	A	G	A	T	C	T	T	C	A	3		
10	C	A	A	G	A	T	C	T	T	C	G	3		
65	C	A	G	A	A	T	C	C	T	T	A	1		
87	C	A	G	A	A	T	C	C	C	C	A	1		
9A9	C	G	A	G	A	T	C	T	T	C	A	1		
9T7	T	A	G	G	C	C	T	T	C	A	A	1		

allèle	position sur 501 pb							nb de souches
	231	294	309	341	393	53	19	
1	C	C	T	A	A	53	19	
4	T	T	T	G	C	19	2	
8	T	T	C	A	A	2	2	

allèle	position sur 501 pb													nb de souches
	33	132	153	174	267	276	300	340	351	366	378	31		
1	G	G	C	A	G	C	G	A	A	G	5	15		
2	A	G	C	G	T	A	T	A	A	A	11	21		
3	A	G	C	G	T	A	T	A	A	A	11	20		
4	G	G	C	A	G	C	G	T	A	A	1	20		
5	G	A	A	C	A	G	C	G	T	G	A	1		
6	G	G	C	A	G	C	G	T	A	A	1	1		
10T02	A	G	G	T	G	T	A	T	A	A	1	1		

## Souches pulmonaires

allèle	position sur 498 pb				nb de souches
	36	165	387	429	
1	C	G	A	T	42
2	C	G	A	C	9
3	T	G	G	C	19
4	C	G	A	C	1
5	C	T	A	C	3

glnA

## Souches de diverses origines

allèles	position sur 498 pb								nb de souches	
	36	44	73	165	167	270	387	429		
1	C	G	C	G	G	T	A	T	T	53
2	C	G	C	G	G	T	A	C	T	96
3	T	G	C	G	G	T	G	C	C	16
4	C	G	C	G	G	T	A	C	C	4
5	C	G	C	T	G	T	A	C	T	4
13	C	G	C	G	G	C	A	T	T	10
15	C	G	C	G	G	C	A	T	T	1
32	C	G	C	G	G	T	G	C	C	1
33	C	G	T	G	A	T	A	C	T	1
35	T	T	C	G	G	T	G	C	C	1
37	C	G	T	G	G	T	A	C	T	2

glnA

allèle	position sur 519 pb								nb de souches			
	32	51	57	60	87	91	111	121				
1	G	C	G	T	G	C	T	G	A	T	G	29
2	G	T	A	C	A	C	T	G	A	T	G	26
3	G	C	A	T	A	T	C	G	G	C	G	15
5	G	C	A	T	C	A	G	C	G	C	G	2
10TL02	G	T	A	C	A	C	T	G	A	T	G	1
10TL11	T	C	A	T	A	T	C	G	G	C	G	1

sdhA

allèle	position sur 459 pb								nb de souches
	96	112	128	180	282	410	432	435	
1	T	G	C	G	T	C	C	T	23
2	T	G	C	A	C	C	C	C	27
3	G	G	C	A	C	T	C	T	21
4	T	T	C	A	C	C	T	T	1
12	T	G	T	A	C	C	C	C	2

glnK

allèles	position sur 519 pb										nb de souches		
	51	57	60	87	91	111	192	222	285	337			
1	C	G	T	G	C	T	C	A	T	A	T	G	99
2	T	A	C	A	C	T	C	A	T	G	C	G	52
3	C	A	T	A	T	C	C	G	C	G	C	G	30
9	T	A	C	A	C	T	C	A	T	A	C	G	2
12	C	G	T	G	C	T	C	A	T	A	C	G	4
31	C	G	T	G	C	T	T	A	T	A	T	G	1
35	T	A	C	A	C	T	C	A	T	G	C	G	1

sdhA

allèles	position sur 459 pb										nb de souches	
	9	48	96	112	128	180	282	363	403	410		
1	T	G	T	G	C	G	T	A	G	C	C	85
2	T	G	T	G	C	A	C	A	G	C	C	70
3	T	G	G	G	C	A	C	A	G	T	C	18
4	T	G	T	T	C	A	C	A	G	C	T	2
9	T	G	T	G	C	A	C	A	G	C	C	6
10	T	G	T	G	C	G	T	A	A	C	C	1
12	T	G	T	G	T	A	C	A	G	C	C	3
28	C	A	T	G	C	A	C	A	G	C	C	4

glnK

allèle	position sur 480 pb						nb de souches
	69	99	179	240	325	359	
1	G	G	C	C	G	C	5
2	A	A	C	C	G	A	47
3	G	G	C	C	G	T	19
4	A	A	C	C	G	C	2
6	G	A	A	T	A	C	1

glnK

allèles	position sur 480 pb								nb de souches
	69	99	179	240	320	325	359	362	
1	G	G	C	C	G	G	C	C	71
2	A	A	C	C	G	G	T	C	88
3	G	G	C	C	G	G	T	C	14
4	A	A	C	C	G	G	C	C	3
5	A	A	C	C	G	G	C	A	10
6	G	A	A	T	G	A	C	A	2
9	A	A	C	C	T	G	C	A	1

Les pourcentages de variation ont été calculés à partir du nombre de mutations et de la taille des gènes. Ils renseignent sur le polymorphisme de chaque gène pour les souches pulmonaires et peuvent être comparés avec ceux des souches d'autres origines. Pour les souches d'origine pulmonaire (Tableau 8a), les gènes avec le plus de variation nucléotidique sont *sdhA*, *adhP* et *atr* et ceux avec le moins de variation sont *pheS* et *glnA*. Si on compare avec les autres souches (Tableau 8b), les gènes présentant le plus de variation sont, comme pour les souches d'origine pulmonaire, *atr*, *sdhA*, et *adhP* auxquels s'ajoute le gène *glcK*. Les gènes avec le moins de variation sont *pheS* et *tkl*. Le gène *glnA*, quant à lui, ne fait pas partie des gènes avec le moins de variation parmi les autres souches.

Souches d'origine pulmonaire (a)

Gène	Taille	Nombre de mutation	Pourcentage de variation
<i>adhP</i>	498 pb	12	2,4
<i>pheS</i>	501 pb	5	1,0
<i>atr</i>	501 pb	11	2,2
<i>glnA</i>	498 pb	5	1,0
<i>sdhA</i>	519 pb	13	2,5
<i>glcK</i>	459 pb	8	1,7
<i>tkl</i>	480 pb	8	1,7

Souches de diverses origines (b)

Gène	Taille	Nombre de mutation	Pourcentage de variation
<i>adhP</i>	498 pb	12	2,4
<i>pheS</i>	501 pb	6	1,2
<i>atr</i>	501 pb	15	3,0
<i>glnA</i>	498 pb	10	2,0
<i>sdhA</i>	519 pb	13	2,5
<i>glcK</i>	459 pb	12	2,6
<i>tkl</i>	480 pb	9	1,9

Tableaux 8a et 8b : Polymorphisme des souches d'origine pulmonaire (a) et des souches de diverses origines (b).

### 5.3. Profils alléliques ou Sequence Types des souches d'origine pulmonaire

Les séquences des sept loci MLST ont été identifiées pour 74 souches d'origine pulmonaire et les profils alléliques ont pu être assignés. Vingt STs ont été identifiés parmi les STs répertoriés dans la base de données MLST. La moitié des isolats sont regroupés dans les STs les plus fréquemment rencontrés (ST-17, ST-19, ST-23, ST-1), quelques STs rares ont été rencontrés. La majorité des STs ont été décrits précédemment, mais cinq nouveaux allèles ont été séquencés : deux pour *adhP*, un pour *atr* et deux pour *sdhA* et deux nouvelles combinaisons d'allèles ne figurant pas dans la base de données MLST ont été découvertes (Annexe 4). Les profils alléliques les plus représentés sont le ST-23 (15 souches soit 20,3%), le ST-1 (14 souches soit 18,9%) et le ST-8 (9 souches soit 12,2%) (Tableau 9, figure 13 et annexe 5).

Tableau 9 : Résultats des STs des souches d'origine pulmonaire

ST	nb	%
ST 1	14	18,9
ST 2	3	4,1
ST 8	9	12,2
ST 17	4	5,4
ST 19	4	5,4
ST 23	15	20,3
autres	25	33,8

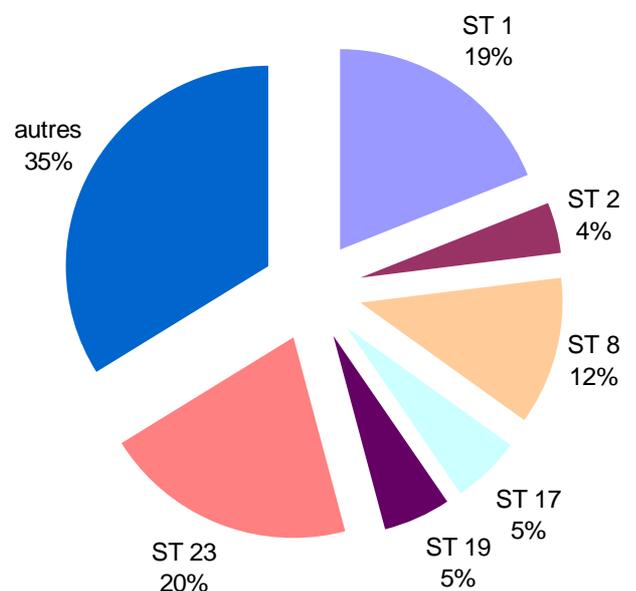


Figure 13 : Répartition des STs des souches d'origine pulmonaire

## 5.4. Complexes clonaux des souches d'origine pulmonaire

L'analyse des souches avec le logiciel eBURST a permis de regrouper les souches d'origine pulmonaire dans 4 grands complexes clonaux, CC-19, CC-17, CC-10 et CC-23 (Tableau 10 et figure 14). La majorité des streptocoques du groupe B d'origine pulmonaire analysés appartient aux complexes clonaux CC19 (28 souches soit 37,8%), CC10 et CC23 (18 souches soit 24,3%). Cinq souches seulement n'appartiennent à aucun complexe clonal (singleton).

Tableau 10 : Résultats des complexes clonaux des souches d'origine pulmonaire

CC	nb	%
CC 10	18	24,3
CC 17	5	6,8
CC 19	28	37,8
CC 23	18	24,3
singletons	5	6,8

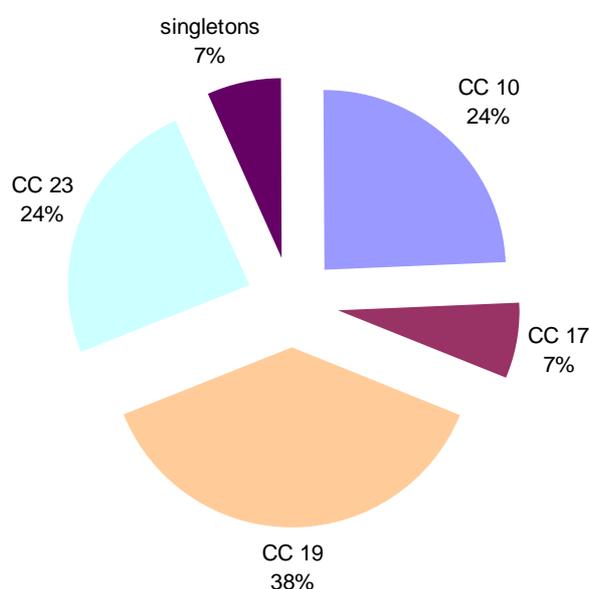


Figure 14 : Répartition des complexes clonaux des souches d'origine pulmonaire

Certains complexes clonaux sont composés majoritairement d'un ST ; c'est le cas du CC23 qui ne contient que 3 STs dont le ST-23. Les autres complexes clonaux sont représentés par un nombre plus grand de ST, même s'il existe un ST prédominant (Tableau 11).

	CC 10	CC 17	CC 19	CC 23	S
ST-1			14		
ST-2			3		
ST-3	1				
ST-8	9				
ST-10	1				
ST-12	2				
ST-17			4		
ST-19				4	
ST-22					
ST-23				15	
ST-24					1
ST-26					1
ST-28			2		
ST-130					2
ST-146		1			
ST-158			1		
ST-167			1		
ST-196			1		
ST-220				1	
ST-358	2				
ST-361	1				
nx	2		2	2	1

Tableau 11 : Répartition des Sequence Types dans les complexes clonaux.  
Les valeurs du tableau correspondent au nombre de souches.

Le plus grand complexe, le CC19, se compose de 9 STs ou singletons avec en majorité, des souches appartenant au ST-1. Les autres STs, ST-2, ST-19, ST-28, ST-158, ST-167, ST-196, sont en proportion beaucoup moins importante. Dans ce complexe clonal, on retrouve aussi deux nouveaux STs. Le complexe clonal CC10, comprend 9 STs ou singletons dont le ST-8 qui est prédominant. Les autres STs sont les ST-3, ST-10, ST-12, ST-358, ST-361 et deux nouveaux STs. Le complexe clonal CC23 comprend 4 STs ou singletons, le ST-23, très majoritaire et le ST-220 ainsi que deux nouveaux STs. Et le plus petit groupe, le CC17, comprend deux membres, les ST-17 et ST-146 (Tableau 11 et Figure 15).

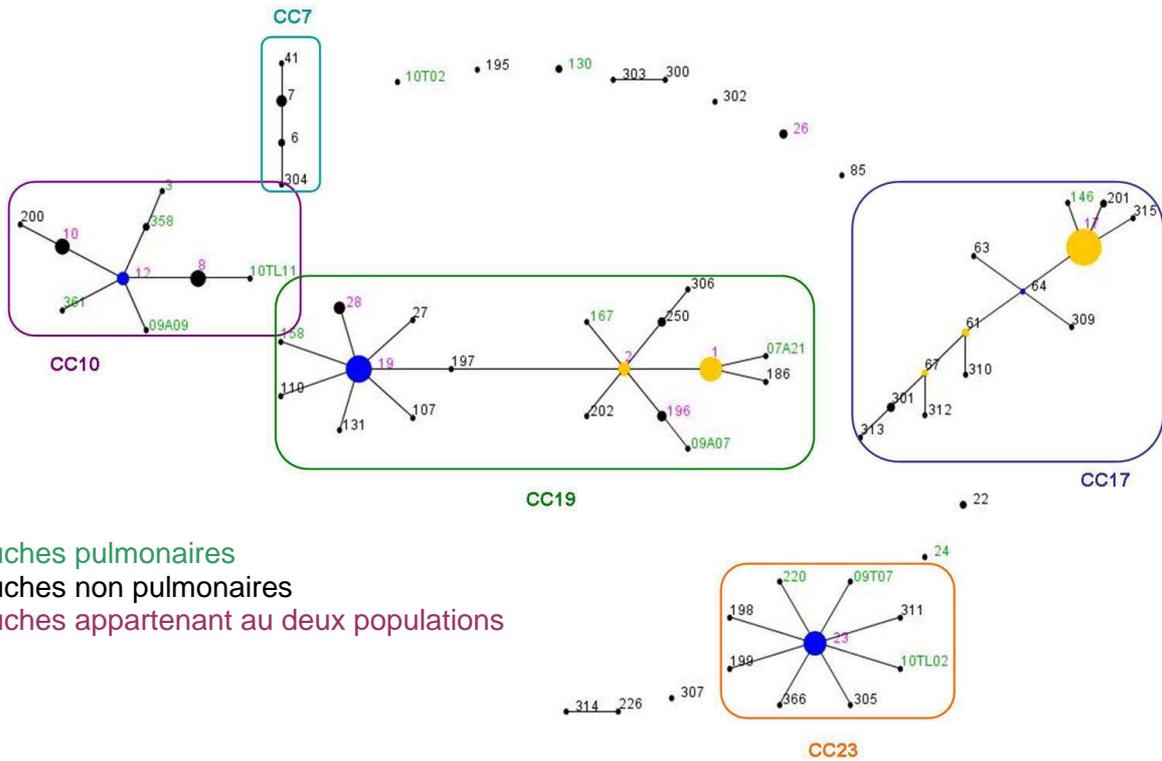


Figure 15 : Diagramme eBURST représentant les souches d'origine pulmonaire parmi les autres souches étudiées.

## 5.5. Corrélation entre Sequence Types et sérotypes des souches d'origine pulmonaire

Il existe une forte corrélation entre les STs et les sérotypes. Ainsi, toutes les souches ST-8 et ST-17 sont, respectivement, de sérotype Ib et III. La majorité des souches ST23 et ST1 appartiennent, respectivement, aux sérotypes Ia et V. En effet, 13 des 14 souches ST-1 sont de sérotype V et 14 des 15 souches ST-23 sont de sérotype Ia. Pour les autres STs, aucune prédominance ne ressort (Tableau 12).

Inversement, la répartition des STs au sein des sérotypes, montre, pour les sérotypes Ia, Ib, III et V, une prédominance nette d'un ST, respectivement les ST-23, ST-8, ST-17, ST-1.

ST	Sérotypes Ia	Ib	II	III	IV	V	VII	NT
ST-1	1					13		
ST-2	1		2					
ST-3						1		
ST-8		9						
ST-10			1					
ST-12		1	1					
ST-17				4				
ST-19				2		1		1
ST-22								
ST-23	14			1				
ST-24	1							
ST-26						1		
ST-28			2					
ST-130	1							1
ST-146				1				
ST-158						1		
ST-167						1		
ST-196					1			
ST-220	1							
ST-358		1	1					
ST-361						1		
nx	2	2	1		1	1		

Tableau 12 : Corrélation entre les Sequence Types et les sérotypes.

Les valeurs du tableau correspondent au nombre de souches.

## 5.6. Corrélacion entre sérotypes et complexes clonaux des souches d'origine pulmonaire

Assez logiquement, il existe également une forte corrélation entre les complexes clonaux et les sérotypes (Tableau 13). Ainsi, les souches appartenant au CC17 sont toutes de sérotype III et les souches du CC23 appartiennent quasiment toutes au sérotype Ia. Les complexes clonaux CC10 et CC19 sont un peu plus hétérogènes même si chacun d'eux est représenté par un sérotype majoritaire, respectivement, Ib et V.

Inversement, pour certains sérotypes capsulaires, il semble correspondre un complexe clonal majoritaire. Ainsi, la totalité des souches de sérotype Ib est limitée à un complexe clonal unique, le CC10 et la majorité des souches de sérotypes Ia et V est regroupée dans un complexe clonal, CC23 et CC17 respectivement. En revanche, les isolats de sérotype II sont répartis majoritairement entre les CC10 et CC19. Pour les sérotypes III, IV et VII, le nombre de souches est insuffisant pour déterminer une tendance.

Sérotypes	Ia	Ib	II	III	IV	V	VII	NT
Complexes clonaux								
CC10		13	3			2		
CC17				5				
CC19	2		4	2	2	17		1
CC23	17			1				
Singletons	2		1			1	1	

Tableau 13 : Corrélacion entre complexes clonaux et sérotypes.  
Les valeurs du tableau correspondent au nombre de souches.

## 5.7. Comparaison des sérotypes des souches d'origine pulmonaire avec des souches d'autres origines

Les résultats des sérotypes, STs et complexes clonaux des souches pulmonaires ont été comparés avec les résultats des souches de l'étude réalisée par le Dr Haguenoer (81).

En ce qui concerne les sérotypes (Figure 16), parmi les souches pulmonaires, les plus représentés sont les sérotypes V (28,4%), Ia (27,0%), Ib (17,6%) alors que parmi les souches néonatales, le sérotype III représente 86,4% des souches retrouvées dans le LCR des nouveaux-nés et tous les autres sérotypes sont présents dans moins de 10% des souches. Pour les souches d'hémocultures chez l'adulte, le sérotype III représente 41,2%, le sérotype Ib 23,5%, le sérotype II 11,8% et le sérotype V 5,9%. Ces résultats sont différents des souches d'origine pulmonaire, mais l'effectif n'est pas très important et la clinique est différente.

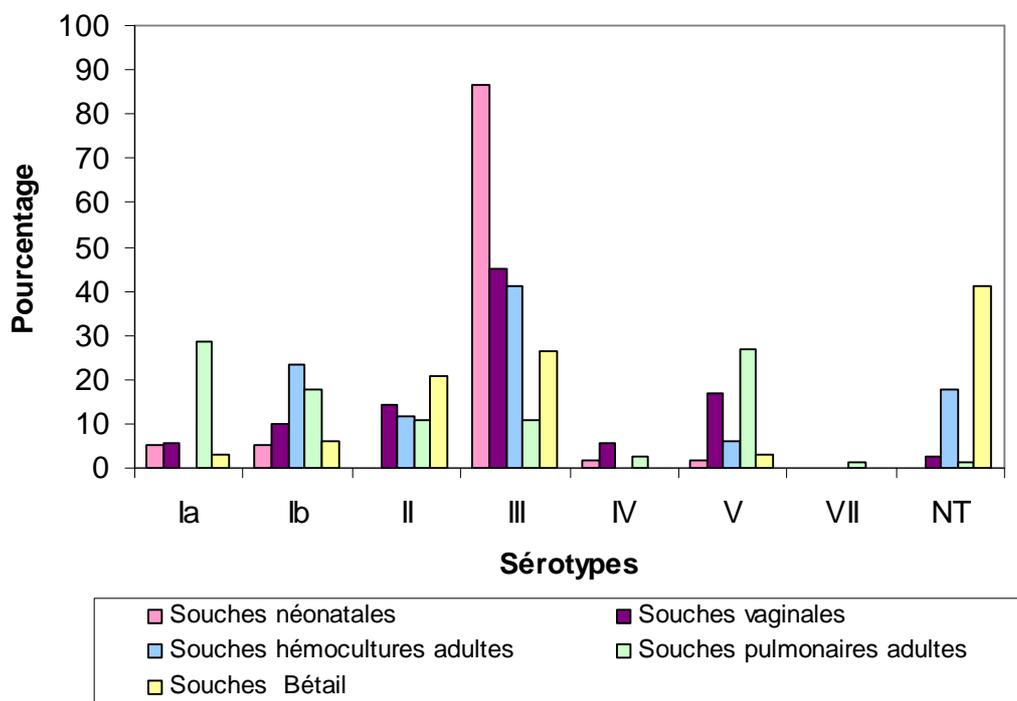


Figure 16 : Répartition des sérotypes en fonction de l'origine des souches.

## 5.8. Comparaison des Sequence Types des souches d'origine pulmonaire avec des souches d'autres origines

Des observations similaires peuvent être faites concernant les résultats du MLST (Figure 17). Les STs les plus représentés parmi les souches d'origine pulmonaire sont ST-23 (20,3%), ST-1 (18,9%) et ST-8 (12,2%). En comparaison avec les souches d'infections néonatales, les STs les plus fréquents sont les ST-17 (62,7%), et ST-19 (18,6%). Parmi les souches d'hémocultures chez l'adulte le ST-17 représente 17,6%, les ST-10 et ST-12, 11,8%, et les autres STs (1, 2, 19, 23) représentent moins de 10%.

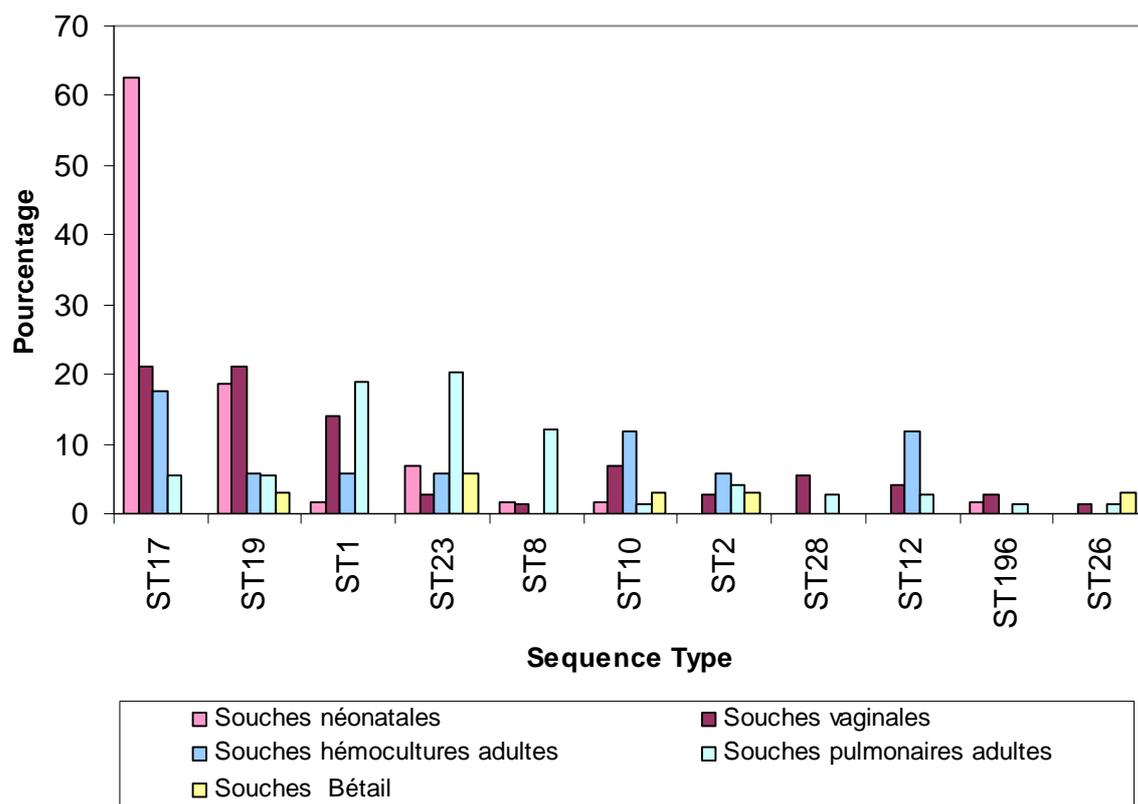


Figure 17 : Répartition des Sequence Type en fonction de l'origine des souches.

## 5.9. Comparaison des complexes clonaux des souches d'origine pulmonaire avec des souches d'autres origines

Pour les complexes clonaux (Figure 18), la majorité des streptocoques du groupe B d'origine pulmonaire analysés appartient aux complexes clonaux CC19 (37,8%), CC10 et CC23 (24,3%). Parmi les souches d'hémocultures chez l'adulte présentant une infection articulaire, on retrouve les CC10 et CC19 pour 29,4% des souches et les CC17 et CC23 dans 17,6% des cas. Chez le nouveau-né, le CC17 représente 64,4% des souches et le CC19, 18,6%.

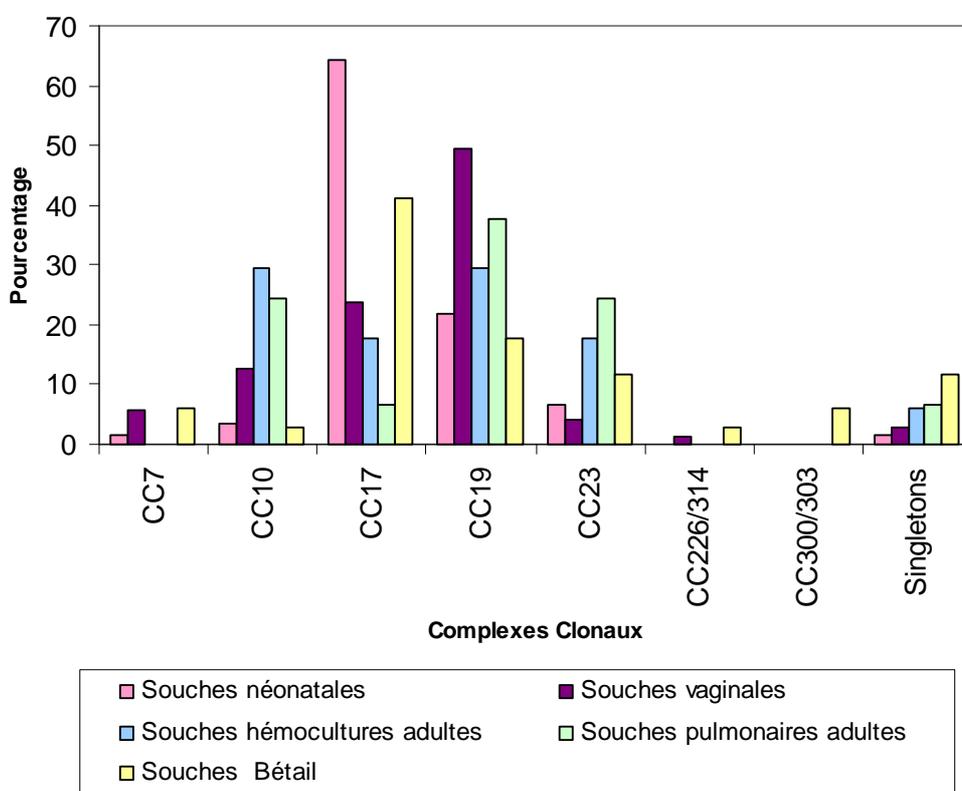


Figure 18 : Répartition des complexes clonaux en fonction de l'origine des souches.

## **5.10. Structure de la population des souches de streptocoque du groupe B d'origine pulmonaire**

Plusieurs arbres ont été réalisés, avec les logiciels MEGA et START, avec la méthode UPGMA. Par soucis de présentation, toutes les souches ne sont pas représentées. Chaque ST n'est représenté qu'une seule fois, avec le nombre de souches pour lesquelles ce ST a été retrouvé et l'origine des souches. Tous les arbres phylogénétiques sont présentés en annexe (Annexe 6).

Les deux arbres réalisés à partir des supergènes des souches d'origine pulmonaire (Annexe 7) sont concordants entre eux. En analysant les dendrogrammes avec les résultats des complexes clonaux de l'analyse eBURST, il apparaît que, de manière générale, les souches d'un même complexe clonal sont représentées sur la même branche. Il existe cependant quelques exceptions ; les souches de profil allélique ST-3 et ST-361 sont représentées sur la branche contenant les souches appartenant au CC19 alors qu'elles appartiennent au CC10 (Figure 19). Les souches de ST-130 et 10T02 n'appartiennent pas au complexe clonal dont font partie les autres souches de leur branche.

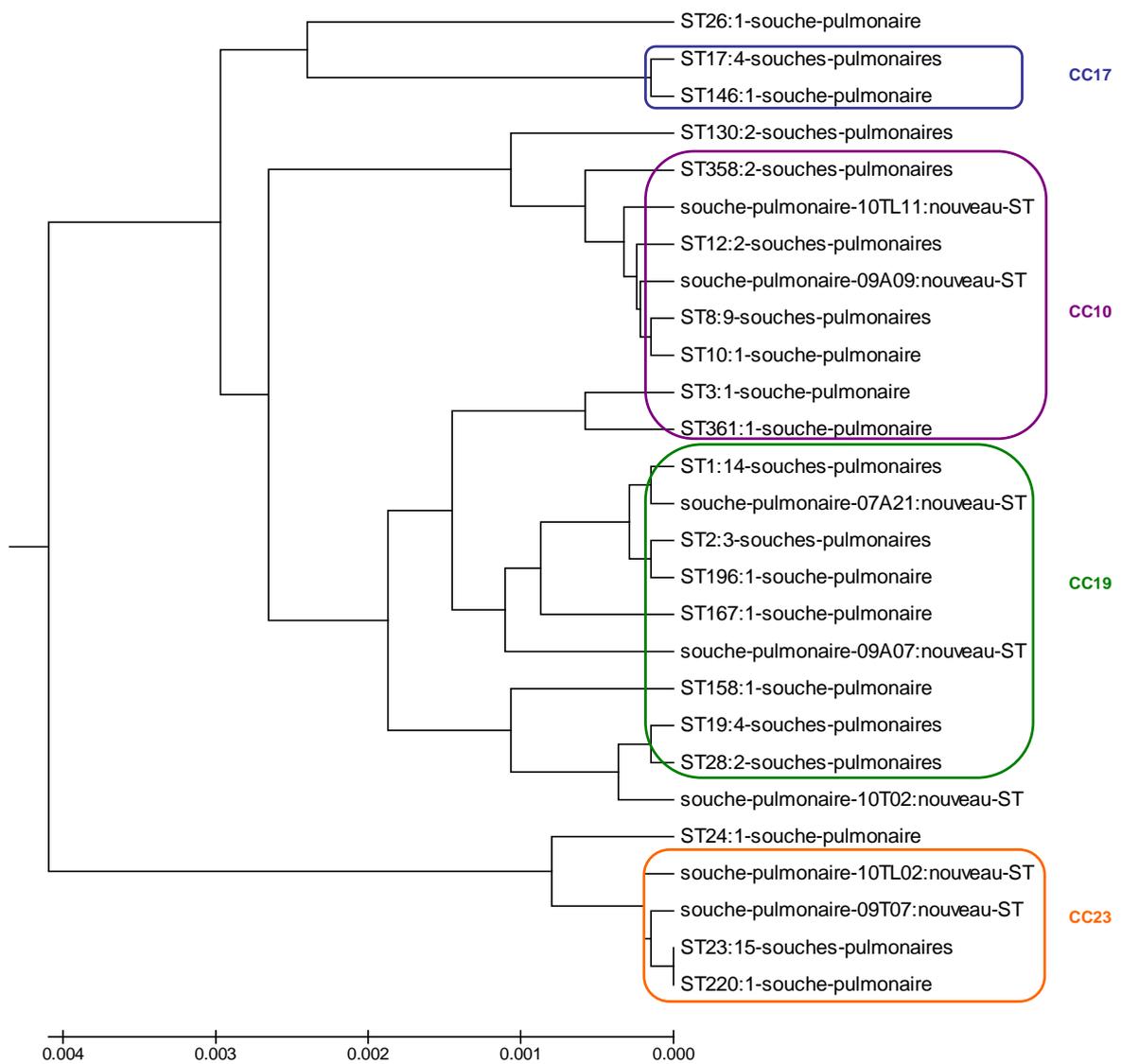


Figure 19 : Arbre phylogénétique représentant les souches d'origine pulmonaire, réalisé à partir du supergène avec la méthode UPGMA sur le logiciel MEGA.

### **5.11. Position phylogénétique des souches de streptocoque du groupe B d'origine pulmonaire au sein de l'espèce**

Comme pour l'arbre phylogénétique représentant les souches d'origine pulmonaire, les souches d'un même complexe clonal sont généralement représentées sur la même branche. Seuls les complexes clonaux CC10 et CC7 sont représentés sur la même branche et semblent être relativement proches alors que les autres complexes clonaux sont chacun sur une branche différente des autres et semblent donc plus indépendants les uns des autres.

Comme pour l'analyse des souches d'origine pulmonaire seules, l'analyse eBURST et les arbres réalisés avec les supergènes ne sont pas complètement en accord. Ainsi, de la même façon, les souches ayant le profil allélique ST-3 ou ST-361 et qui appartiennent au CC10, se situent sur la même branche que d'autres souches du CC19. Et certains STs (par exemple ST-85, ST-64, 10T02, ST-307), sont représentés sur les mêmes branches que d'autres STs mais n'appartiennent pas à leur complexe clonal.

On remarque aussi, qu'en ajoutant les souches d'autres provenances, l'origine des différentes branches change. Ainsi, sur l'arbre phylogénétique représentant uniquement les streptocoque du groupe B d'origine pulmonaire, les souches des branches des complexes clonaux CC10 et CC19 semblent avoir un ancêtre commun plus proche que les souches situées sur la branche du complexe clonal CC17, alors que sur l'arbre phylogénétique représentant toutes les souches, l'ancêtre commun entre les complexes clonaux CC10 et CC19 est plus éloigné que l'ancêtre commun entre les CC19 et CC17.

L'étude phylogénétique des supergènes montre une certaine dispersion des souches d'origine pulmonaire (AP) au sein de la population des streptocoques du groupe B (Figure 20). On remarque cependant que la majorité des souches se regroupe dans les branches comprenant les souches des complexes clonaux CC19, CC10, et CC23. Les souches d'infections néonatales ont une répartition différente et sont regroupées majoritairement sur deux branches comprenant les souches des complexes clonaux CC17 et CC19.

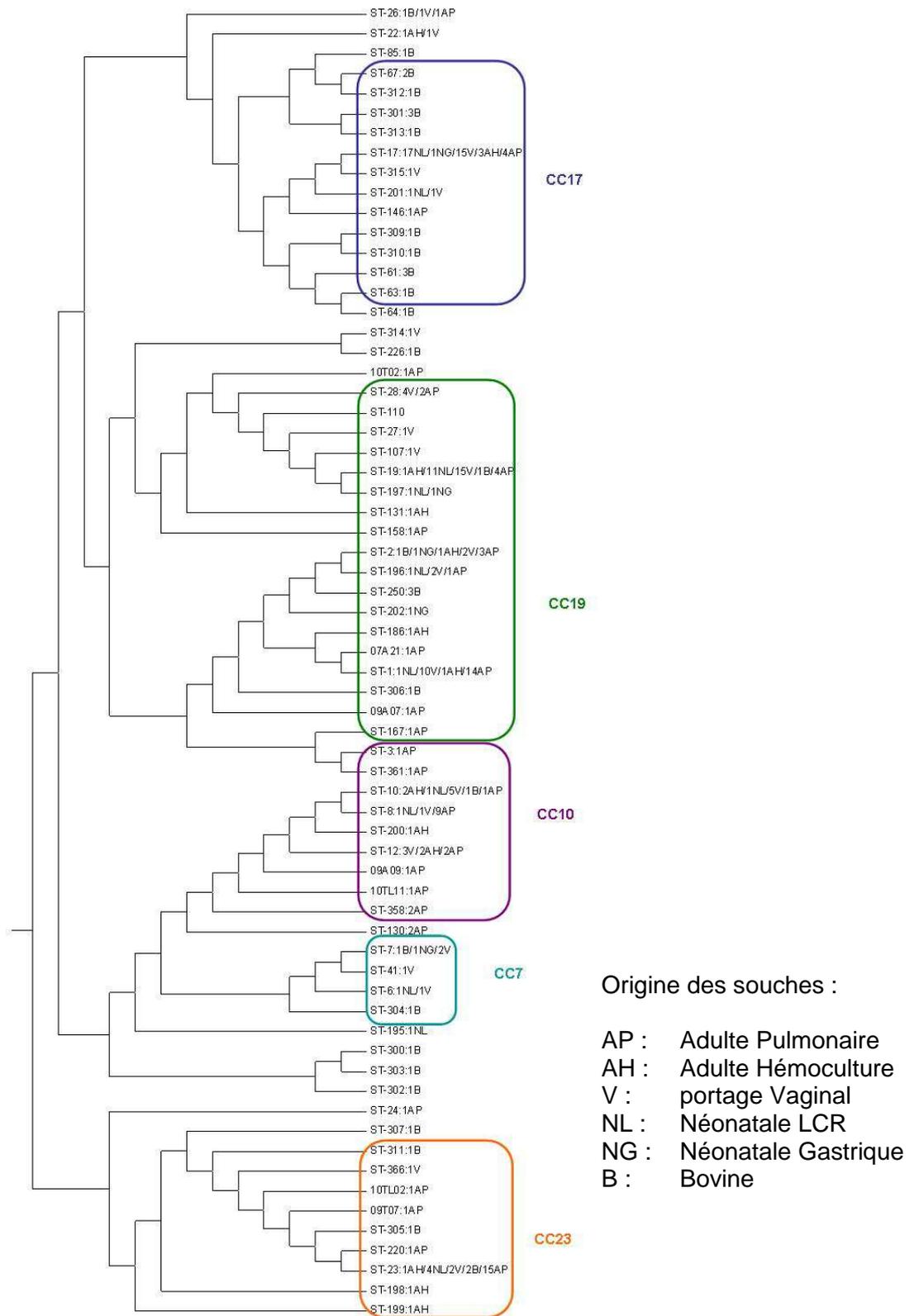


Figure 20 : Arbre phylogénétique représentant toutes les souches de streptocoque du groupe B, réalisé à partir du supergène avec la méthode UPGMA avec le logiciel MEGA.

## 6. Discussion

L'objectif de notre étude était de savoir si les souches de streptocoque du groupe B d'origine pulmonaire constituaient un groupe spécifique. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé le sérotypage moléculaire et le typage MLST de 74 souches streptocoque du groupe B isolées de prélèvements pulmonaires, chez l'adulte entre 2007 et 2011 dans les CHU d'Amiens, Brest, Toulouse et Tours. Ces souches ont été comparées à 186 souches de streptocoque du groupe B humaines provenant d'autres origines ou d'origine bovine. Le principal résultat de notre étude est que la majorité des souches de streptocoque du groupe B d'origine pulmonaire est de sérotypes Ia, V et Ib et appartient aux complexes clonaux CC19, CC10 et CC23.

L'obtention de nos résultats reposait sur deux techniques de biologie moléculaire, que nous avons optimisé au cours du travail expérimental. Ainsi, le protocole initial proposé pour le typage MLST a été modifié, plus particulièrement au niveau des deux étapes de purification. La première étape de purification après la PCR d'amplification, réalisée initialement par une méthode avec de l'isopropanol, a été remplacée par la méthode de purification sur colonne. La technique de purification des séquences a aussi été revue et la technique de purification sur résine Sephadex a finalement été préférée à la technique de purification sur plaque Millipore sous vide.

Par ailleurs, nous avons décidé de réaliser le sérotypage moléculaire avec la méthode d'Imperi car c'est une technique simple et reproductible. Il s'agit d'une réaction de PCR multiplex suivie d'une électrophorèse, permettant la détection des 10 sérotypes connus, en utilisant simultanément 19 amorces. Or, les résultats précédemment obtenus au laboratoire ont montré un phénomène d'amplification préférentielle pour les amorces *cpsG*. La technique a donc été modifiée par Dorine Bouvet et rédigée en deux protocoles. Le premier protocole contenait toutes les amorces sauf celles pour *cpsG* et permettait d'identifier les types capsulaires Ib, V, VI, VII et IX. Le deuxième protocole ne contenait que les amorces *cpsG* et permettait d'identifier les types capsulaires Ia et III.

Parmi les souches d'origine pulmonaire, les sérotypes les plus représentés sont les sérotypes V (28,4%), Ia (27,0%), Ib (17,6%) (Figure 21).

Ces résultats sont comparables à ceux d'études précédemment réalisées chez des adultes présentant une infection invasive à streptocoque du groupe B. Par exemple, dans les études de Salloum sur des souches d'infections cutanées ou ostéo-articulaires (82) ou sur des souches de bactériémies (83), les sérotypes prédominants dans les infections chez l'adulte sont les sérotypes V (36,2 et 31%), Ia (29,3 et 23%), III (22,4 et 19%), Ib (6,9 et 19%). De même, dans les études de Farley (59), Phares (14) et Skoff (60) portant sur des souches de streptocoque du groupe B provenant d'infections variées chez l'adulte, les pourcentages sont semblables. Cependant, dans d'autres études réalisées chez l'adulte, les pourcentages varient sensiblement par rapport à nos résultats. Ainsi, dans l'étude de Martins (84) portant sur des streptocoque du groupe B isolés d'hémoculture, les sérotypes Ia et V représentent respectivement 34,7% et 19,6%. Dans celles de Lambertsen (62) et Bergsen (61) sur des souches d'infections invasives d'origine diverse, le sérotypes III est prédominant et représente respectivement 29,4% et 24% des souches mais le sérotipe V reste présent dans 18,7% et 24% des souches.

Pour les souches d'infections néonatales, les sérotypes diffèrent de ceux des souches pulmonaires. En effet, d'après la méta-analyse de Edmond (38), les sérotypes les plus fréquents dans les infections néonatales sont le sérotypes III avec 49% des souches et le sérotipe Ia avec 23% des souches, quant au sérotipe Ib, prédominant chez l'adulte, il représente moins de 10% des souches isolées chez le nouveau-né.

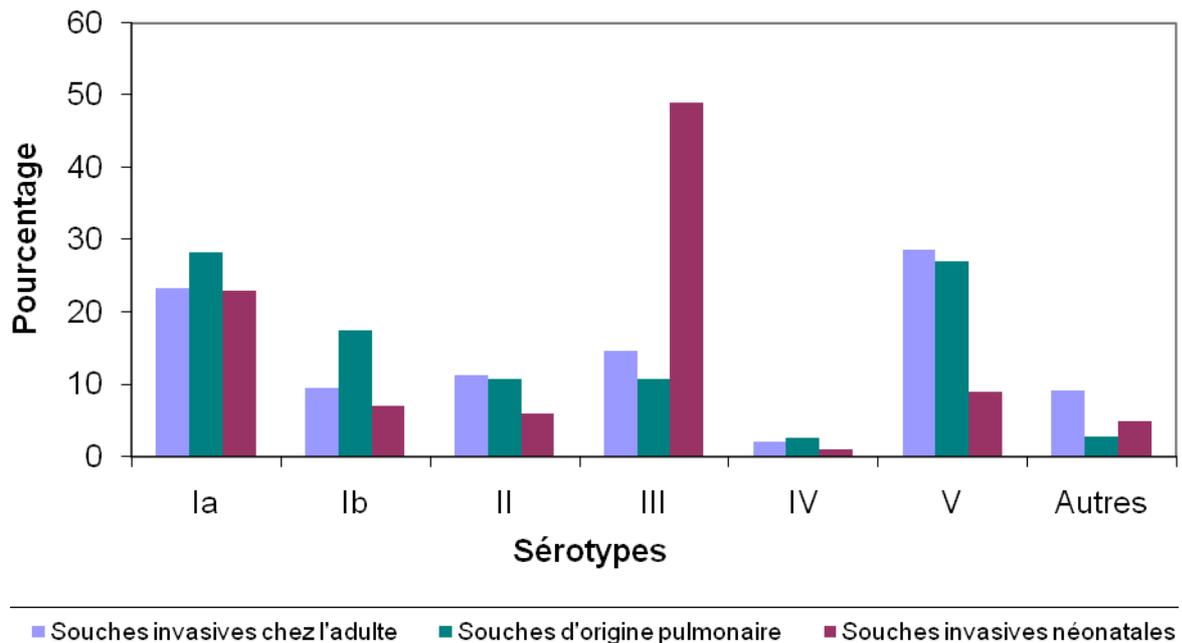


Figure 21 : Répartition des sérotypes des souches d'origine pulmonaire chez l'adulte comparée aux données de la littérature de 2000 à 2012.

Dans ce graphique, les valeurs des pourcentages pour les souches invasives chez l'adulte correspondent aux moyennes pondérées calculées à partir des données des études suivantes : Tyrrell (73), Farley (59), Persson (63), Edwards (58), Phares (14), Zhao (85), Bergsen (61), Skoff (60), Lambertsen (62), Tazi (15), Martins (84), Salloum (82,83). Pour les souches invasives d'infections néonatales, les données représentées sont celle de la méta-analyse d'Edmond (38).

Puisque les Sequence Types se regroupent en complexes clonaux, la signification générale concernant les proportions des STs et des CC en fonction de l'origine des souches va dans le même sens. Ainsi, le CC23 comprend essentiellement le ST-23, le CC19, comprend les ST-1 et ST-19 et le CC10 comprend les ST-8, ST-10 et ST-12.

Dans les études avec des effectifs peu nombreux, les logiciels d'analyse phylogénétique ne regroupent pas les isolats de la même façon. Par exemple, pour les souches d'origine pulmonaire, ST-1 et ST-19 sont regroupés par le logiciel eBURST au sein du même complexe clonal, le CC19, alors que, par exemple, dans l'étude de Luan (86), les souches avec ces profils sont répartis dans deux complexes clonaux distincts, CC1 et CC19. Pour comparer les données des différentes études, nous avons donc choisi de rassembler les souches appartenant à ces deux complexes clonaux en un seul complexe clonal, le CC1-19. Pour la même raison, dans les différentes études, en fonction du nombre de souches pour chaque ST, le

complexe clonal peut porter un numéro différent, par exemple, les complexes clonaux CC7, CC8, le CC10, CC12 sont, en réalité, le même complexe clonal, nommé CC10 dans notre étude.

Nos résultats montrent que la majorité des streptocoques du groupe B d'origine pulmonaire appartient aux complexes clonaux CC1-19 (37,8%) avec 18,9% de souches ST-1, CC10 (24,3%) avec 12,2% de souches ST-8 et CC23 (24,3%) avec 20,3% de souches ST-23.

Dans les autres études chez l'adulte, les souches sont aussi réparties majoritairement dans le complexe clonal CC1-19 et dans une moindre proportion, dans les complexes clonaux CC10 et CC23 (Figure 22). Par exemple, dans l'étude de Luan sur des souches provenant d'hémocultures et d'infections du système nerveux central (86), la majorité des souches d'infections invasives fait partie du CC1-19 (52,8%), les autres complexes clonaux étant bien moins représentés. Dans les études de Salloum sur des souches d'infections cutanées ou ostéo-articulaires (82) ou sur des souches de bactériémies (83), les souches invasives appartenant au CC1-19 représentent 48,2% et 42%, et celles appartenant au CC23, 31% et 20%. Dans l'étude d'Haguenoer (81), les souches provenant d'hémocultures chez l'adulte appartiennent aux CC1-19 et CC10 pour 29,4% et aux CC17 et CC23 pour 17,6% (Figure 22).

A l'inverse, dans les études portant sur les infections néonatales, le complexe clonal le plus fréquent est le CC17, suivi par les CC1-19 et CC23. Ainsi, dans l'étude d'Haguenoer (81), le CC17 représente 64,4% des souches, et le CC1-19, 18,6% des souches (Figure 22). De même, dans l'étude de Salloum (83), le CC17 regroupe 67% des souches, alors que les complexes clonaux CC23 et CC1-19 ne comprennent, respectivement, que 13% et 10% des souches. Dans d'autres études, le complexe clonal CC17 est bien représenté, mais le CC1-19 est le complexe clonal majoritaire. Ainsi, dans les études de Luan (86), Bergsen (87) Manning (88), le CC1-19 représente entre 40 et 45% des souches et le CC17 comprend 30 à 35% des souches (Figure 22).

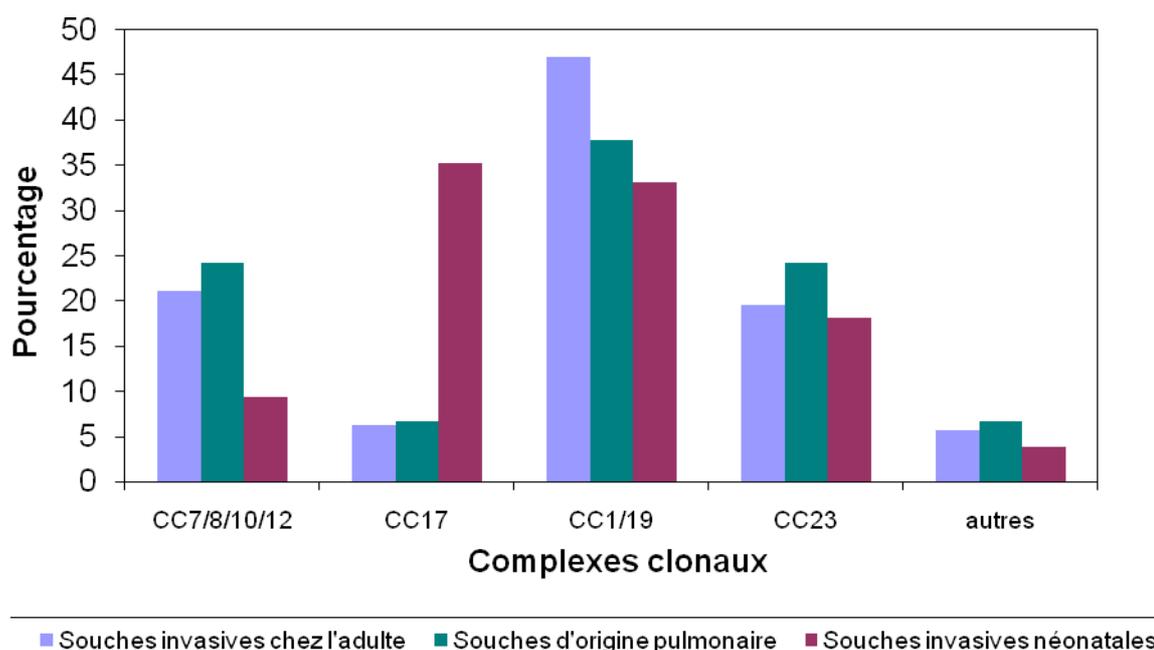


Figure 22 : Répartition des Complexes clonaux des souches des études réalisées à Tours chez l'adulte, comparée aux données de la littérature.

Dans ce graphique, les valeurs des pourcentages pour les souches invasives chez l'adulte correspondent aux moyennes pondérées calculées à partir des données des études suivantes : Luan (86), Tien (89), Haguenoer (81), Salloum (82,83). Pour les souches invasives d'infections néonatales, les données représentées correspondent aux moyennes pondérées calculées à partir des données des études suivantes : Haguenoer (81), Luan (86), Bohnsack (90), Tien (89), Bergsen (87), Manning (88), Salloum (83).

L'ensemble de ces travaux montre donc que les souches impliquées dans les infections invasives néonatales sont majoritairement regroupées au sein des complexes clonaux CC17 et CC1-19 alors que les souches d'origine pulmonaire, comme les souches retrouvées dans les infections chez l'adulte, sont majoritairement regroupées dans les complexes clonaux CC1-19, CC10, CC23.

Pour mieux comprendre la physiopathologie des infections pulmonaires à streptocoque du groupe B, il serait intéressant de connaître la provenance « anatomique » des souches. Toutefois, les études sur la répartition des STs des souches de portage pharyngé sont peu nombreuses et le nombre de souches est faible. Dans l'étude de van der Mee, les souches de portage pharyngé appartiennent aux clones ST-1, ST-8 et ST-23, ce qui correspond aux STs dont la majorité des souches d'origine pulmonaire est issue, alors que les STs majoritaires parmi les

souches de portage recto-vaginal sont les ST-2, ST-10 et ST-19 (75). Ces résultats pourraient expliquer en partie les différences observées entre les souches d'origine pulmonaire et les souches d'infections néonatales, de même que les différences entre les souches d'origine pulmonaire et les souches des autres études sur les infections chez l'adulte. Ces différences pourraient être expliquées par l'existence d'une porte d'entrée différente et donc des souches différentes en fonction de la flore locale au niveau de cette porte d'entrée. Cependant les effectifs de ces études sont faibles et ces résultats mériteraient d'être approfondis.

La poursuite de ces travaux est d'autant plus importante que, dans les infections survenant chez des patients immunodéprimés, les bactéries responsables sont souvent issues de leur propre flore, donc il paraît logique de voir une correspondance entre les STs des souches invasives et des souches de portage. Ainsi, pour les souches de streptocoque du groupe B d'origine pulmonaire, les clones prédominants correspondent aux clones prédominants des souches de portage pharyngé (75), contrairement aux infections chez le nouveau né, où la majorité des souches invasives n'appartient pas toujours au clone prédominant dans les souches de portage. En effet, parmi les souches invasives néonatales, un clone plus virulent, le ST-17, a été mis en évidence. L'étude de Musser et al.(91) a suggéré l'existence, parmi les souches de sérotype III, d'un très clone virulent en cause dans les infections néonatales invasives, supposition fondée sur l'observation d'une discordance au niveau de la répartition des types électrophorétiques entre les souches d'infection néonatale et les souches de portage vaginal. Des études similaires ont également été menées en France (92). La grande majorité des infections invasives du nouveau-né, et la quasi-totalité des méningites, sont provoqués par un nombre limité de souches de sérotype III. Les analyses par MLST ont révélé que les souches ST-17 définissent un clone homogène, fortement associé aux infections néonatales invasives (33,86,93,94), clone que l'on ne retrouve qu'en petite proportion dans les souches d'origine pulmonaire chez l'adulte.

L'augmentation de l'incidence des infections à streptocoque du groupe B chez les adultes ne semble pas due à l'augmentation de sérotypes plus virulents, mais est probablement due au vieillissement de la population et à l'augmentation du nombre d'adultes avec des pathologies chroniques comme le diabète dont la prévalence a beaucoup augmenté chez les adultes ces dernières décennies (60). Il pourrait en être de même pour les infections pulmonaires où le streptocoque du groupe B agirait comme un opportuniste chez les patients immunodéprimés et coloniserait le poumon à partir d'un portage pharyngé.

## 7. Conclusion

Notre étude a permis de caractériser les souches de streptocoque du groupe B d'origine pulmonaire, chez des patients hospitalisés entre 2007 et 2011 dans divers CHU. Nos travaux montrent que les sérotypes prédominants sont les sérotypes V, Ia et Ib, les profils alléliques les plus représentés sont les ST-23, ST-1 et ST-8 et les complexes clonaux majoritaires sont les CC1-19, CC10 et CC23. Dans cette étude, malgré une certaine diversité au niveau des sérotypes et des profils, il apparaît que les souches d'origine pulmonaire appartiennent de façon prédominante à certains clones, différents de ceux retrouvés dans les infections néonatales, mais identiques aux clones impliqués dans les autres infections à streptocoque du groupe B de l'adulte. De plus, il apparaît que les souches d'origine pulmonaire appartiennent à des complexes clonaux que l'on retrouve parmi les souches de portage au niveau pharyngé, ce qui conforte l'idée que les patients s'infectent ou se colonisent à partir de leurs souches de portage de streptocoque du groupe B présentes au niveau de la sphère oro-pharyngée. D'autres études phylogénétiques comparatives entre les souches invasives pulmonaires et les souches de colonisation pharyngée pourraient être intéressantes afin de confirmer ces résultats et d'élucider les différences de tropisme en fonction des différents sérotypes ou complexes clonaux des streptocoques du groupe B.

## 8. Bibliographie

1. Ross PW. Group-B streptococcus - profile of an organism. *J. Med. Microbiol.* 1984;18(2):139-166.
2. Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 1933;57(4):571-595.
3. Lancefield RC. A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (group B). *J. Exp. Med.* 1934;59(4):441-458.
4. Dermer P, Lee C, Eggert J, Few B. A history of neonatal group B streptococcus with its related morbidity and mortality rates in the United States. *J Pediatr Nurs.* 2004;19(5):357-363.
5. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn: Guidelines for prevention of group B streptococcal (GBS) infection by chemoprophylaxis. *Pediatrics.* 1992;90(5):775-778.
6. ACOG committee opinion. Prevention of early-onset group B streptococcal disease in newborns. Number 173. Committee on Obstetric Practice. American College of Obstetrics and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet.* 1996;54(2):197-205.
7. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep.* 31 mai 1996;45(RR-7):1-24.
8. Anaes. Agence Nationale d'Accreditation et d'Evaluation en Sante. Antenatal prevention of early neonatal bacterial infection. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2003;32(1):68-74.
9. Trivalle C, Martin E, Martel P, Jacque B, Menard JF, Lemeland JF. Group B streptococcal bacteraemia in the elderly. *J. Med. Microbiol.* 1998;47(7):649-652.
10. Denis F, Garnier F. *Bactériologie médicale, chapitre 29, Cocci à Gram positif, pages 252-285.* Elsevier Masson; 2011.
11. Bouvet A, Schlegel L, Loubinoux J, Freney J. *Précis de bactériologie clinique, chapitre 45, streptococcaceae, pages 845-898.* Éd. ESKA; 2007.
12. Borchardt SM, DeBusscher JH, Tallman PA, Manning SD, Marrs CF, Kurzynski TA, et al. Frequency of antimicrobial resistance among invasive and colonizing Group B streptococcal isolates. *BMC Infect. Dis.* 2006;6:57.
13. Castor ML, Whitney CG, Como-Sabetti K, Facklam RR, Ferrieri P, Bartkus JM, et al. Antibiotic resistance patterns in invasive group B streptococcal isolates. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2008;727505.

14. Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA*. 2008;299(17):2056-2065.
15. Tazi A, Morand PC, Réglier-Poupet H, Dmytruk N, Billoët A, Antona D, et al. Invasive group B streptococcal infections in adults, France (2007-2010). *Clin. Microbiol. Infect.* 2011;17(10):1587-1589.
16. Poyart C, Réglier-Poupet H, Tazi A, Billoët A, Dmytruk N, Bidet P, et al. Invasive group B streptococcal infections in infants, France. *Emerging Infect. Dis.* 2008;14(10):1647-1649.
17. Poyart C, Bouvet A, Bingen E, Trieu-Cuot P. Rapport d'activités 2011 - CNR streptocoques. 2011.
18. Poyart C, Courvalin P, Leclercq R. AntibioGramme, Chapitre 25, Tetracyclines, pages 325-333. Editions Eska; 2012.
19. Poyart C, Jardy L, Quesne G, Berche P, Trieu-Cuot P. Genetic basis of antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* strains isolated in a French hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003;47(2):794-797.
20. Dogan B, Schukken YH, Santisteban C, Boor KJ. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(12):5899-5906.
21. Slotved H-C, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45(9):2929-2936.
22. Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, Rodrigues S, et al. Structural and genetic diversity of group B streptococcus capsular polysaccharides. *Infect. Immun.* 2005;73(5):3096-3103.
23. Kong F, Gowan S, Martin D, James G, Gilbert GL. Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(1):216-226.
24. Kong F, Ma L, Gilbert GL. Simultaneous detection and serotype identification of *Streptococcus agalactiae* using multiplex PCR and reverse line blot hybridization. *J. Med. Microbiol.* 2005;54(Pt 12):1133-1138.
25. Kong F, Lambertsen LM, Slotved H-C, Ko D, Wang H, Gilbert GL. Use of phenotypic and molecular serotype identification methods to characterize previously nonserotypeable group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46(8):2745-2750.
26. Manning SD, Lacher DW, Davies HD, Foxman B, Whittam TS. DNA polymorphism and molecular subtyping of the capsular gene cluster of group B streptococcus. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(12):6113-6116.

27. Poyart C, Tazi A, Réglier-Poupet H, Billoët A, Tavares N, Raymond J, et al. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45(6):1985-1988.
28. Imperi M, Pataracchia M, Alfalone G, Baldassarri L, Orefici G, Creti R. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. *J. Microbiol. Methods.* 2010;80(2):212-214.
29. Fasola E, Livdahl C, Ferrieri P. Molecular analysis of multiple isolates of the major serotypes of group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 1993;31(10):2616-2620.
30. Rolland K, Marois C, Siquier V, Cattier B, Quentin R. 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(6):1892-1898.
31. Amundson NR, Flores AE, Hillier SL, Baker CJ, Ferrieri P. DNA macrorestriction analysis of nontypeable group B streptococcal isolates: clonal evolution of nontypeable and type V isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(2):572-576.
32. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;95(6):3140-3145.
33. Jones N, Bohnsack JF, Takahashi S, Oliver KA, Chan M-S, Kunst F, et al. Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41(6):2530-2536.
34. Martins ER, Andreu A, Correia P, Juncosa T, Bosch J, Ramirez M, et al. Group B streptococci causing neonatal infections in barcelona are a stable clonal population: 18-year surveillance. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49(8):2911-2918.
35. Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease - revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep.* 2010;59(RR-10):1-36.
36. Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, Reingold AL, Harrison LH, Lefkowitz LB, et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N. Engl. J. Med.* 2000;342(1):15-20.
37. Verani JR, Schrag SJ. Group B streptococcal disease in infants: progress in prevention and continued challenges. *Clin Perinatol.* 2010;37(2):375-392.
38. Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, Schrag SJ, Zaidi AKM, Cousens S, et al. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2012;379(9815):547-556.
39. Krohn MA, Hillier SL, Baker CJ. Maternal peripartum complications associated with vaginal group B streptococci colonization. *J. Infect. Dis.* 1999;179(6):1410-1415.

40. Quentin R. Prise en charge des infections à *Streptococcus agalactiae* en obstétrique. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*. 2002;31(sup 6):65-73.
41. Didier C, Streicher M-P, Chognot D, Campagni R, Schnebelen A, Messer J, et al. Late-onset neonatal infections: incidences and pathogens in the era of antenatal antibiotics. *Eur. J. Pediatr*. 2012;171(4):681-687.
42. Kuhn P, Dheu C, Bolender C, Chognot D, Keller L, Demil H, et al. Incidence and distribution of pathogens in early-onset neonatal sepsis in the era of antenatal antibiotics. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2010;24(5):479-487.
43. Dumas A-M, Girard R, Ayzac L, Beaumont G, Caillat-Vallet E, Depaix F, et al. Effect of intrapartum antibiotic prophylaxis against group B streptococcal infection on comparisons of rates of endometritis and urinary tract infection in multicenter surveillance. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29(4):327-332.
44. Hansen SM, Uldbjerg N, Kilian M, Sørensen UBS. Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *J. Clin. Microbiol*. 2004;42(1):83-89.
45. McKenna DS, Matson S, Northern I. Maternal group B streptococcal (GBS) genital tract colonization at term in women who have asymptomatic GBS bacteriuria. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2003;11(4):203-207.
46. Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R, Kliucinskas M, Maleckiene L, Nadisauskiene R. Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008;87(3):260-271.
47. Madzivhandila M, Adrian PV, Cutland CL, Kuwanda L, Schrag SJ, Madhi SA. Serotype distribution and invasive potential of group B streptococcus isolates causing disease in infants and colonizing maternal-newborn dyads. *PLoS ONE*. 2011;6(3):e17861.
48. Oddie S, Embleton ND. Risk factors for early onset neonatal group B streptococcal sepsis: case-control study. *BMJ*. 2002;325(7359):308.
49. Adair CE, Kowalsky L, Quon H, Ma D, Stoffman J, McGeer A, et al. Risk factors for early-onset group B streptococcal disease in neonates: a population-based case-control study. *CMAJ*. 2003;169(3):198-203.
50. Schrag SJ, Zell ER, Lynfield R, Roome A, Arnold KE, Craig AS, et al. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. *N. Engl. J. Med*. 2002;347(4):233-239.
51. Lim DV, Morales WJ, Walsh AF, Kazanis D. Reduction of morbidity and mortality rates for neonatal group B streptococcal disease through early diagnosis and chemoprophylaxis. *J. Clin. Microbiol*. 1986;23(3):489-492.
52. Matorras R, García-Perea A, Omeñaca F, Diez-Enciso M, Madero R, Usandizaga JA. Intrapartum chemoprophylaxis of early-onset group B streptococcal disease. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*. 1991;40(1):57-62.

53. Anaes. Agence Nationale d'Accreditation et d'Evaluation en Sante. Diagnosis and treatment of early bacterial infection in newborns. *Arch Pediatr.* 2003;10(5):489-496.
54. Pasquier J-C, Doret M. Complications and monitoring of the latency period after a preterm premature rupture of the fetal membranes: literature review. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2008;37(6):568-578.
55. RFCLIN Réseau Franco Contois de Lutte Contre les Infections Nosocomiales et pour le bon usage des antibiotiques. Antibioprophylaxie chez la femme enceinte Prévention anténatale du risque infectieux bactérien néonatal précoce. 2009.
56. Spellerberg B. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes Infect.* 2000;2(14):1733-1742.
57. Puopolo KM, Madoff LC, Eichenwald EC. Early-onset group B streptococcal disease in the era of maternal screening. *Pediatrics.* 2005;115(5):1240-1246.
58. Edwards MS, Baker CJ. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin. Infect. Dis.* 2005;41(6):839-847.
59. Farley MM. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin. Infect. Dis.* 2001;33(4):556-561.
60. Skoff TH, Farley MM, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Gershman K, et al. Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. *Clin. Infect. Dis.* 2009;49(1):85-92.
61. Bergseng H, Rygg M, Bevanger L, Bergh K. Invasive group B streptococcus (GBS) disease in Norway 1996-2006. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008;27(12):1193-1199.
62. Lambertsen L, Ekelund K, Skovsted IC, Liboriussen A, Slotved H-C. Characterisation of invasive group B streptococci from adults in Denmark 1999 to 2004. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2010;29(9):1071-1077.
63. Persson E, Berg S, Trollfors B, Larsson P, Ek E, Backhaus E, et al. Serotypes and clinical manifestations of invasive group B streptococcal infections in western Sweden 1998-2001. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004;10(9):791-796.
64. Ekelund K, Skinhøj P, Madsen J, Konradsen HB. Invasive group A, B, C and G streptococcal infections in Denmark 1999-2002: epidemiological and clinical aspects. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005;11(7):569-576.
65. Bolaños M, Cañas A, Santana OE, Pérez-Arellano JL, de Miguel I, Martín-Sánchez AM. Invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2001;20(11):837-839.
66. Blancas D, Santin M, Olmo M, Alcaide F, Carratala J, Gudiol F. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults: incidence, clinical characteristics, and outcome. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2004;23(3):168-173.

67. Lefebvre N, Forestier E, Mohseni-Zadeh M, Remy V, Lesens O, Kuhnert C, et al. Invasive *Streptococcus agalactiae* infections in non-pregnant adults. *Med Mal Infect.* 2007;37(12):796-801.
68. Quentin R. Streptocoque du groupe B en pathologie humaine: origine des isolats et sensibilité aux antibiotiques. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire.* 2006;45:352-354.
69. Perovic O, Crewe-Brown HH, Khoosal M, Karstaedt AS. Invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1999;18(5):362-364.
70. Bibes B. Infections à streptocoque du groupe B chez l'adulte: étude clinique de 41 bactériémies. *Médecine et maladies infectieuses.* 2002;32(6):294-298.
71. Larpanichpoonphol P, Watanakunakorn C. Group B streptococcal bacteremia in nonpregnant adults at a community teaching hospital. *South. Med. J.* 2001;94(12):1206-1211.
72. Kim BN, Bae IG, Kim MN, Woo JH, Ryu J, Kim YS. Group B streptococcal bacteremia in nonpregnant adults with hepatic disease in Korea. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2001;20(9):639-642.
73. Tyrrell GJ, Senzilet LD, Spika JS, Kertesz DA, Alagaratnam M, Lovgren M, et al. 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(1):168-173.
74. Edwards MS, Rench MA, Palazzi DL, Baker CJ. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in healthy elderly persons. *Clin. Infect. Dis.* 2005;40(3):352-357.
75. Van der Mee-Marquet N, Fourny L, Arnault L, Domelier A-S, Salloum M, Lartigue M-F, et al. Molecular characterization of human-colonizing *Streptococcus agalactiae* strains isolated from throat, skin, anal margin, and genital body sites. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46(9):2906-2911.
76. Ferrieri P, Blair LL. Pharyngeal carriage of group B streptococci: detection by three methods. *J. Clin. Microbiol.* 1977;6(2):136-139.
77. Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998;11(3):497-513.
78. Farley MM, Harvey RC, Stull T, Smith JD, Schuchat A, Wenger JD, et al. A population-based assessment of invasive disease due to group B *Streptococcus* in nonpregnant adults. *N. Engl. J. Med.* 1993;328(25):1807-1811.
79. Sunkara B, Bheemreddy S, Lorber B, Lephart PR, Hayakawa K, Sobel JD, et al. Group B *Streptococcus* infections in non-pregnant adults: the role of immunosuppression. *Int. J. Infect. Dis.* 2012;16(3):e182-186.

80. Farley MM. Group B streptococcal infection in older patients. Spectrum of disease and management strategies. *Drugs Aging*. 1995;6(4):293-300.
81. Haguenoer E, Baty G, Pourcel C, Lartigue M-F, Domelier A-S, Rosenau A, et al. A multi locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) scheme for *Streptococcus agalactiae* genotyping. *BMC Microbiol*. 2011;11:171.
82. Salloum M, van der Mee-Marquet N, Domelier A-S, Arnault L, Quentin R. Molecular characterization and prophage DNA contents of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from adult skin and osteoarticular infections. *J. Clin. Microbiol*. 2010;48(4):1261-1269.
83. Salloum M, van der Mee-Marquet N, Valentin-Domelier A-S, Quentin R. Diversity of prophage DNA regions of *Streptococcus agalactiae* clonal lineages from adults and neonates with invasive infectious disease. *PLoS ONE*. 2011;6(5):e20256.
84. Martins ER, Melo-Cristino J, Ramirez M. Dominance of Serotype Ia among Group B Streptococci Causing Invasive Infections in Nonpregnant Adults in Portugal. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1219-1227.
85. Zhao Z, Kong F, Zeng X, Gidding HF, Morgan J, Gilbert GL. Distribution of genotypes and antibiotic resistance genes among invasive *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus) isolates from Australasian patients belonging to different age groups. *Clin. Microbiol. Infect*. 2008;14(3):260-267.
86. Luan S-L, Granlund M, Sellin M, Lagergård T, Spratt BG, Norgren M. Multilocus sequence typing of Swedish invasive group B streptococcus isolates indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching. *J. Clin. Microbiol*. 2005;43(8):3727-3733.
87. Bergseng H, Afset JE, Radtke A, Loeseth K, Lyng RV, Rygg M, et al. Molecular and phenotypic characterization of invasive group B streptococcus strains from infants in Norway 2006-2007. *Clin. Microbiol. Infect*. 2009;15(12):1182-1185.
88. Manning SD, Springman AC, Lehotzky E, Lewis MA, Whittam TS, Davies HD. Multilocus sequence types associated with neonatal group B streptococcal sepsis and meningitis in Canada. *J. Clin. Microbiol*. 2009;47(4):1143-1148.
89. Tien N, Ho C-M, Lin H-J, Shih M-C, Ho M-W, Lin H-C, et al. Multilocus sequence typing of invasive group B *Streptococcus* in central area of Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2011;44(6):430-434.
90. Bohnsack JF, Whiting A, Gottschalk M, Dunn DM, Weiss R, Azimi PH, et al. 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(4):1285-1291.
91. Musser JM, Mattingly SJ, Quentin R, Goudeau A, Selander RK. 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(12):4731-4735.

92. Quentin R, Huet H, Wang FS, Geslin P, Goudeau A, Selander RK. 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(10):2576-2581.
93. Lamy M-C, Dramsi S, Billoët A, Réglier-Poupet H, Tazi A, Raymond J, et al. Rapid detection of the « highly virulent » group B *Streptococcus* ST-17 clone. *Microbes Infect.* 2006;8(7):1714-1722.
94. Weisner AM, Johnson AP, Lamagni TL, Arnold E, Warner M, Heath PT, et al. Characterization of group B streptococci recovered from infants with invasive disease in England and Wales. *Clin. Infect. Dis.* 2004;38(9):1203-1208.

## 9. Annexes

Annexe 1 : Programmes du thermocycleur pour les différentes PCR

Réaction d'amplification de la technique MLST

94 °C	50 °C	72 °C	Nombre de cycles
1' 30			1
30"	30"	1'	30
		4'	1

Réaction de séquençage de la technique MLST

94°C	96 °C	50 °C	60 °C	Nombre de cycles
1'30				1
	10"	10"	4'	30

PCR de sérotypage

95 °C	54 °C	56 °C	72 °C	Nombre de cycles
5'				1
60"	60"		2'	15
60"		60"	2'	25
			10'	1

Annexe 2 : Tableaux des concentrations et volumes d'ADN

		pureté	conc ADN (ng/µl)	conc (µmol/l)	Vol ADN qsp 500µl eau
Décembre 2010	07A03	1,4	592	1215	4,1
	07A09	1,4	377	775	6,5
	07A18	1,2	231	475	10,5
	07A19	1,57	998	2050	2,4
	07A20	1,3	477	980	5,1
	07A25	1,25	312	640	7,8
	07A35	1,05	149	305	16,4
	07A36	1,32	334	685	7,3
	07A37	1,45	524	1075	4,7
	08A03	1,67	743	1525	3,3
	08A04	1,36	463	950	5,3
	08A05	1,29	226	465	10,8
	08A10	1,28	365	750	6,7
	08A15	1,34	412	845	5,9
	08A21	1,38	319	655	7,6
	08A30	1,31	348	715	7,0
	08A32	1,48	567	1165	4,3
	08A33	1,56	818	1680	3,0
	08B01	1,23	231	475	10,5
	08B02	1,31	1179	2420	2,1
	09A01	1,42	543	1115	4,5
	09A03	1,23	385	790	6,3
	09A07	1,33	321	660	7,6
	09A09	1,53	731	1500	3,3
	09A10	1,36	480	985	5,1
	09A12	1,4	275	565	8,8
	09A13	1,4	419	860	5,8
	09A17	1,56	560	1150	4,3
09A19	1,1	119	245	20,4	
09T01	1,28	358	735	6,8	
09T02	1,15	338	695	7,2	
09T03	1,15	239	490	10,2	
09T04	1,4	424	870	5,7	
09T05	1,3	209	430	11,6	
09T06	1,33	258	530	9,4	
09T07	1,4	409	840	6,0	
09T08	1,2	197	405	12,3	
09T09	1,16	241	495	10,1	
10T01	1,24	368	755	6,6	
10T02	1,15	219	450	11,1	
10T03	1,51	699	1435	3,5	
10T04	1,55	390	800	6,3	
février 2012	07A20	1,88	136	280	17,9
	07A37	1,81	75	154	32,4
	08A33	1,86	130	267	18,7
	08B01	1,67	158	324	15,4
	08B02	1,87	1346	2764	1,8
	09A03	2,03	153	314	15,9
	09A07	1,75	164	337	14,8
	09T02	1,82	501	1029	4,9
	09T07	1,9	96	198	25,3
	09T08	1,76	83	169	29,5
avril 2012	07A20	2,06	2237	4593	1,1
	07A37	2,03	2226	4571	1,1
	08A04	2,05	2090	4292	1,2
	08A33	2,08	2030	4168	1,2
	08B01	2,07	1986	4078	1,2
	08B02	2,11	2985	6129	0,8
	09A03	2,1	1846	3791	1,3
	09A07	1,91	263	540	9,3
	09A09	1,51	28	57	87,0
	09A10	2,09	2171	4458	1,1
	09A13	2,14	3129	6425	0,8
	09T01	2,05	1645	3378	1,5
	09T07	1,76	236	485	10,3
	09T08	1,89	396	813	6,1
10T02	1,98	2803	5756	0,9	
10T04	1,9	1501	3082	1,6	

Annexe 3 : Tableaux des résultats des sérotypes, Sequence Types et complexes clonaux pour toutes les souches étudiées.

		Souches	Sérotipe	ST	CC	Souches	Sérotipe	ST	CC
Souches pulmonaires adultes		07A01	V	158	19	08B01	la	23	23
		07A03	NT	19	19	08B02	III	19	19
		07A04	lb	8	10	08T01	la	23	23
		07A07	la	23	23	09A01	II	10	10
		07A09	la	23	23	09A03	II	358	10
		07A11	III	23	23	09A07	IV	<b>nx</b>	19
		07A17	la	23	23	09A09	lb	<b>nx</b>	10
		07A18	II	28	19	09A11	lb	8	10
		07A19	V	1	19	09A12	V	1	19
		07A20	V	361	10	09A13	lb	358	10
		07A21	V	<b>nx</b>	19	09A14	lb	8	10
		07A24	II	12	10	09A17	II	28	19
		07A25	II	2	19	09A18	la	23	23
		07A27	la	23	23	09A19	la	23	23
		07A32	III	19	19	09A21	III	17	17
		07A34	V	1	19	09A23	V	26	S
		07A35	lb	12	10	09A24	V	1	19
		07A36	V	1	19	09T01	la	23	23
		07A37	V	1	19	09T02	la	220	23
		08A01	II	2	19	09T03	lb	8	10
		08A03	V	1	19	09T04	lb	8	10
		08A04	la	24	S	09T05	lb	8	10
		08A05	la	23	23	09T06	lb	8	10
		08A06	V	1	19	09T07	la	<b>nx</b>	23
		08A09	V	1	19	09T08	lb	8	10
		08A10	lb	8	10	09T09	V	3	10
		08A12	V	1	19	10T01	III	17	17
		08A15	V	19	19	10T02	II	<b>nx</b>	S
		08A16	V	1	19	10T03	la	23	23
		08A19	la	23	23	10T04	III	17	17
		08A21	IV	196	19	10TL02	la	<b>nx</b>	23
		08A22	V	167	19	10TL04	la	23	23
		08A25	V	1	19	10TL05	III	17	17
	08A29	7	130	S	10TL08	la	1	19	
	08A30	V	1	19	10TL10	la	2	19	
	08A32	la	130	S	10TL11	lb	<b>nx</b>	10	
	08A33	III	146	17	11B02	la	23	23	

Souches néonatales LCR					Souches de portage vaginal				
	Souches	Sérotype	ST	CC		Souches	Sérotype	ST	CC
	L01	III	201	17		V04	Ia	314	226/314
	L02	III	17	17		V05	Ib	6	7
	L09	III	19	19		V07	Ib	12	10
	L10	III	19	19		V101	V	41	7
	L13	III	17	17		V104	III	28	19
	L14	III	19	19		V114	Ib	10	10
	L15	IV	196	19		V18	III	201	17
	L16	III	23	23		V20	III	315	17
	L17	III	195	S		V21	II	19	19
	L19	Ia	23	23		V23	NT	17	17
	L20	III	17	17		V24	IV	7	7
	L21	III	17	17		V25	NT	19	19
	L22	III	19	19		V64	III	17	17
	L23	III	17	17		V71	Ib	8	10
	L24	III	17	17		V80	II	12	10
	L29	III	19	19		V88	II	10	10
	L30	III	17	17		V-CNR-107	V	1	19
	L34	III	19	19		V-CNR-116	III	17	17
	L36	III	19	19		V-CNR-117	III	17	17
	L37	III	17	17		V-CNR-128	V	1	19
	L39	III	17	17		V-CNR-133	III	19	19
	L41	III	17	17		V-CNR-137	III	19	19
	L43	III	17	17		V-CNR-141	V	1	19
	L44	III	17	17		V-CNR-147	III	366	23
	L47	III	17	17		V-CNR-151	II	22	S
	L51	III	17	17		V-CNR-162	III	17	17
	L-CNR-1	III	17	17		V-CNR-178	III	23	23
	L-CNR-101	Ia	23	23		V-CNR-20	III	17	17
	L-CNR-102	Ia	23	23		V-CNR-204	V	1	19
	L-CNR-105	III	19	19		V-CNR-207	III	19	19
	L-CNR-120	III	17	17		V-CNR-216	III	19	19
	L-CNR-129	III	17	17		V-CNR-224	II	28	19
	L-CNR-130	III	17	17		V-CNR-225	Ib	10	10
	L-CNR-14	III	17	17		V-CNR-226	III	17	17
	L-CNR-149	III	17	17		V-CNR-235	V	1	19
	L-CNR-159	III	17	17		V-CNR-240	IV	196	19
	L-CNR-166	III	17	17		V-CNR-245	III	17	17
	L-CNR-184	III	17	17		V-CNR-266	III	17	17
	L-CNR-19	III	17	17		V-CNR-270	Ia	10	10
	L-CNR-197	III	17	17		V-CNR-272	II	28	19
	L-CNR-2	III	17	17		V-CNR-287	III	107	19
	L-CNR-34	III	17	17		V-CNR-29	III	17	17
	L-CNR-42	III	17	17		V-CNR-306	II	19	19
	L-CNR-44	III	17	17		V-CNR-309	II	28	19
	L-CNR-47	Ib	6	7		V-CNR-347	Ib	10	10
	L-CNR-52	III	17	17		V-CNR-349	Ia	23	23
	L-CNR-53	III	17	17		V-CNR-359	V	1	19
	L-CNR-61	III	17	17		V-CNR-360	III	19	19
	L-CNR-7	III	17	17		V-CNR-362	III	19	19
	L-CNR-78	III	17	17		V-CNR-364	V	1	19
	L-CNR-84	III	17	17		V-CNR-366	III	19	19
	L-CNR-87	III	17	17		V-CNR-44	III	17	17
	L-CNR-89	V	1	19		V-CNR-46	III	17	17
	L-CNR-92	Ib	8	10		V-CNR-51	V	1	19
	LJ01	III	19	19		V-CNR-54	V	1	19
	LJ04	III	19	19		V-CNR-56	IV	196	19
	LJ05	Ib	10	10		V-CNR-61	II	19	19
	LJ06	III	19	19		V-CNR-66	Ib	12	10
	LJ08	III	17	17		V-CNR-67	III	27	19
	G08	Ia	7	7		V-CNR-73	III	17	17
	G35	NT	197	19		V-CNR-8	III	17	17
	G49	III	17	17		V-CNR-80	IV	2	19
	G61	V	202	19		V-CNR-84	III	17	17
	G64	II	2	19		V-CNR-86	II	2	19
						V-CNR-87	Ia	7	7
						V-CNR-91	V	1	19
						V-CNR-96	V	26	S
						VV02	III	19	19
						VV04	III	19	19
						VV105	III	19	19
						VV188	III	19	19

	Souches	Sérotype	ST	CC
Souches hémocultures adultes	H01	III	17	17
	H02	NT	2	19
	H03	NT	186	19
	H04	Ib	12	10
	H05	III	17	17
	H06	III	23	23
	H07	II	10	10
	H08	III	17	17
	H09	V	131	19
	H10	Ib	10	10
	H11	NT	1	19
	H12	III	19	19
	H13	Ib	12	10
	H14	II	22	S
	H15	III	198	23
	H16	III	199	23
	H17	Ib	200	10
Souches bétail	N01	NT	300	300/303
	N02	II	301	17
	N03	NT	302	S
	N06	NT	303	300/303
	N07	III	19	19
	N08	II	64	17
	N09	V	26	S
	N10	II	63	17
	N11	Ib	304	7
	N12	III	305	23
	N13	NT	67	17
	N14	NT	250	19
	N15	NT	250	19
	N16	NT	67	17
	N17	II	301	17
	N18	Ia	7	7
	N19	NT	61	17
	N23	II	226	226/314
	N24	NT	306	19
	N25	III	61	17
	N26	III	307	S
	N27	II	2	19
	N28	NT	250	19
	N29	III	23	23
	N31	III	309	17
	N32	NT	85	S
	N33	III	310	17
	N34	III	311	23
	N35	NT	312	17
	N36	II	313	17
	N37	III	23	23
	N38	Ib	10	10
N39	NT	61	17	
N40	NT	301	17	
Souches référence	2603	V	110	19
	A909	Ia	7	7
	NEM316	III	23	23

## Annexe 4 : Nouveaux allèles et Sequence Type

### 07A21

Profil allélique : 87, 1, 2, 1, 1, 2, 2

### 09A07

Profil allélique : 5, 1, 3, 1, 1, 12, 2

### 09A09 adhP

```
CCAGGACGCATTTTGGGTCACGGAGGCATTGGTATAGTAGAAGAAATTGGAGAA
GGCGTAACGTCTTTGAGGGTTGGTGATCGTGTCTCTATTGCATGGTTCTTTGAA
GGATGCGGTCATTGCGAATACTGTACTACAGGACGTGAGACGCTTTGTCGTAGT
GTTAAAAATGCTGGATACAGTGTTGATGGTGGTATGAGTGAATACGCTATTGTTA
CCGCGGACTATGCGGTTAAGGTTCCCTGAGGGATTAGATCCAGCTCAAGCATCAT
CAATCACTTGTGCTGGAGTAACAACATACAAGGCTATCAAAGAAGCTGGAGCTG
CTCCTGGTCAGTGGATTGCAGTGTATGGTGCAGGTGGTCTTGAAACTTAGCAG
TCCAATATGCAAAAAAAGTATTCAATGCTCATGTTGTAGCTGTTGATATTAACGC
AGATAAACTTCAATTAGCTAAAGAGGTTGGAGCAGATTTGACAGTTAATGGCAA
GAAATAAAA
```

### 09T07 adhP

```
CCAGGACGCATTTTGGGTTACGAAGGCATTGGTATAGTAGAAGAAATTGGAGAA
GGCGTAACGTCTTTGAGGGTTGGTGATCGTGTCTCTATTGCATGGTTCTTTGAA
GGGTGCGGTCATTGCGAATACTGTACTACAGGACGTGAGACGCTTTGTCGTAGT
GTTAAAAATGCTGGATACAGTGTTGATGGTGGTATGAGTGAATACGCTGTCGTT
ACCGCGGACTATGCGGTTAAGGTTCCCTGAGGGATTAGATCCAGCTCAAGCATCA
TCAATCACTTGTGCTGGAGTAACAACATACAAGGCTATCAAAGAAGCTGGAGCT
GCTCCTGGTCAGTGGATTGCAGTGTATGGTGCAGGTGGTCTTGAAACTTAGCA
GTCCAATATGCAAAAAAAGGTATTCAATGCTCATGTTGTAGCTGTTGATATTAACG
CAGATAAACTTCAATTAGCTAAAGAGGTTGGAGCAGATTTGACAGTTAATGGCAA
AGAAATAAAA
```

### 10T02 atr

```
GGCATTGACTTGGATATTCATCAAGGAGAAGTAGTGGTATTATTGGCCCTTCTG
GCTCTGGTAAGTCAACATTTTTAAGAACAATGAATCTCTTGGAAGTACCAACAAA
GGGAACAGTGACTTTTGAAGGGATTGATATAACAGACAAAAAGAATGATATTTTT
AAAATGCGTGAAAAAATGGGCATGGTTTTTCAACAGTTCAATCTATTTCCCAATA
TGACTGTACTAGAAAATATTACTTTATCACCTATTAAGACAAAGGGGCTTTCTAAT
CTTGATGCTCAGACAAAAGCATATGAGCTACTTGAAAAAGTTGGACTCAAAGAG
AAGGCTAATACTTATCCAGCTAGCTTATCTGGAGGACAACAACAACGAATTGCTA
TTGCAAGAGGTCTTGCAATGAATCCTGATGTCCTTCTTTTTGATGAACCTACTTC
AGCTCTTGATCCTGAAATGGTAGGTGAAGTCTTGACTGTTATGCAAGATTTAGCT
AAATCT
```

10TL02 sdhA

GAAATGACTGGTAGAAGTCGTGAAGAAATTCGTTATATTATGTCCCGAAATCTTG  
AAGTCATGAAAGCTTCTGTTATTGATGGATTAACCCCTAGTAAATCAATCAGTGG  
TTAACAGGCGGTGATGCTGTCAAGATGGATCAATATTTACAATCAGGAAAACT  
ATTTACAGATACCACAATCCTAGCTGCCGTTAGGAATGCTATGGCTGTTAATGAGT  
TAAATGCTAAGATGGGACTGGTCTGTGCAACACCAACTGCAGGTAGTGCAGGAT  
GTTTACCAGCTGTGATTTCTACAGCCATTGAAAAGCTTAATTTAACAGAAGAAGA  
GCAACTTGATTTTCTATTTACAGCCGGCGCATTGTTGGTCTCGTCATTGGTAATAAT  
GCCTCTATCTCAGGTGCAGAAGGAGGTTGCCAAGCTGAAGTTGGATCAGCTAGT  
GCTATGGCTGCGGCTGCTTTAGTTATGGCTGCTGGAGGTACTIONCCTTTCCAAGCT  
AGCCAAGCTATAGCATTGTTATTTAA

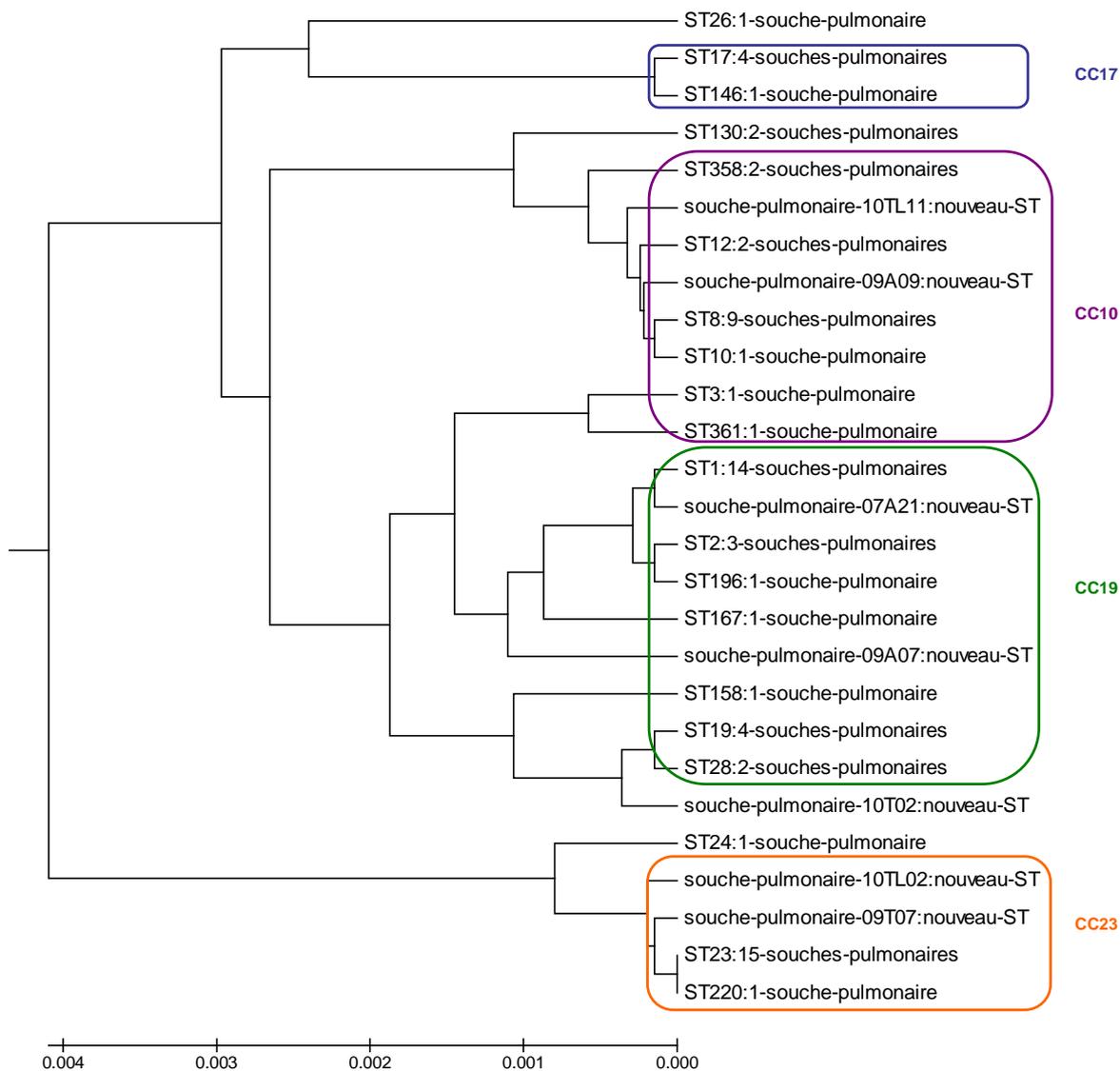
10TL11 sdhA

GAAATGACTGGTAGAAGTCGTGAAGAAATTCCTTTATATTATGTCCCGAAACCTTG  
AAGTTATGAAAGCTTCTGTTATTGATGGATTAACCTCTAGTAAATCAATCAGTGG  
CTTAACAGGCGGTGATGCTGTCAAGATGGATCAATATTTACAATCAGGAAAACT  
ATTTACAGATACCACAATCCTAGCTGCCGTTAGGAATGCTATGGCTGTTAATGAGT  
TGAATGCTAAGATGGGACTGGTCTGTGCAACACCAACTGCAGGTAGTGCAGGAT  
GTTTACCAGCCGTGATTTCTACAGCCATTGAAAAGCTTAATTTAACAGAAGAAGA  
GCAACTTGATTTTCTATTTACAGCCGGCGCATTGTTGGTCTCGTCATTGGTAATAAT  
GCCTCTATCTCAGGTGCAGAAGGAGGTTGCCAAGCTGAAGTTGGGTCAGCTAG  
TGCTATGGCTGCGGCTGCTTTAGTTATGGCTGCTGGAGGTACTIONCCTTTCCAAGC  
TAGCCAAGCTATAGCATTGTTATTTAA

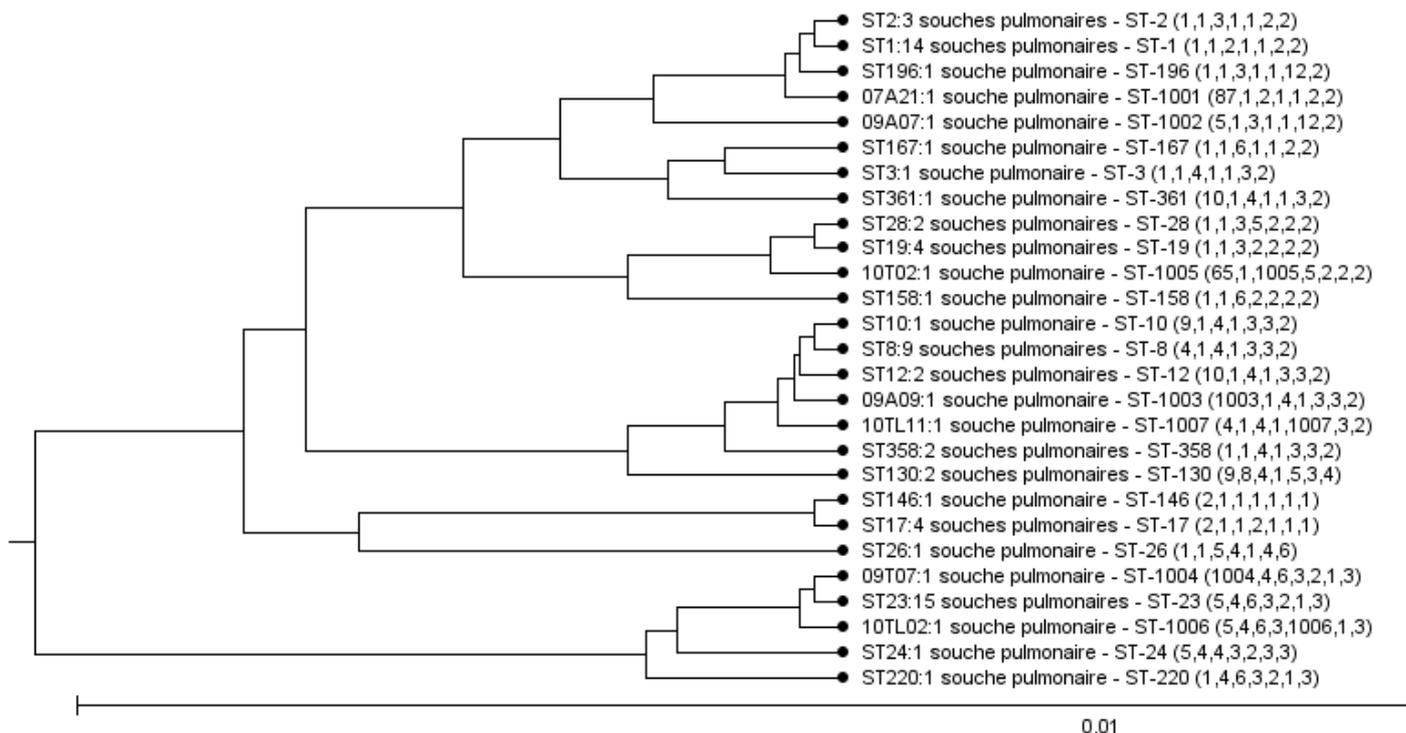
Annexe 5 : Tableaux des résultats de tous les Sequence Types des souches d'origine pulmonaire

ST	nb	%
23	15	20,3
1	14	18,9
8	9	12,2
17	4	5,4
19	4	5,4
2	3	4,1
12	2	2,7
28	2	2,7
130	2	2,7
358	2	2,7
3	1	1,4
10	1	1,4
24	1	1,4
26	1	1,4
146	1	1,4
158	1	1,4
167	1	1,4
196	1	1,4
220	1	1,4
361	1	1,4
nx	7	9,5

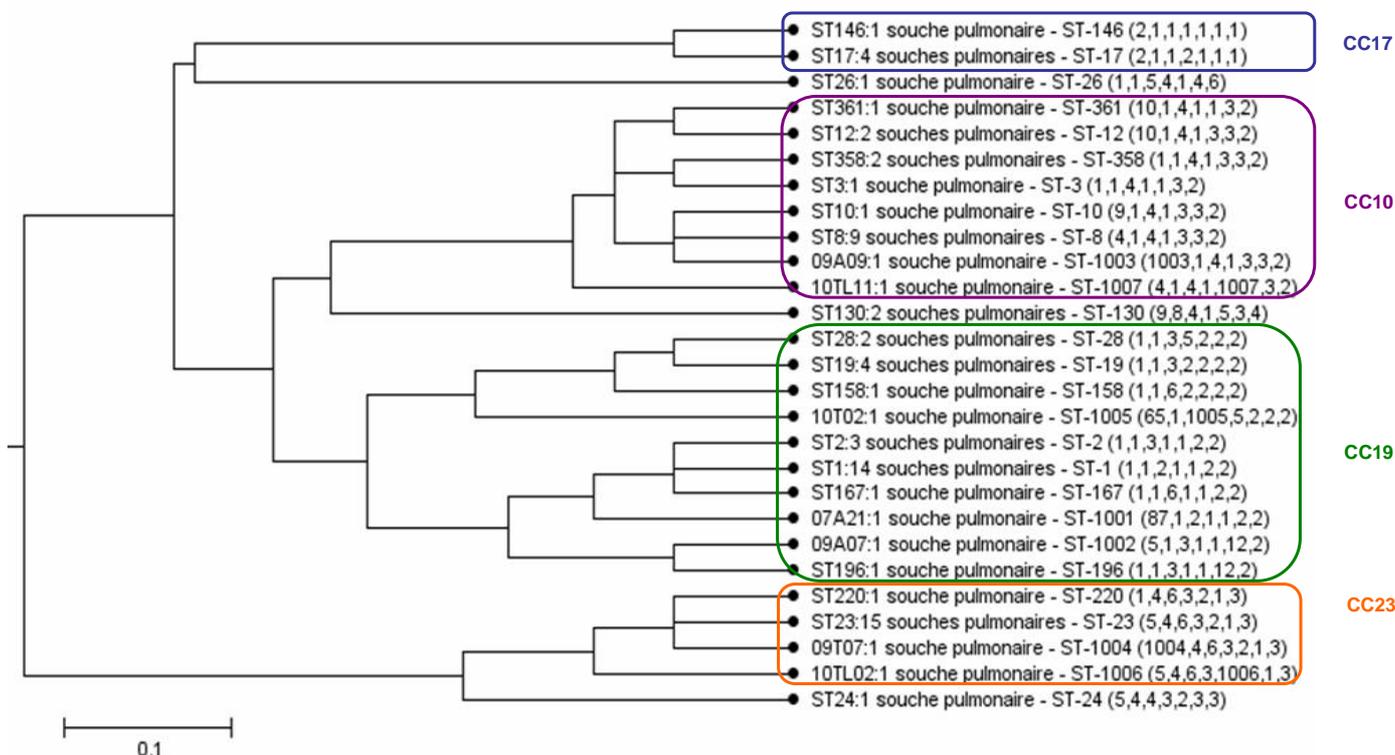
## Annexe 6 : Arbres phylogénétiques



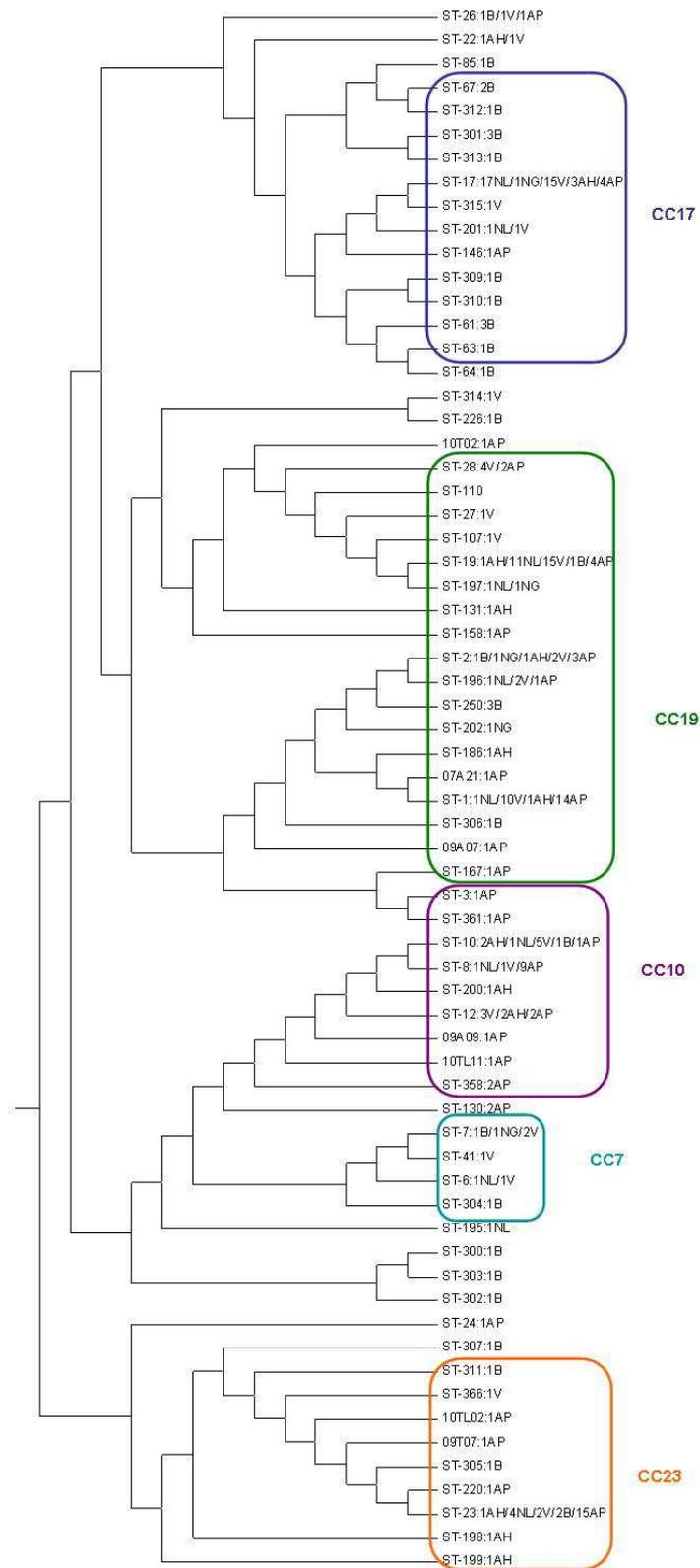
Arbre phylogénétique représentant les souches d'origine pulmonaire, réalisé à partir du supergène avec la méthode UPGMA sur le logiciel MEGA.



Arbre phylogénétique représentant les souches d'origine pulmonaire, réalisé à partir du supergène avec la méthode UPGMA sur le logiciel START.



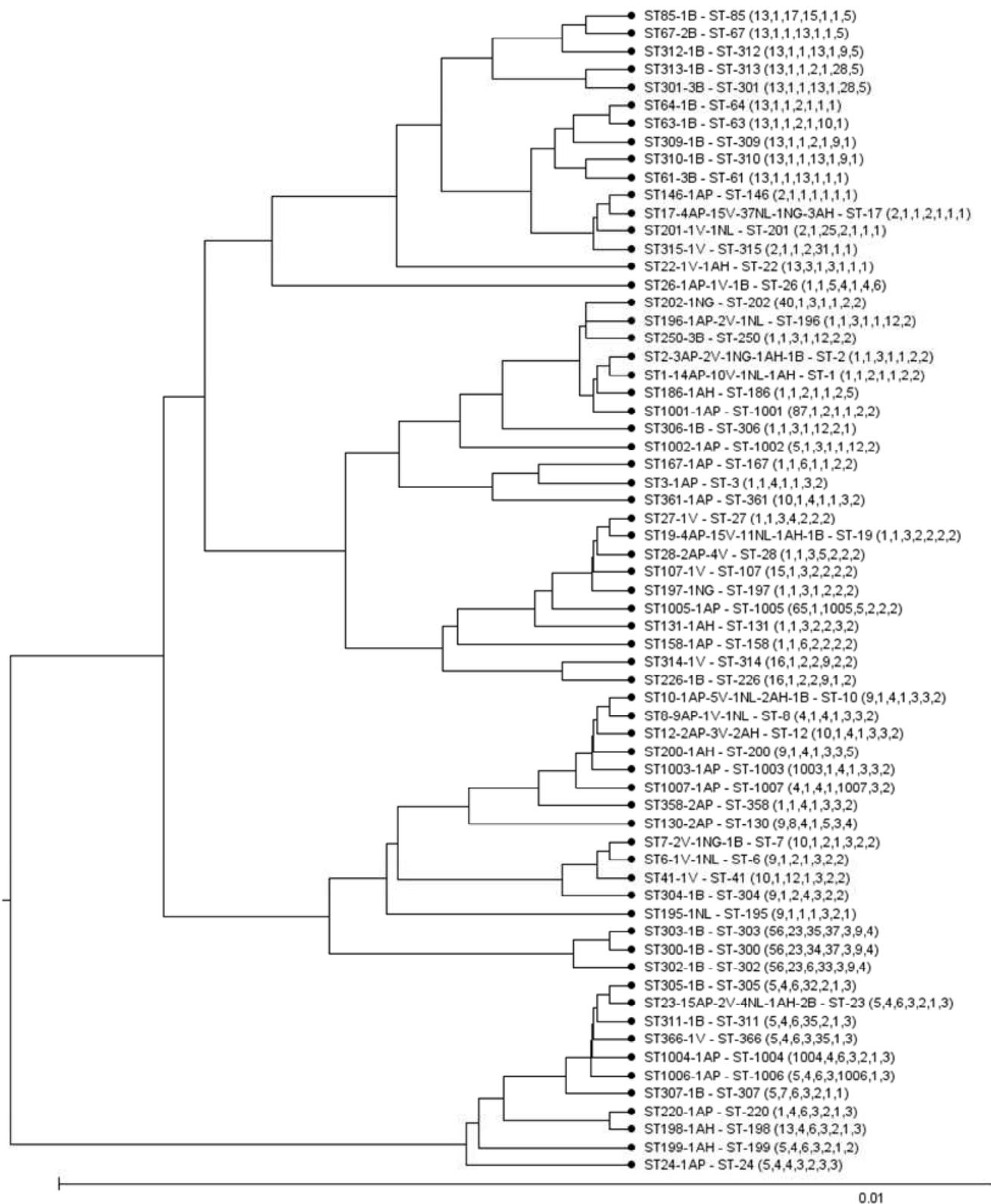
Arbre phylogénétique représentant les souches d'origine pulmonaire, réalisé à partir des données de profils avec la méthode UPGMA sur le logiciel START.



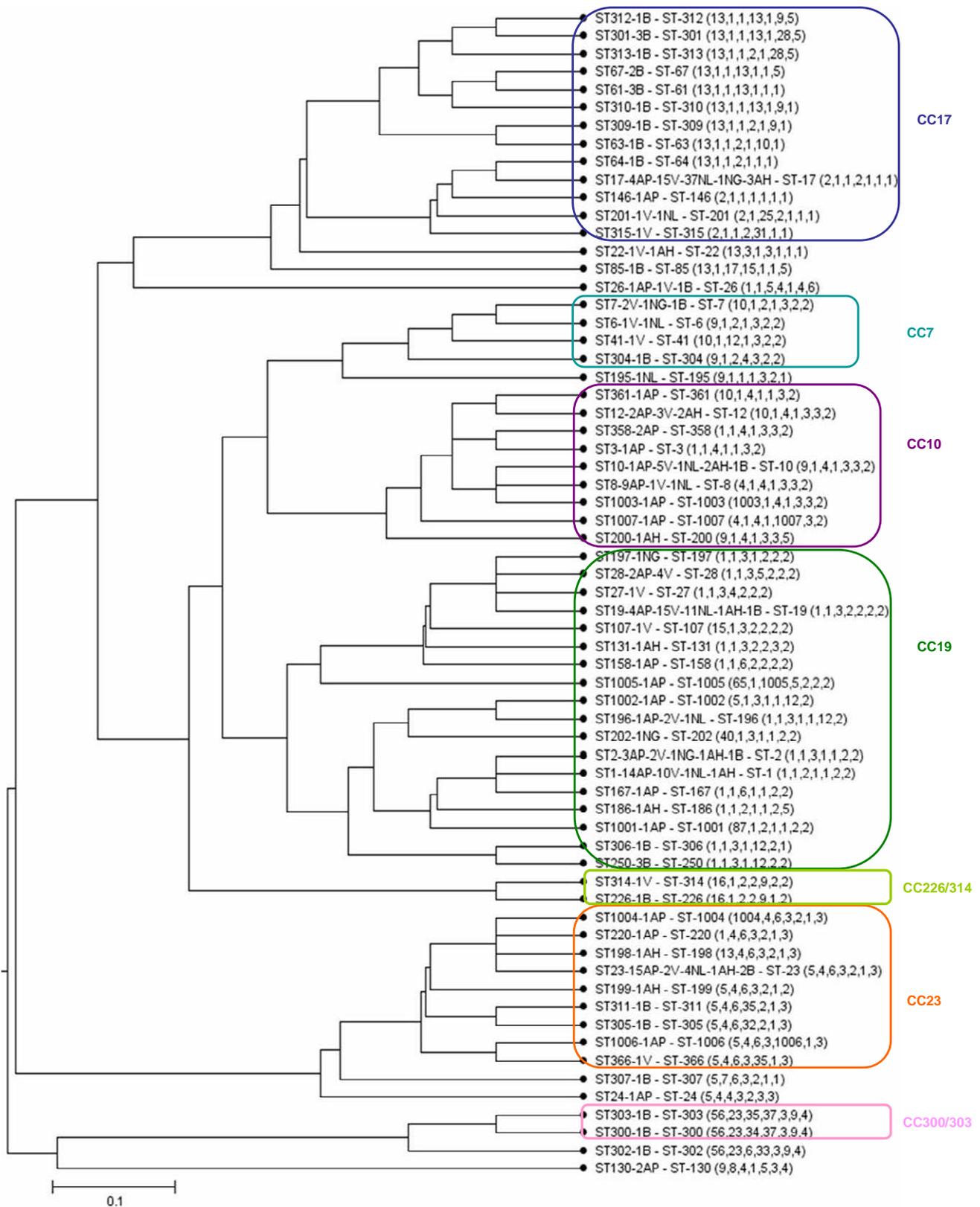
Origine des souches :

- AP : Adulte Pulmonaire
- AH : Adulte Hémoculture
- V : portage Vaginal
- NL : Néonatale LCR
- NG : Néonatale Gastrique
- B : Bovine

Arbre phylogénétique représentant toutes les souches, réalisé à partir du supergène avec la méthode UPGMA sur le logiciel MEGA.



Arbre phylogénétique représentant toutes les souches, réalisé à partir du supergène avec la méthode UPGMA sur le logiciel START.



Arbre phylogénétique représentant toutes les souches, réalisé à partir des données de profils avec la méthode UPGMA sur le logiciel START.

**Résumé :**

*Streptococcus agalactiae* ou streptocoque du groupe B est une bactérie fréquemment en cause dans les infections materno-fœtales et néonatales dans les pays développés. Il apparaît également comme un pathogène émergent dans les infections chez les personnes âgées depuis deux décennies. Chez le nouveau-né, l'utilisation de différentes méthodes génomiques a montré l'existence de clones à plus haut risque infectieux. Dans certaines infections des sujets adultes, il a également été montré une plus forte prévalence de certains clones.

L'objectif de notre travail était de savoir si les souches de streptocoque du groupe B d'origine pulmonaire constituaient un clone spécifique au sein de l'espèce. Dans cette perspective, 74 souches de streptocoque du groupe B isolées de prélèvements pulmonaires ont été analysées. Ces souches ont été isolées chez des patients adultes hospitalisés dans 4 CHU entre 2007 et 2011. Les souches ont été caractérisées par sérotypage capsulaire moléculaire et par MultiLocus Sequence Typing.

Notre travail montre que les souches de streptocoque du groupe B d'origine pulmonaire ne constituent pas un groupe spécifique. Ces souches sont principalement de sérotype V, Ia et Ib et appartiennent majoritairement aux complexes clonaux CC19, CC10 et CC23. Cette distribution est différente des souches impliquées en pathologie infectieuse néonatale, qui sont de sérotype III et Ia et appartiennent surtout au CC17. En revanche, cette distribution est proche des souches de streptocoque du groupe B impliquées dans d'autres types d'infections du sujet adulte. Par ailleurs, les souches présentes en portage pharyngé appartiennent également aux CC19, CC10 et CC23, ce qui suggère une voie descendante de colonisation.

**Mots clés :**

*streptococcus agalactiae* - infections chez l'adulte - MLST - sérotype -

**Jury :**

Président : Monsieur le Professeur Laurent MEREGHETTI  
Membres : Monsieur le Professeur Francis BARIN  
Monsieur le Professeur Louis BERNARD  
Monsieur le Docteur Philippe LANOTTE  
Madame le Docteur Gaëlle BATY

**Date de la soutenance :** 2 mai 2013