# UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

# DE TOURS

***ÉCOLE DOCTORALE : Santé, Sciences, Technologies***

**E.A. 3854 - BACTERIES ET RISQUE MATERNO-FOETAL**

# THÈSE présentée par :


## Rim AL SAFADI


soutenue le : **16 décembre 2010**

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

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Infectiologie, Vaccinologie

# IMPACT D'ÉLÉMENTS GÉNÉTIQUES VARIABLES SUR L'EXPRESSION DE QUATRE GÈNES DE VIRULENCE CHEZ *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

**THÈSE dirigée par :**

| | |
|---|---|
| **Mme ROSENAU Agnès** | Professeur des Universités, Université François – Rabelais, Tours |

**RAPPORTEURS :**

| | |
|---|---|
| **Mme DRAMSI Shaynoor** | Chargée de Recherche, HDR, Institut Pasteur, Paris |
| **M. ROUSSEAU Philippe** | Maître de Conférence, HDR, Université Paul Sabatier, Toulouse III |

---

**JURY :**

| | |
|---|---|
| **M. BURUCOA Christophe** | Professeur des Universités, Université de Poitiers |
| **Mme DRAMSI Shaynoor** | Chargée de Recherche, HDR, Institut Pasteur, Paris |
| **M. GERMON Pierre** | Chargé de Recherche, HDR, INRA, INRA de Tours-Nouzilly |
| **M. QUENTIN Roland** | Professeur des Universités, Université François – Rabelais, Tours |
| **Mme ROSENAU Agnès** | Professeur des Universités, Université François – Rabelais, Tours |
| **M. ROUSSEAU Philippe** | Maître de Conférence, HDR, Université Paul Sabatier, Toulouse III |

# *Remerciements*

*Ce travail est le fruit d'une « aventure » de plus de 3 ans, qui n'aurait pas pu voir le jour sans le soutien de nombreuses personnes que je tiens à remercier ici.*

*Je remercie en premier lieu ma responsable de thèse, Mme Agnès Rosenau, merci pour ta disponibilté, ton amitié, ton soutien, ton appui constant. Tu m'as apporté tes conseils et surtout ta confiance ainsi qu'une liberté de décision. Tu as toujours été attentive à mon avis. Et ça je sais que c'est pas donné à tous les thésards. Je suis très heureuse d'avoir pu bénéficier de ton encadrement.*

*Je désire adresser toute ma gratitude à M. Roland Quentin, je n'oublierai pas nos discussions scientifiques, et vos précieux conseils.*

*Merci vivement à l'ensemble des membres du jury, Mme Shaynoor Dramsi, M. Philippe Rousseau, M Christophe Burucoa, M. Pierre Germon, M. Roland Quentin pour le temps consacré à l'evaluation de ce travail.*

*Je tiens aussi à remercier les membres de l'équipe EA 3854 « Bactéries et risque materno-fœtal à savoir, Philippe Gilot, Laurent Mereghetti, et Philippe Lanotte et tout particulièrement Marie-Frédérique Lartigue que j'ai côtoyée chaque jour, et qui a rendu ces trois années de travail plus faciles. Merci Frédérique pour les nombreuses discussions scientifiques (ou pas !), tes conseils, ta gentillesse et ton soutien inconditionnel.*

*Merci Daniel pour ton aide, ta bonne humeur, ta patience et pour avoir supporté ma conception assez personnelle du rangement.*

*Je remercie mille fois M. Michel Aigle de l'Université Claude Bernrd Lyon 1 de l'équipe Génétique Moléculaire des Levures UMR5240, où j'ai passé deux années riches d'enseignements et de découvertes sous ta direction.*

*Je remercie enfin mes parents de m'avoir encouragée, de m'avoir toujours soutenue sans fin, ainsi que mes frères et sœurs.*

# Résumé

*Streptococcus agalactiae*, bactérie commensale des voies génito-urinaires et du tractus digestif de l'Homme, est impliqué dans des infections sévères en particulier chez le nouveau-né, mais aussi chez l'adulte. Les infections sont pour la plupart dues à des souches appartenant à un nombre limité de lignées phylogénétiques et les transferts génétiques horizontaux jouent vraisemblablement un rôle important dans l'évolution adaptative de l'espèce et l'émergence de clones à haut risque infectieux.

*S. agalactiae* adhère aux tissus et les envahit via différents mécanismes faisant intervenir diverses protéines telles que Lmb, ScpB, FbsA et FbsB qui permettent respectivement une fixation à la laminine, à la fibronectine et au fibrinogène. Notre travail a porté sur la détermination de l'impact d'éléments génétiques variables sur l'expression des gènes de virulence *lmb*, *scpB*, *fbsA* et *fbsB*.

La région intergénique *scpB-lmb* est un site d'insertion fréquent de deux éléments génétiques mobiles (EGM), la séquence d'insertion IS*1548* ou l'intron du groupe II GBSi1. Dans la première partie du travail, nous avons étudié l'impact de ces EGM sur l'expression des gènes *lmb* et *scpB*. Nous avons analysé la structure de la région intergénique *scpB-lmb* dans une collection de 111 souches représentant la diversité génétique de l'espèce. Vingt six souches représentant les trois configurations génétiques trouvées (avec IS*1548*, avec GBSi1, ou sans EGM) ont été ensuite sélectionnées pour quantifier la transcription des gènes *lmb* et *scpB*, la capacité de liaison des bactéries à la laminine et à la fibronectine humaines, et la protéine Lmb exprimée à la surface bactérienne. Ainsi, nous avons montré que i) la présence d'EGM n'a pas d'influence sur l'expression du gène *scpB* ; ii) l'expression du gène *lmb* est significativement plus élevée chez les souches possédant IS*1548* entre les gènes *scpB* et *lmb* ; iii) la structure de la région intergénique *scpB-lmb* est corrélée à la distribution phylogénétique des souches, la présence d'IS*1548* caractérisant le complexe clonal (CC) 19. Un mutant de délétion d'IS*1548* d'une souche de CC19 a ensuite été construit, et en comparant ses propriétés à celles de la souche parentale, nous avons démontré le rôle d'IS*1548* dans la surexpression du gène *lmb*. Enfin, nous avons identifié un promoteur potentiel porté par l'IS*1548* qui pourrait être responsable de la surexpression du gène *lmb*. Cette surexpression pourrait contribuer à la virulence particulière de certaines souches de CC19 et de sérotype capsulaire III responsables de méningites néonatales et d'endocardites.

Dans la deuxième partie du travail, nous avions pour objectif d'analyser la forte capacité de liaison au fibrinogène des souches du clone CC17 hyper invasif pour le nouveau-né, par rapport aux souches des autres lignées. Nous avons déterminé dans un premier temps la prévalence et la diversité des gènes *fbsA* et *fbsB* ainsi que de leurs gènes régulateurs (*rogB* codant pour un activateur du gène *fbsA*, *rovS* codant pour un répresseur du gène *fbsA* et *rgf* codant pour un système à deux composants [TCS] dont le rôle sur les gènes *fbs* n'a pas encore été étudié) dans une collection de 134 souches représentant les principales lignées phylogénétiques de l'espèce. Des combinaisons variées de gènes en fonction des lignées ont été mises en évidence. Ainsi, seules les souches de CC17 possèdent à la fois les gènes *fbsA*, *fbsB* et *rgf*. La construction de mutants de délétion non polaires des gènes *rgfAC* de trois souches de CC17 nous a permis dans un second temps de montrer que RfgA/C inhibe le gène *fbsA* et active le gène *fbsB*. Enfin, nous avons construit des mutants de délétion des gènes *fbsA* et *fbsB* de ces trois souches et en comparant leurs propriétés à celles des souches parentales, nous avons montré que la protéine FbsB joue un rôle majeur dans la capacité de liaison au fibrinogène des souches de CC17. Au total, nos résultats montrent que la combinaison spécifique de gènes *fbs* et de leurs gènes régulateurs chez les souches de CC17 peut expliquer leur forte capacité à se lier au fibrinogène et pourrait ainsi contribuer à l'invasion du système nerveux central du nouveau-né par ces souches par rapport aux souches de *S. agalactiae* des autres lignées.

Mots-clés : *Streptococcus agalactiae*, virulence, *lmb*, *scpB*, *fbsA*, *fbsB*, IS*1548*, GBSi1, *rgf*, laminine, fibrinogène

# Abstract

*Streptococcus agalactiae*, a commensal bacterium of the genito-urinary and digestive tracts in humans, is involved in serious infections especially among neonates, but also in adults. Infections are mostly caused by strains belonging to a limited number of phylogenetic lineages and the horizontal gene transfer seems to play an important role in the adaptive evolution of the species and in the emergence of clones with high risk of infection.

*S. agalactiae* adheres to and invades tissues through different mechanisms that involve proteins such as Lmb, ScpB, FbsA, and FbsB, which respectively allow attachment to laminin, fibronectin, and fibrinogen. Our work has focused on determining the impact of variable genetic elements on the expression of *lmb*, *scpB*, *fbsA*, and *fbsB* virulence genes.

The *scpB-lmb* intergenic region is a site of insertion of two mobile genetic elements (MGEs), the insertion sequence IS*1548* or the group II intron GBSi1. In the first part of the work we studied the impact of these MGEs on the expression of *scpB* and *lmb* genes. We analyzed the structure of the *scpB-lmb* intergenic region in a collection of 111 strains representing the genetic diversity of the species. Twenty-six strains representing the three genetic patterns found (with IS*1548*, with GBSi1, without MGE) were selected to determine the level of *scpB* and *lmb* genes transcription, the ability to bind to human laminin and fibronectin, and the amount of Lmb protein expressed on the bacterial cell surface. Thus, we showed that i) the presence of MGE had no influence on the expression of *scpB* gene; ii) the expression of *lmb* gene was significantly higher in strains with IS*1548* between *scpB* and *lmb* genes; and iii) the structure of the *scpB-lmb* intergenic region correlated with phylogenetic lineages, IS*1548* charaterizing the clonal complex (CC)19. A deletion mutant of IS*1548* was then constructed in a CC19 strain, and by comparing its properties with those of the parental strain, we confirmed the role of IS*1548* in the overexpression of the *lmb* gene. Finally, we identified a potential promoter carried by the IS*1548* that could be responsible for the *lmb* gene overexpression. This overexpression could contribute to the virulence of particular strains of CC19 and of capsular serotype III responsible for neonatal meningitis and endocarditis.

In the second part of the work, we analyzed the strong fibrinogen-binding ability of strains of the hyperinvasive clone for neonates, CC17, as compared to strains of the other lineages. We first determined the prevalence and the diversity of the *fbsA* and *fbsB* genes and of their regulator genes (*rogB* encoding an *fbsA* activator, *rovS* encoding an *fbsA* repressor, and *rgf* encoding a two-component system [TCS] whose role on *fbs* genes was not determined yet) in a collection of 134 strains representing the major phylogenetic lineages of the species. We showed that specific gene combinations were related to particular genetic lineages; indeed only CC17 strains contained the *fbsA*, *fbsB*, and *rgf* genes combination. We then constructed non polar *rgfAC* deletion mutants of three CC17 strains and demonstrated that RgfA/C inhibits the *fbsA* gene and activates the *fbsB* gene. Finally, we constructed deletion mutants of *fbsA* and *fbsB* genes of these three CC17 strains, and by comparing their fibrinogen-binding abilities with those of the parental strains, we demonstrated that the FbsB protein plays the major role in the ability of CC17 strains to bind to human fibrinogen. Thus, our results show that a specific combination of *fbs* genes and *fbs* regulator genes may account for the high fibrinogen-binding ability of CC17 strains that may participate to their enhanced invasiveness for the central nervous system of neonates as compared to strains of other lineages.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, virulence, *lmb*, *scpB*, *fbsA*, *fbsB*, IS*1548*, GBSi1, *rgf*, laminin, fibrinogen.

# Table des matières

**INTRODUCTION** ..... **1**

**REVUE DE LA LITTERATURE** ..... **4**

***I- Epidémiologie de Streptococcus agalactiae*** ..... ***5***

**I.1 *S. agalactiae* chez le bovin** ..... **5**

**I.2 *S. agalactiae* chez l'homme** ..... **6**

**I.2.1 Le portage** ..... 6

**I.2.1.1 Portage vaginal chez la femme enceinte** ..... 6

**I.2.1.2 Colonisation du nouveau-né** ..... 6

**I.2.1.3 Portage chez l'adulte (en dehors de la femme enceinte)** ..... 7

**I.2.2 Les infections à *S. agalactiae*** ..... 8

**I.2.2.1 Infections chez la femme enceinte** ..... 8

**I.2.2.2 Infections néonatales** ..... 8

**I.2.2.3 Prévention et traitement des infections néonatales** ..... 9

**I.2.2.4 Infections chez l'adulte (hors infections maternelles)** ..... 10

***II- Marqueurs épidémiologiques*** ..... ***11***

**II.1 Caractérisation de *S. agalactiae* par des méthodes phénotypiques** ..... **12**

**II.1.1 La sérotypie** ..... 12

**II.1.2 La lysotypie** ..... 13

**II.1.3 Electrophorèse des isoenzymes métaboliques : Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)** ..... 13

**II.2 Caractérisation de *S. agalactiae* par des méthodes génotypiques** ..... **14**

**II.2.1 Profils de restriction de l'ADN génomique total : Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)** ..... 15

**II.2.2 Amplification aléatoire de différentes parties du génome : Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)** ..... 15

**II.2.3 Electrophorèse en champ pulsé : Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)** ..... 16

**II.2.4 Amplification-séquençage pour l'étude du polymorphisme multilocus : Multi- Locus Sequence Typing (MLST)** ..... 16

***III- Génome de S. agalactiae*** ..... ***19***

***IV- Pathogénie des infections à S. agalactiae*** ..... ***20***

**IV.1 Rôle de l'hôte dans la virulence de *S. agalactiae*** ..... **20**

**IV.1.1 Le complément** ..... 20

**IV.1.2 Les immunoglobulines** ..... 21

**IV.1.3. Les cellules phagocytaires** ..... 21

**IV.2 Facteurs de virulence de *S. agalactiae*** ..... **22**

**IV.2.1 La capsule** ..... 22

**IV.2.2. Les produits du locus *cyl*** ..... 23

**IV.2.2.1 La ß-Hémolysine/cytolysine (ß-H/C)** ... 23
**IV.2.2.2 Le pigment ß-caroténoïde** ... 24
**IV.2.3 Le facteur CAMP** ... 24
**IV.2.4 La hyaluronate lyase** ... 25
**IV.2.5 La protéine SodA** ... 25
**IV.2.6 La protéine C** ... 25
**IV.2.7 La protéine Rib** ... 26
**IV.2.8 La protéine Srr** ... 27
**IV.2.9 La protéine BibA** ... 28
**IV.2.10 Les acides lipoteichoiques** ... 28
**IV.2.11 La protéine ScpB ou C5a peptidase** ... 29
**IV.2.12 La protéine Lmb** ... 30
**IV.2.13 Les protéines de liaison au fibrinogène** ... 31
**IV.2.13.1 La protéine FbsA** ... 31
**IV.2.13.2 La protéine FbsB** ... 32
**IV.2.14 Les pili** ... 34
***V- Systèmes de régulation transcriptionnelle*** ... ***35***
**V.1 Les facteurs σ** ... **36**
**V.2 Les régulateurs transcriptionnels (stand alone or one component regulator)** ... **36**
**V.2.1 RovS** ... 37
**V.2.2 RogB** ... 38
**V.2.3 Rga** ... 38
**V.2.4 MtaR** ... 39
**V.3 Les systèmes à deux composants** ... **39**
**V.3.1 CovSR** ... 39
**V.3.2 RgfAC** ... 40
**V.3.3 Autres TCS** ... 41
**V.4 Les systèmes de signalisation de type eucaryote** ... **41**
***VI- Eléments génétiques mobiles*** ... ***42***
**VI.1 Les séquences d'insertion** ... **42**
**VI.1.1 L'IS*861*** ... 44
**VI.1.2 L'IS*1381*** ... 44
**VI.1.3 L'IS*1548*** ... 45
**VI.1.4 L'IS*Sa4*** ... 46
**VI.1.5 L'IS*Sag2*** ... 46
**VI.1.6 L'IS*Sag1*** ... 47
**VI.2 Les transposons composites** ... **47**
**VI.3 Les transposons intégratifs conjugatifs et autres transposons dérivés** ... **47**
**VI.4 L'intron de groupe II (GBSi1)** ... **48**
**VI.5 Les îlots génomiques et les îlots de pathogénicité** ... **49**
***VII- Prévention des infections à S. agalactiae*** ... ***49***
**VII.1 Antibioprophylaxie** ... **50**
**VII.1.1 Résistance de *S. agalactiae*** ... 50

**VII.1.2 Emergence de bactéries à Gram négatif résistantes et d'infections néonatales à ces germes** ... 51
**VII.2 Vaccination** ... **51**

**PARTIE EXPERIMENTALE** ... **54**

**PARTIE 1. ACTIVATION DU GENE *LMB* PAR LA SEQUENCE D'INSERTION IS*1548* SITUEE DANS LA REGION INTERGENIQUE *SCPB-LMB*** ... **55**

***A-Introduction*** ... ***56***
***B-Matériel et Méthodes*** ... ***59***
**1. Souches bactériennes** ... **60**
**2. Extraction de l'ADN génomique** ... **61**
**2.1. Extraction de l'ADN** ... 61
**2.2. Dosage des ADN** ... 61
**3. Amplification par polymérisation en chaine (PCR)** ... **61**
**3.1 Amplification par PCR en point final des gènes *lmb* et *scpB* ainsi que de la région intergénique *scpB-lmb*** ... 62
**3.2 Amplification par PCR en point final de l'ADNc du gène *lmb*.** ... 63
**4. Construction de mutants de délétion** ... **63**
**4.1 Préparation des cellules électrocompétentes et protocole d'électroporation** ... 63
4.1.1 *E.coli* DH5α. ... 63
4.1.2 *S. agalactiae* ... 64
**4.2 Clonage dans le vecteur pG$^+$host5** ... 65
**4.3 Recombinaison homologue** ... 67
**5. Traitement des ARN** ... **67**
**5.1 Extraction des ARN** ... 67
**5.2 Obtention d'ADN complémentaire par transcription inverse** ... 68
**5.3 Quantification des ADNc par PCR en temps réel** ... 69
5.3.1 Principe ... 69
5.3.2 Conditions et protocole ... 69
**6. Liaison des bactéries aux protéines** ... **71**
**6.1 Immobilisation des protéines et préparation des inoculums bactériens** ... 71
**6.2 Test de liaison à la fibronectine et à la laminine** ... 71
**7. Quantification de la protéine Lmb par la méthode ELISA** ... **72**
**8. Quantification de la protéine Lmb par Western blot.** ... **73**
**9. Caractérisation génétique des souches par multilocus sequence typing (MLST)** ... **73**
**9.1 Principe** ... 73
**9.2 Amplification des gènes de ménage** ... 74
**9.3 Purification des produits de PCR** ... 75
**9.4 Séquençage des produits de PCR** ... 75
**9.5 Analyse *in silico*** ... 75
9.5.1 Analyse des séquences nucléotidiques ... 75
9.5.2 Assignement des allèles et des profils alléliques ... 76
**10. Analyses statistiques** ... **76**
***C-Résultats*** ... ***77***

**1. Prévalence des gènes *lmb* et *scpB*** ..... **78**
**2. Eléments génétiques mobiles (EGM) entre les gènes *lmb* et *scpB*** ..... **78**
**3. Structure génétique de la population** ..... **78**
**4. Distribution des éléments génétiques mobiles au sein des lignées clonales** ..... **79**
**5. Confrontation entre complexes clonaux, structure intergénique *scpB-lmb*, sérotypes et origines cliniques des souches** ..... **79**
**6. Détermination de l'impact de la structure de la région intergénique scpB-lmb sur le niveau d'expression des gènes *scpB* et *lmb*** ..... **81**
**6.1 Quantification des transcrits des gènes *scpB* et *lmb*** ..... 81
**6.2 Liaison de souches de *S. agalactiae* à la fibronectine et la laminine humaines immobilisées** ..... 82
**6.3 Quantification de la protéine Lmb à la surface de la cellule bactérienne.** ..... 82
**7. Propriétés de mutants délétés d'IS*1548* dans la région intergénique *scpB-lmb*** ..... **83**
**8. Mécanisme d'activation du gène *lmb* par IS*1548*** ..... **83**
**8.1 Identification de boîtes promotrices potentielles** ..... 83
**8.2 Détermination de la taille approximative de la région transcrite non traduite (UTR) en 5' du gène *lmb*** ..... 84
***D-Discussion*** ..... ***86***
**PARTIE 2. LIAISON AU FIBRINOGENE DES SOUCHES DE CC17.** ..... **91**
***A-Introduction*** ..... ***92***
***B-Matériel et Méthodes*** ..... ***95***
**1. Souches bactériennes** ..... **96**
**2. Extraction de l'ADN** ..... **96**
**3. Prévalence des gènes de liaison au fibrinogène et de leurs gènes régulateurs** ..... **97**
**4. Construction des mutants de délétion** ..... **97**
**4.1 Clonage dans le vecteur pG$^+$host5** ..... 98
**4.2 Recombinaison homologue** ..... 99
**5. Traitement des ARN** ..... **100**
**6. Liaison des bactéries au fibrinogène** ..... **100**
**6.1 Immobilisation des protéines et préparation des inoculums bactériens** ..... 100
**6.2 Test de liaison au fibrinogène** ..... 101
***C-Résultats*** ..... ***102***
**1. Prévalence des gènes *fbs* et de leurs gènes régulateurs au sein des souches de CC17 et des souches appartenant aux principales autres lignées phylogénétiques** ..... **103**
**2. Effet du locus *rgf* sur l'expression des gènes *fbsA* et *fbsB*** ..... **104**
**2.1 Quantification des transcrits des gènes *fbsA* et *fbsB* chez les mutants *ΔrgfAC*.** ..... 105
**2.2 Capacité de liaison au fibrinogène humain des mutants *ΔrgfAC*** ..... 105
**3. Contribution relative des gènes *fbsA* et *fbsB* dans la capacité de liaison au fibrinogène des souches de CC17** ..... **106**
**3.1 Capacité de liaison au fibrinogène des mutants *ΔfbsA*, *ΔfbsB* et *ΔfbsAΔfbsB*** ..... 106
**3.2 Quantification des transcrits des gènes *fbsA* et *fbsB* chez les mutants** ..... 106
***D-Discussion*** ..... ***108***

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....113**

**BIBLIOGRAPHIE .....118**

**PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES .....145**

# Liste des tableaux

***Tableau I. Principaux facteurs de virulence et leurs régulations chez S. agalactiae.*** ..... 36
***Tableau II. Caractères des 111 souches de S. agalactiae étudiées.*** .....60
***Tableau III. Amorces utilisées lors des amplifications par PCR des gènes lmb, scpB et des éléments génétiques mobiles.*** .....62
***Tableau IV. Amorces utilisées pour caractériser l'extrémité 5' de l'ADNc du gène lmb.*** .....63
***Tableau V. Amorces utilisées lors de la délétion de la séquence IS1548.*** .....66
***Tableau VI. Amorces utilisées pour l'amplification par PCR en temps réel des gènes gyrA, lmb et scpB.*** .....70
***Tableau VII. Amorces utilisées pour l'analyse en multilocus sequence typing.***.....74
***Tableau VIII. Distribution des 109 souches de S. agalactiae en fonction de la structure intergénique scpB-lmb et en fonction des complexes clonaux définis en MLST.*** .....79
***Tableau IX. Propriétés des souches de S. agalactiae appartenant aux quatre principaux complexes clonaux (CC).*** .....80
***Tableau X. Expression du gène lmb chez 14 souches de S. agalactiae appartenant à deux lignées phylogénétiques en fonction de la présence d'IS1548 entre les deux gènes scpB et lmb.*** ..... 81
***Tableau XI. Propriétés des 134 souches de S. agalactiae étudiées.*** .....96
***Tableau XII. Amorces utilisées lors de la PCR et de la PCR quantitative.*** .....97
***Tableau XIII. Amorces utilisées pour la construction des cassettes de recombinaison.***.....98
***Tableau XIV. Amorces utilisées pour vérifier la délétion des gènes fbsA, fbsB et rgfAC.***.....100
***Tableau XV. Prévalence des gènes fbs et de leurs gènes régulateurs au sein des principaux complexes clonaux (CC) de l'espèce S. agalactiae.*** .....103

# Liste des figures

***Figure 1. Différentes étapes de l'infection néonatale précoce à S. agalactiae.*** ……8
***Figure 2. Structure de la population de S. agalactiae en France, établie par l'électrophorèse des isoenzymes métaboliques (MLEE).***.....14
***Figure 3. Représentation schématique de la protéine FbsA.***.....32
***Figure 4. Représentation schématique de la protéine FbsB.*** ……32
***Figure 5. Représentation schématique des Pilus Islands (PI) de S. agalactiae.*** ……..34
***Figure 6. Régulation des principaux facteurs de virulence chez S. agalactiae***. ……..38
***Figure 7. Représentation schématique d'un système à deux composants.*** ……39
***Figure 8. Principaux éléments génétiques mobiles rencontrés chez S. agalactiae.*** ……..43
***Figure 9. Structure du transposon composite scpB-lmb de S. agalactiae.*** ……..45
***Figure 10. Représentation schématique du vecteur pG$^{+}$host5.***.....65
***Figure 11. Construction de mutants de délétion de l'IS1548 située dans la région intergénique scpB-lmb de la souche L29.***.....66
***Figure 12. Représentation schématique des différentes structures de la région intergénique scpB-lmb.*** ……78
***Figure 13. Niveaux de transcription relative des gènes scpB et lmb de 26 souches de S. agalactiae en fonction de la structure de la région intergénique scpB-lmb.***.....81
***Figure 14. Capacités de liaison à la laminine et à la fibronectine de 26 souches en fonction de la structure de la région intergénique scpB-lmb.*** ……..82
***Figure 15. Expression de la protéine Lmb à la surface des 26 souches de S. agalactiae en fonction de la structure de la région intergénique scpB-lmb.***.....82
***Figure 16. Propriétés du mutant isogénique L29 ΔIS1548 par rapport à la souche sauvage L29 WT.*** ……83
***Figure 17. Détection de la protéine Lmb de la souche L29 et de mutants isogéniques L29ΔIS1548 par Western blot.*** ……..83
***Figure 18. Séquence nucléotidique de 236 nt de la région intergénique scpB-lmb chez les souches avec IS1548.***.....84
***Figure 19. Détermination de la taille approximative de la région transcrite non traduite (UTR) en 5' du gène lmb en fonction de la présence ou non d'IS1548 dans la région intergénique scpB-lmb.***.....84
***Figure 20. Construction des cassettes de recombinaison.*** ……98
***Figure 21. Délétion des gènes cibles par double recombinaison homologue.***……98
***Figure 22. Représentation schématique du locus rgfBDAC.***.....104
***Figure 23. Niveaux relatifs de transcription des gènes fbsA et fbsB chez les mutants ΔrgfAC.***..105
**Figure 24. Capacité relative de liaison au fibrinogène humain des mutants ΔrgfAC par rapport aux souches sauvages correspondantes (WT).**.....105
***Figure 25. Capacité relative de liaison au fibrinogène humain des souches sauvages (WT) et des mutants isogéniques correspondants ΔfbsA, ΔfbsB et ΔfbsAΔfbsB.*** ……..106

# Listes des abréviations

| | |
|---|---|
| ANAES | agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé |
| CC | complexe clonal |
| CDC | center for disease control and prevention |
| CIME | *cis* mobilizable element |
| DR | direct repeat |
| HBMEC | cellules endothéliales vasculaires du cerveau humain |
| ICE | integrative congugative element |
| IME | integrative and mobilizable element |
| IRL | inverted repeat left |
| IRR | inverted repeat right |
| IS | insertion sequence |
| LCR | liquide céphalo-rachidien |
| LTA | acide lipotéichoique |
| MLEE | multilocus enzyme electrophoresis |
| MLST | multilocus sequence type |
| PFGE | pulse field gel electrophoresis |
| PNNs | polynucléaires |
| RADP | random amplified polymorphic DNA |
| RDP | restriction digest pattern |
| RFLP | restriction fragment lenght polymorphism |
| ST | sequence type |

# Introduction

*Streptococcus agalactiae* est un germe commensal des tractus digestif et génito-urinaire de l'Homme. Cependant, cette bactérie peut être impliquée dans des infections sévères chez le nouveau-né et l'adulte. Initialement identifiée comme un pathogène responsable de mammites bovines, elle émerge dans les années 1960 comme principale cause d'infection materno-fœtale (Eickhoff *et al*., 1964, Hood *et al*., 1961). La contamination des nouveau-nés survient principalement au moment de l'accouchement, par contact avec les secrétions vaginales de la mère. Se développent alors, au cours des années 1990, de grands efforts en terme de recherche et d'objectifs de santé publique, qui aboutissent à la publication de recommandations quant au dépistage et à la prise en charge de ces infections (Anonyme, 1996, Anonyme, 2001, Schrag *et al*., 2002), permettant ainsi une diminution significative de l'incidence des infections néonatales. Toutefois, *S. agalactiae* représente toujours la première étiologie d'infections néonatales dans les pays industrialisés (Phares *et al*., 2008). Plus récemment, il a aussi émergé en tant qu'important pathogène chez l'adulte fragile en dehors de la grossesse (Skoff *et al*., 2009).

Toutes les souches de *S. agalactiae* ne présentent pas le même risque infectieux. Pourtant, il n'a pas été clairement mis en evidence de pathotypes spécifiques comme c'est couramment décrit pour d'autres espèces bactériennes telles que *Escherichia coli* (Finlay et Falkow, 1997, Schmidt et Hensel, 2004). Néanmoins, les études de la structure génétique de l'espèce *S. agalactiae* mettent en évidence des génogroupes associés à un pouvoir pathogène accru (Jones *et al*., 2003, Manning *et al*., 2009, Musser *et al*., 1989, Poyart *et al*., 2008, Quentin *et al*., 1995), suggérant ainsi que les souches pathogènes de *S. agalactiae* pourraient présenter des particularités génétiques spécifiques. Ainsi, plusieurs facteurs secrétés ou exposés à la surface bactérienne sont connus pour intervenir dans la pathogénicité de *S. agalactiae* en lui permettant de coloniser l'hôte et de pénétrer à travers les barrières épithéliales et endothéliales, ainsi que de résister au système immunitaire de l'hôte (Maisey *et al*., 2008a, Rajagopal, 2009). Une diversité dans la structure, dans l'association ou dans la prévalence des gènes codant pour ces facteurs, voire dans le niveau d'expression de ces gènes pourrait permettre le pouvoir pathogène d'une souche et ainsi expliquer la différence de potentiel infectieux des différents génogroupes de *S. agalactiae*. La caractérisation des

particularités génétiques des génogroupes à haut risque infectieux, en permettant une meilleure compréhension du scénario physiopathologique du processus infectieux, contribuera au développement de nouvelles stratégies pour le traitement ou la prévention des infections dues à cette bactérie.

Ce mémoire débute par une revue de la littérature décrivant les principaux éléments d'épidémiologie des infections à *S. agalactiae*, la structure de la population de *S. agalactiae*, les facteurs impliqués dans la virulence, les systèmes de régulation transcriptionnels et les éléments génétiques mobiles et enfin, les stratégies de prévention des infections causées par cette bactérie.

Nous présentons ensuite notre travail expérimental dont l'objectif général a été d'étudier l'impact d'éléments génétiques variables sur l'expression de quatre gènes de virulence, *lmb*, *scpB*, *fbsA* et *fbsB* impliqués respectivement dans la liaison à la laminine, à la fibronectine et au fibrinogène humain, favorisant ainsi l'adhésion et/ou l'invasion cellulaire de *S. agalactiae*. Dans la première partie expérimentale, nous avons étudié l'impact de deux éléments génétiques mobiles, l'intron de groupe II GBSi1 et la séquence d'insertion IS*1548*, insérés dans la région intergénique entre les gènes *scpB* et *lmb,* sur l'expression de ces deux gènes. Dans la seconde partie, nous avons étudié les propriétés de liaison au fibrinogène de souches appartenant au clone CC17 connu comme le groupe à plus haut risque infectieux pour le nouveau-né. Ces souches se caractérisent par leur forte capacité de se lier au fibrinogène (Rosenau *et al*., 2007) par rapport aux souches appartenant aux principales autres lignées phylogénétiques de l'espèce *S. agalactiae*. Ainsi, nous avons déterminé la prévalence des gènes *fbs* et de leurs gènes régulateurs, le rôle du système à deux composants, RgfA/RgfC, sur l'expression des gènes *fbs* et la contribution relative de ces gènes dans la capacité de liaison au fibrinogène des souches de CC17.

# Revue de la Littérature

# I- Epidémiologie de *Streptococcus agalactiae*

*Streptococcus agalactiae* est un coque à Gram positif de la famille des *Streptococcaceae*. Il appartient au groupe B de Lancefield, classification basée sur la nature antigénique du polyoside C, composé pariétal des streptocoques (Lancefield et Freimer, 1966).

*S. agalactiae* a été initialement décrit en 1887, comme responsable de mammites chez les bovins (Nocard et Mollereau, 1887). Son implication en pathologie humaine n'a été établie qu'à partir des années 1960 (Eickhoff *et al*., 1964, Hood *et al*., 1961). *S. agalactiae* a été retrouvé chez diverses espèces animales telles que les poissons (Evans *et al*., 2009, Pereira *et al*., 2010) ou divers mammifères (chien, chat, porc, singe, dauphin….) (Elliott *et al*., 1990, Evans *et al*., 2006, Lammler *et al*., 1998, Pereira *et al*., 2010). Son pouvoir pathogène est peu documenté pour ces espèces. En revanche, son rôle en pathologie bovine et humaine a été établi depuis de nombreuses années.

## I.1 *S. agalactiae* chez le bovin

*S. agalactiae* a été identifié chez les bovins comme une cause majeure de mammites (Nocard et Mollereau, 1887) chroniques ou sub-cliniques (Jain, 1979, Keefe, 1997). L'infection à *S. agalactiae* est associée à une diminution de la quantité et de la qualité du lait (Keefe, 1997). De manière générale, les infections bactériennes mammaires à *S. agalactiae* des bovins sont de moins en moins fréquentes (Hillerton et Berry, 2003). Cette diminution globale du nombre de cas dans le monde a été rendue possible grâce à la mise en place de programmes de prophylaxie basés sur l'utilisation adaptée des antibiotiques (Hillerton et Berry, 2003, Keefe *et al*., 1997). La prévalence de *S. agalactiae* est actuellement très variable selon les pays. En France, les mammites à *S. agalactiae* sont peu fréquentes (Djabri *et al*., 2002) ; dans certains pays tels que les Etats-Unis ou le Canada, la prévalence est parfois supérieure à 10% (Keefe *et al*, 1997). Elle atteint 60% dans l'étude brésilienne de Duarte (Duarte *et al*., 2004). Ce problème reste l'un des plus coûteux en terme de santé bovine.

# I.2 *S. agalactiae* chez l'homme

*S. agalactiae* est une bactérie commensale du tube digestif de l'Homme qui peut coloniser les voies urogénitales de la femme. Cette bactérie est la première cause d'infections bactériennes néonatales. Elle est également responsable d'autres infections, en particulier chez la femme enceinte ou en postpartum, chez l'adulte immuno-déficient et chez les personnes âgées.

## I.2.1 Le portage

### I.2.1.1 Portage vaginal chez la femme enceinte

Le portage vaginal asymptomatique de *S. agalactiae* est retrouvé chez 5 à 36% des femmes enceintes selon les études (Puopolo *et al*., 2005, Schuchat, 1995). La fréquence de cette colonisation asymptomatique semble varier en fonction de l'origine géographique et ethnique des patients : le portage asymptomatique de *S. agalactiae* est ainsi plus fréquent chez les femmes d'origine africaine que caucasienne (Phares *et al*., 2008). Bien que cette contamination provienne principalement du tractus gastro-intestinal de la femme (Badri *et al*., 1977, Meyn *et al*., 2009), une corrélation entre portage vaginal et activité sexuelle a été suggérée (Anthony 1978, Meyn *et al.*, 2009). Au cours de la grossesse, le portage du streptocoque B est intermittent ou transitoire dans la majorité des cas (Anthony *et al*., 1978, Yow *et al*., 1980). Cette instabilité de la colonisation bactérienne a entraîné de nombreuses controverses quant au dépistage systématique au cours de la grossesse.

La colonisation maternelle par *S. agalactiae* est à l'origine de la colonisation et de l'infection néonatales (Baker, 1997), et le risque infectieux est lié à l'inoculum bactérien.

### I.2.1.2 Colonisation du nouveau-né

Il existe deux modes de transmission des bactéries : la transmission verticale et la transmission horizontale :

1. La transmission verticale des bactéries de la mère à son enfant, avant ou pendant l'accouchement est le mode principal de contamination et correspond à 75% des

cas (Winn, 2007). Elle est rare par voie hématogène transplacentaire, mais plus fréquente par voie ascendante (membrane rompue ou intacte), par ingestion ou inhalation de liquide amniotique contaminé (Naeye et Peters, 1978), ou encore lors du passage de la filière génitale par inhalation ou ingestion des secrétions vaginales contaminées (Figure 1) (Quentin *et al*., 2002). A la naissance, le risque de colonisation d'un nouveau-né d'une mère colonisée est d'environ 50% (Boyer et Gotoff, 1986, Schuchat, 2001). La transmission verticale de *S. agalactiae* est proportionnelle à la densité de colonisation des voies génitales maternelles (Krohn *et al*., 1999). Des facteurs de risques obstétricaux surajoutés, comme une rupture prématurée ou prolongée (supérieure à 18 heures) des membranes, l'ouverture du col utérin, des manœuvres d'extraction instrumentales, des touchers vaginaux répétés et/ou une fièvre supérieure à 38°C augmentent d'autant plus le risque de transmission materno-fœtale de la bactérie (Schuchat, 1998).

2. La transmission horizontale survient après la naissance, principalement à partir de la mère, mais aussi du personnel soignant ou des autres nouveau-nés par l'intermédiaire du portage pharyngé ou cutané ou du lait maternel (Christensen *et al*., 1981, Gagneur *et al*., 2009, Winn, 2007). Ces contaminations concernent 25% des nouveau-nés colonisés (Winn, 2007).

Dans 10 à 20% des cas, la colonisation du nouveau-né évolue vers une pathologie grave susceptible d'entrainer le décès du nouveau-né ou de graves séquelles neurologiques (méningites, septicémies, pneumonies) (Brimil *et al*., 2006, Schuchat, 1998).

#### I.2.1.3 Portage chez l'adulte (en dehors de la femme enceinte)

Le taux de colonisation de *S. agalactiae* chez l'adulte varie de 2 à 30% en fonction des zones géographiques, des populations et des prélèvements étudiés (Bliss *et al*., 2002, Brimil *et al*., 2006, Ferrieri et Blair, 1977, Foxman *et al*., 2006, Islam et Thomas, 1980, Manning *et al*., 2004, Van der Mee-Marquet *et al*., 2008). Il est approximativement de 21% chez les sujets âgés (Edwards *et al*., 2005, Van der Mee-Marquet *et al*., 2008). Le portage asymptomatique de *S. agalactiae* au niveau du tractus gastro-intestinal, du tractus génital, de la peau, de l'orifice anal et de la gorge

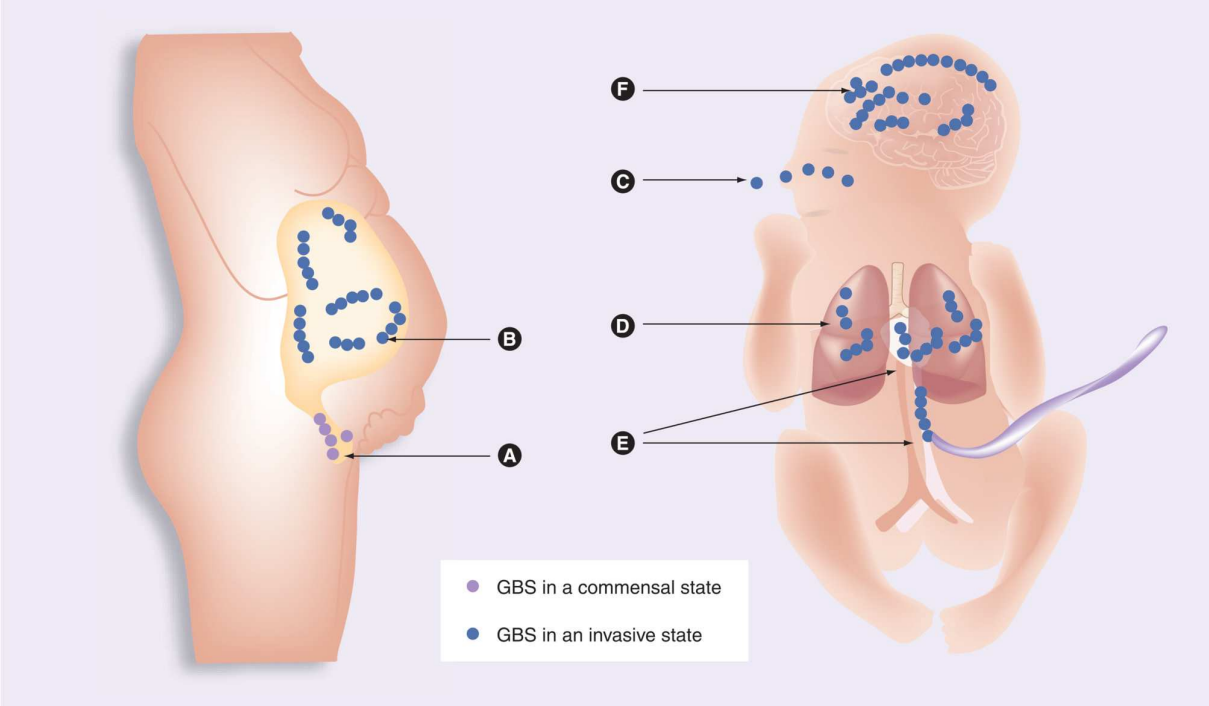



**Figure 1. Différentes étapes de l'infection néonatale précoce à *S. agalactiae*.**

GBS : Streptocoques du groupe B.

(**A**) *S. agalactiae* colonise le vagin de la femme enceinte. (**B**) *S. agalactiae* peut infiltrer le compartiment utérin. (**C**) *S. agalactiae* est transmis au nouveau-né soit au cours de la grossesse par inhalation ou ingestion de liquide amniotique contaminé, soit au cours de l'accouchement par inhalation des secrétions vaginales contaminées. (**D**) *S. agalactiae* envahit le poumon du fœtus ou du nouveau-né causant une pneumonie. (**E**) Du poumon, *S. agalactiae* gagne la circulation sanguine causant une septicémie. (**F**) *S. agalactiae* peut franchir la barrière hémato méningée causant ainsi une méningite. [image de Rajagopal (Rajagopal, 2009)]

est retrouvé chez les hommes et chez les femmes (Bliss *et al*., 2002, Manning *et al*., 2004, Foxman *et al*., 2006, Van der Mee-Marquet *et al*., 2008).

## I.2.2 Les infections à *S. agalactiae*

### I.2.2.1 Infections chez la femme enceinte

En plus du risque accru d'une rupture prématurée des membranes résultant d'une forte colonisation, *S. agalactiae* est responsable de 30% des chorioamniotites (Krohn *et al*., 1999, Quentin *et al*., 2002). La chorioamniotite est fortement impliquée dans les accidents de la grossesse (accouchement prématuré, mort *in utero*) (Baker, 1997). *S. agalactiae* est également responsable de 20% des endométrites du *post-partum* et du *post-abortum*, accompagnées parfois d'épisodes bactériémiques (Shet et Ferrieri, 2004).

### I.2.2.2 Infections néonatales

*S. agalactiae* représente la première cause d'infections néonatales. A elle seule, cette bactérie est responsable de 30 à 50% des infections bactériennes graves du nouveau-né contre 20 à 30% attribuables à *Escherichia coli* (Poyart et Trieu-Cuot, 1999). Deux entités cliniques différentes caractérisent les infections invasives du nouveau-né à *S. agalactiae* :

**1.** Une forme précoce se manifeste dans la première semaine de vie de l'enfant, principalement au cours des 24 ou 48 premières heures. Cette forme est caractérisée le plus souvent par une bactériémie (83%), et plus rarement une pneumonie (9%) ou une méningite (7%). Le taux de mortalité de cette forme est de 7% malgré l'utilisation d'antibiotique (Phares *et al*., 2008). Dans ce contexte, la transmission est verticale et a lieu le plus souvent au moment du passage à travers la filière génitale de la mère colonisée (Figure 1).

**2.** Une forme tardive touche le nouveau-né âgé de 7 jours à 3 mois. Les nourrissons présentent habituellement un tableau de méningite avec bactériémie, et de manière moins fréquente une atteinte ostéo-articulaire, une atteinte de la peau et plus rarement une pneumonie. Le taux de mortalité de cette forme est de 5%

malgré l'utilisation d'antibiotique (Phares *et al*., 2008). La transmission est le plus souvent horizontale (par l'intermédiaire de la mère, d'autres enfants ou du personnel soignant), et aucun facteur de risque n'est clairement établi dans la forme tardive.

#### I.2.2.3 Prévention et traitement des infections néonatales

Dans le cadre de la prévention anténatale de ce risque infectieux, des recommandations concernant le dépistage et la prise en charge maternelle ont été proposées, notamment aux Etats-Unis dès 1996 (recommandations révisées en 2002) (Anonyme, 1996, Schrag *et al*., 2002) et en France en 2001 (Anonyme, 2001). Ainsi, l'Agence Nationale de l'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES) recommande le dépistage vaginal systématique de *S. agalactiae* chez la femme enceinte entre la 34ème et la 37ème semaine d'aménorrhée. Une détection de *S. agalactiae* en primo-culture sans enrichissement est suffisante pour cerner la population à risque d'infection materno-fœtale. Pour quantifier le risque, un résultat semi-quantitatif est recommandé et consiste à indiquer le nombre de quadrants de boîte de Petri concerné par la culture (Anonyme, 2001). Un dépistage positif impose une antibioprophylaxie systématique en *per-partum*, une stratégie qui a montré une efficacité dans la réduction de l'incidence des colonisations et des infections du nouveau-né. Elle consiste en une première injection par voie intraveineuse de 5 millions d'unités internationales (UI) de pénicilline G dès le déclenchement du travail, suivie de 2,5 millions d'UI toutes les 4 heures jusqu'à l'expulsion. La pénicilline G peut être remplacée par l'amoxicilline (2 g puis 1 g toutes les 4 heures), et en cas d'allergie aux pénicillines, par l'érythromycine (500 mg toutes les 6 heures) ou par une céphalosporine. Aux Etats-Unis, les recommandations revues de 2002 préconisent l'utilisation de la céfazoline en raison du faible risque d'allergie croisée, de son intérêt écologique (antibiotique de première ligne) et surtout de l'absence de résistance (Schrag *et al*., 2002).

Notons que l'incidence des infections néonatales précoces a diminué de 50 à 80% selon les pays depuis la mise en place de ces recommandations. Aux Etats-Unis, l'incidence qui était de 1,7 cas pour 1000 naissances avant 1996, est passée à 0,34 cas pour 1000 naissances (Phares *et al*., 2008) . En France, l'incidence, qui était de 0,69 cas pour 1000 naissances en 1997, est passé à 0,23 cas pour 1000

naissances en 2006 (Jourdan-Da Silva *et al*., 2008). Cependant, l'incidence des infections néonatales tardives est restée stable, aux environs de 0,34 cas pour 1000 naissances aux Etats-Unis et de 0,10 cas pour 1000 naissances en France (Jourdan-Da Silva *et al*., 2008).

Les recommandations concernant la prise en charge des nouveau-nés de femmes ayant reçu une antibioprophylaxie *per-partum* propose une antibiothérapie chez le nouveau-né uniquement si celui-ci présente des signes cliniques d'infection.

Lorsque le nouveau-né est infecté par *S. agalactiae*, les modalités thérapeutiques proposées par Baker sont (Baker, 1997):

- l'association ampicilline (150 mg/kg/jour) et gentamicine (5 à 7mg /kg/jour), en cas de suspicion de sepsis jusqu'à la réponse totale du laboratoire, puis l'ampicilline (150 mg/kg/jour) ou la pénicilline G (200 000 UI/kg/jour) pendant 10 jours pour les bactériémies confirmées.

- l'association ampicilline (300 mg/kg/jour) et gentamicine (5 à 7 mg/kg/jour), en cas de suspicion de méningites jusqu'à la réponse totale du laboratoire, puis la pénicilline G (400 000 à 500 000 UI/kg/jour) pendant 14 jours au minimum pour les méningites confirmées.

Lorsque le nouveau-né est cliniquement et biologiquement normal, et seulement colonisé, et que sa mère n'a pas reçu d'antibioprophylaxie, la conduite à tenir est très discutée (Lejeune *et al*., 1999).

#### I.2.2.4 Infections chez l'adulte (hors infections maternelles)

L'incidence des infections invasives de l'adulte dues à *S. agalactiae* a été multipliée par 2 voire 4 ces 20 dernières années pour atteindre 7,2 cas pour 100 000 adultes aux Etats-Unis. Ces infections touchent principalement les personnes âgées et/ou présentant des pathologies sous-jacentes (Farley, 2001; Skoff *et al*., 2009). Aux Etats-Unis, les personnes âgées représentent plus de 40% des patients atteints d'infections invasives à *S. agalactiae* et plus de 50% des décès dus à ce pathogène (Edwards et Baker, 2005). Le diabète de type 2 est la maladie sous-jacente la plus fréquemment retrouvée (44%), et les maladies cardio-vasculaires (36%), un cancer (17%), une maladie rénale chronique, une cirrhose sont d'autres facteurs de risque

possibles. Les infections sont soit communautaires soit nosocomiales ; elles sont polymicrobiennes dans moins de 10% des cas (Farley, 2001, Jackson *et al*., 1995). Les bactériémies sont la forme la plus courante d'infections invasives à *S. agalactiae* et représentent près de 40% des manifestations cliniques, suivies par les infections de la peau et/ou des tissus mous (26%), les pneumonies (13%) et les infections urinaires (Skoff *et al*., 2009). Sont également décrites des arthrites septiques, des méningites, et des endocardites, ces deux dernières infections étant peu fréquentes, mais associées à des taux de morbidité et de mortalité élevés (Farley, 2001, Pelkonen *et al*., 2009, Phares *et al*., 2008).

# II- Marqueurs épidémiologiques

Le typage des souches bactériennes peut se faire par différentes techniques. Ainsi, on peut distinguer des méthodes de phénotypage et des méthodes de génotypage. Le choix d'une méthode dépend des objectifs poursuivis (épidémiologie interventionnelle ou surveillance globale) et de l'espèce bactérienne à typer. Plusieurs paramètres sont importants pour évaluer une technique de typage (Tenover *et al*., 1994). Tout d'abord la « typabilité », c'est à dire la possibilité d'obtenir un résultat pour chaque isolat analysé. Les isolats non typables ne sont pas interprétables. Ensuite, la reproductibilité, c'est à dire le fait d'obtenir le même résultat pour un isolat typé plusieurs fois. Une fois que ces deux exigences sont satisfaites, il faut aussi prendre en compte le pouvoir discriminant de la technique. Idéalement, chaque isolat non relié aux autres devrait être identifié comme unique. La facilité d'interprétation est également importante. En effet, l'épidémiologie à l'échelle mondiale nécessite de pouvoir comparer les données de typages réalisées dans des laboratoires différents. Une technique difficile à interpréter sera très difficilement mise à profit hors du laboratoire. La faisabilité d'une technique repose sur plusieurs critères : l'accessibilité à la technique, les délais d'obtention des résultats, l'expertise technique nécessaire, le coût du matériel, les réactifs nécessaires, et enfin l'utilité de la technique pour un grand nombre de microorganismes (van Belkum *et al*., 2001).

# II.1 Caractérisation de *S. agalactiae* par des méthodes phénotypiques

Plusieurs marqueurs phénotypiques ont été utilisés, tels que la sérotypie, la lysotypie et l'analyse des loci enzymatiques par électrophorèse ou MLEE.

## II.1.1 La sérotypie

La quasi-totalité des souches de *S. agalactiae* retrouvées chez l'homme sont capsulées. Sur la base des antigènes capsulaires, dix sérotypes sont actuellement décrits : Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII et récemment IX (Jelinkova et Motlova, 1985, Jensen, 1979, Motlova *et al* 1986, Ryc *et al*, 1988, Slotved *et al*., 2007). Certaines souches restent cependant non typables. Cinq sérotypes (Ia, Ib, II, III et V) sont responsables de la plupart des infections humaines. Ainsi, dans les infections néonatales précoces, on retrouve les sérotypes Ia et III (30% des souches chacun), le sérotype V (18% des souches), et le sérotype II (13% des souches) (Phares *et al.,* 2008). Dans les infections néonatales tardives, le sérotype III représente plus de 51% des cas, principalement des méningites, suivi des sérotypes Ia (24%) et V (14%) (Phares *et al*., 2008). Dans les infections de l'adulte, aux Etats-Unis, le sérotype V représente entre 33% et 50% des souches, puis viennent les sérotypes Ia (entre 24 et 39% des souches) et II (entre 12 et 27%) (Phares *et al*., 2008, Skoff *et al*., 2009). Cependant, au Japon, c'est le sérotype Ib qui prédomine dans les infections invasives de l'adulte avec plus de 30% des souches, suivi par le sérotype V (19%) (Murayama *et al*., 2009). En portage vaginal, des spécificités géographiques sont observées de par le monde : par exemple, aux Etats-Unis et en Europe, ce sont les sérotypes III et Ia qui prédominent, suivis par les sérotypes II et V ; au Japon, les sérotypes VI et VIII ; aux Emirats Arabes Unis le sérotype IV, et le sérotype V dans plusieurs pays africains (Amin *et al*., 2002, Brochet *et al*., 2009., Moyo *et al*., 2002, Phares *et al*., 2008, Van der Mee-Marquet *et al*., 2009). L'identification des protéines antigéniques de surface C et R permet d'affiner le sérotypage des souches de *S. agalactiae*.

### II.1.2 La lysotypie

La lysotypie caractérise les isolats selon leur sensibilité ou leur résistance à la lyse par différents bactériophages. Un système de typage utilisant 24 phages a été évalué en 1980 pour caractériser des souches de *S. agalactiae* (Stringer, 1980). Combinée à la sérotypie, la lysotypie était un outil épidémiologique d'importance dans les années 80 (Haug *et al*., 1983).

### II.1.3 Electrophorèse des isoenzymes métaboliques : Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)

L'électrophorèse des isoenzymes métaboliques (MLEE) permet de caractériser des différences de mobilité électrophorétique d'enzymes métaboliques. Ces variations reflètent les substitutions d'acides aminés et par conséquent les variations nucléotidiques des gènes codant l'enzyme. Ainsi, le MLEE fut la première méthode phénotypique capable de refléter fidèlement des variants alléliques spécifiques de loci génomiques (Selander *et al*., 1986). Cette méthode fournit des informations sur les distances génétiques entre les isolats testés et permet l'étude de la structure des populations bactériennes (Ochman et Selander, 1984). L'inconvénient majeur de cette technique reste sa lourdeur de réalisation.

L'étude des loci codant 11 ou 12 enzymes métaboliques (phosphoglucose isomérase, hexokinase, glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, carbamate kinase, adénylate kinase, phénylalanylleucine peptidase, leucylglycylglycine peptidase, nucléoside phosphorylase, estérase, phosphoglucomutase 1, phosphoglucomutase 2, et glutamate déhydrogénase) a mis en évidence une structure clonale de l'espèce *S. agalactiae* aux Etats-Unis (Musser *et al*., 1989), au Danemark (Helmig *et al*., 1993) et en France (Quentin *et al*., 1995). Les isolats qui possèdent des allèles identiques à tous les loci étudiés appartiennent au même électrophorétype (ET). Deux grands groupes phylogénétiques désignés MLEEI et MLEEII ont été définis. La répartition des souches invasives isolées du liquide céphalorachidien (LCR) de nouveau-nés, diffère selon les pays :

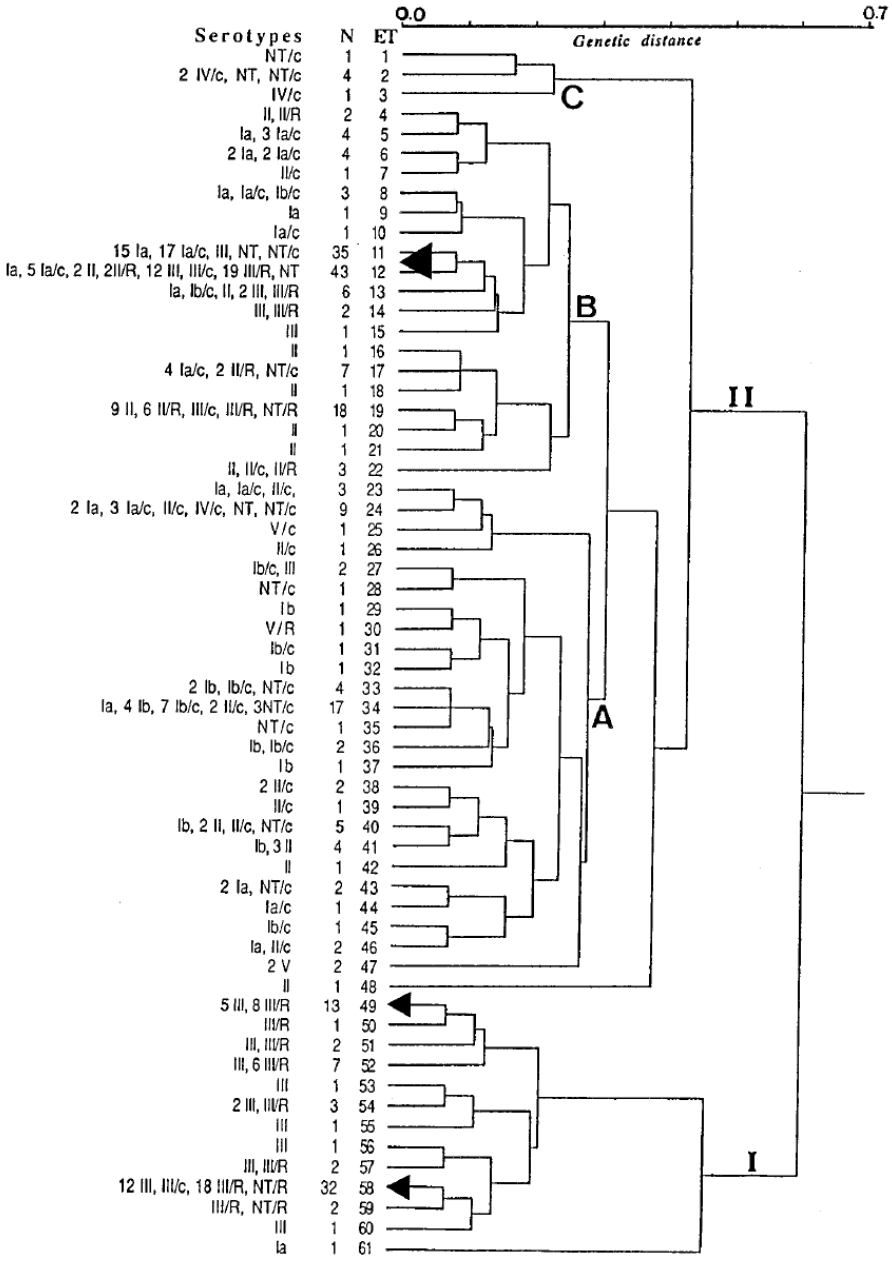



**Figure 2. Structure de la population de *S. agalactiae* en France, établie par l'électrophorèse des isoenzymes métaboliques (MLEE).**

Le dendrogramme est composé de deux divisions primaires (I et II) et de quatre familles (A, B, C et ET 48 contenant seulement une souche) dans la division II. N, représente le nombre de souches étudiées. Les triangles noirs (◀) indiquent les ET renfermant au moins cinq souches isolées de LCR (Quentin et al., 1995).

- Aux Etats-Unis, les souches responsables d'infections sévères ayant un tropisme pour le système nerveux central des nouveau-nés se regroupent pour 81% dans le groupe MLEEI très homogène composé d'un seul ET (ET1); et 19% seulement appartiennent au groupe MLEEII (division hétérogène composée de 18 ET) dont l'ET12 est le représentant majoritaire (Musser *et al*., 1989).

- En France, les souches invasives néonatales sont distribuées dans les deux divisions phylogénétiques. Le groupe MLEEI est génétiquement très homogène (Figure 2) et est composé de 40% de souches invasives; il est en conséquence considéré comme à haut risque infectieux pour le nouveau-né. Il comporte 13 ET mais la plupart des souches invasives appartiennent aux ET 49 et ET 58. Le groupe MLEEII inclut 13% de souches isolées de LCR. Il est génétiquement plus diversifié et comprend 48 ET. Les souches invasives de *S. agalactiae* isolées des méningites appartiennent pour la plupart à 2 ET (ET 11 et ET 12) (Quentin *et al*., 1995) (Figure 2).

Au total, le MLEE est la première technique qui a permis (i) d'étudier la structure de la population de *S. agalactiae*; (ii) d'identifier deux grands groupes phylogénétiques assez distants; et (iii) de mettre en évidence une lignée hyper invasive responsable de la majorité des infections néonatales.

## II.2 Caractérisation de *S. agalactiae* par des méthodes génotypiques

Les techniques phénotypiques présentant des inconvénients liés à leur capacité à typer les souches (sérotypie), à leur pouvoir discriminant (lysotypie) ou à leur difficulté de réalisation (MLEE), des méthodes reposant sur l'ADN ont été développées. Ainsi, l'étude de marqueurs moléculaires a souvent permis une discrimination des souches non différenciables par les méthodes phénotypiques.

### II.2.1 Profils de restriction de l'ADN génomique total : Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Cette technique analyse les variations de profils de digestion enzymatique du génome entier des différentes souches. Appliqué à *S. agalactiae*, le RFLP a permis d'identifier deux lignées responsables de la majorité des infections néonatales précoces au Japon, appelées RDP Ia-3 et RDP III-3 (RDP pour Restriction Digest Pattern). Ces deux RDP représentent des lignées phylogénétiquement séparées au sein des sérotypes Ia et III (Nagano *et al*., 1991). L'analyse des profils de restriction obtenus par les endonucléases *Hind*III et *Sse*83871 a permis de classer les souches de *S. agalactiae* de sérotype III en trois RDP : RDP III-1, RDP III-2 et RDPIII-3 (Takahashi *et al*., 1998). La majorité des isolats obtenus de LCR de nouveau-nés sont de type RDP III-3, lui-même subdivisé en deux sous-types, RDPIII-3a et RDP III-3b (Takahashi *et al*., 1998).

Le RFLP a été également utilisé en association avec l'hybridation de sondes diverses, telles que des gènes de virulence ou des éléments génétiques mobiles permettant ainsi d'identifier des marqueurs génétiques de lignée ou de montrer des corrélations avec des gènes de virulence (Bohnsack *et al*., 2002, Hauge *et al*., 1996, Takahashi *et al*., 1998, Takahashi *et al*., 2002). La ribotypie est également une application de cette approche, dans laquelle les gènes cibles sont les opérons codant les ARN ribosomaux (ARNr). Appliquée à *S. agalactiae*, la ribotypie a confirmé d'une part l'existence des deux grands groupes phylogénétiques précédemment identifiés par l'analyse MLEE, d'autre part l'homogénéité génétique de la lignée à haut potentiel invasif pour le nouveau-né (Chatellier *et al*., 1996, Quentin *et al*., 1995).

### II.2.2 Amplification aléatoire de différentes parties du génome : Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

Le RAPD est une technique qui repose sur l'amplification aléatoire d'ADN en utilisant des amorces de courtes séquences nucléotidiques (de 10 à 15 nt) dans des conditions peu spécifiques d'hybridation. Cette technique ne nécessite pas une connaissance préalable du génome (Welsh et McClelland, 1990). Appliqué à *S. agalactiae*, le RAPD a confirmé l'existence des trois groupes à plus haut risque infectieux pour le nouveau-né correspondant à la division MLEEI et les 2 ET (11 et

12) de la division MLEEII précédemment définis par MLEE en France (Chatellier *et al*., 1997, Quentin *et al*., 1995).

### II.2.3 Electrophorèse en champ pulsé : Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Cette méthode utilise des enzymes de restriction coupant l'ADN génomique avec une fréquence peu élevée, ce qui génère des fragments de grande taille. Ils sont séparés sous certaines conditions d'électrophorèse où la polarité du courant est modifiée à intervalles réguliers (Schwartz et Cantor 1984). Cette méthode, qui présente un grand pouvoir discriminant, est particulièrement adaptée aux études d'épidémiologie locale telles que l'investigation des infections nosocomiales. Souvent utilisé pour le typage de *S. agalactiae*, le PFGE a permis d'expliquer des phénomènes localisés, comme l'émergence clonale du sérotype V aux Etats-Unis (Elliott *et al*., 1998), et de mettre en évidence la diversité génétique des isolats circulant dans un pays ou provenant de sites anatomiques particuliers (Bergseng *et al*., 2009, Bidet *et al*., 2003, Oliveira *et al*., 2006, Thong *et al*., 2004, Van der Mee-Marquet *et al*., 2009). Le PFGE a confirmé l'homogénéité génétique de la lignée à haut potentiel invasif correspondant au clone ET1 en MLEE et RDP III-3 en RFLP (Rolland *et al*., 1999) mais il ne semble pas être la technique la plus adaptée à l'étude de la structure des populations.

### II.2.4 Amplification-séquençage pour l'étude du polymorphisme multilocus : Multi- Locus Sequence Typing (MLST)

Le MLST a été proposé pour la première fois en 1998 pour caractériser les souches de *Neisseria meningitidis* (Maiden *et al*., 1998). Aujourd'hui le MLST est utilisé pour plus de cinquante espèces bactériennes telles que *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia pseudomallei*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Helicobacter pylori*, etc.. (http://www.mlst.net/).

Le principe du MLST est de comparer des séquences d'ADN de gènes de ménage (habituellement 7 gènes). Approximativement 400 à 500 pb de chaque gène

vont être séquencées (après avoir été amplifiées par PCR). Pour chaque gène, les séquences obtenues vont être comparées et des numéros d'allèles sont assignés à chaque séquence unique. Pour un gène donné, deux souches qui ont la même séquence nucléotidique portent le même numéro d'allèle et les séquences différant même d'un seul nucléotide sont considérées comme des allèles distincts. Chaque souche est définie par la combinaison de numéros correspondant aux allèles des loci étudiés, ce qui définit un profil allélique ou « séquence type » (ST) (Maiden *et al*., 1998). La recherche des numéros d'allèle et de ST est réalisée en ligne sur le site internet dédié au système MLST d'une espèce bactérienne donnée. L'énorme avantage de cette approche est qu'elle est parfaitement reproductible quel que soit le laboratoire puisqu'il s'agit de séquencer et de classer les séquences. Il n'y a pas d'ambiguïté d'interprétation des résultats comme avec des profils de migration multibandes. En effet le typage MLST avait été initialement développé pour l'étude de *N. meningitidis* du fait de la difficulté de comparer des résultats de MLEE entre laboratoires (Maiden *et al*., 1998).

Pour *S. agalactiae*, le MLST, qui a été créé en 2003 (Jones *et al*., 2003), est en passe de devenir la méthode de référence. La base de données http://pubmlst.org/sagalactiae/ regroupe à ce jour plus de 400 ST et constitue une ressource importante pour l'épidémiologie mondiale de *S. agalactiae* (Jones *et al*., 2003). Certains ST sont regroupés en clusters, aussi appelés Complexes Clonaux (CC). L'identification des CC se fait par le programme eBURST v3 (http://eburst.mlst.net/) qui permet de définir un ancêtre hypothétique commun au sein du complexe, appelé le ST fondateur. Les ST assignés à un même CC possèdent au moins cinq allèles en commun sur les sept loci étudiés (Feil *et al*., 2004). Les STs qui ne sont affiliés à aucun CC sont appelés singletons.

La structure génétique de *S. agalactiae* a été étudiée par MLST dans de nombreux pays comme l'Amérique du Nord (Etats-Unis et Canada) (Bohnsack *et al*., 2008, Lin *et al*., 2006, Manning *et al*., 2008, Manning *et al*., 2009, Springman *et al*., 2009), le Royaume-Uni (Jones *et al*., 2003, Jones *et al*., 2006), la France (Lamy *et al*., 2006, Poyart *et al*., 2008, Van der Mee Marquet *et al*., 2008), la Suède (Luan *et al*., 2005), le Portugal (Martins *et al*., 2007), Israël (Marchaim *et al* 2006), le Sénégal

et la République Centre-Africaine (Brochet *et al*., 2009). Cinq CC majeurs (CC1, CC10, CC17, CC19 et CC23) ont ainsi été identifiés à travers le monde.

Une certaine congruence entre la répartition des sérotypes et les lignées MLST a été observée. De fait, le sérotype Ia est souvent retrouvé associé au complexe CC23, le sérotype Ib au complexe CC10, le sérotype V au complexe CC1, les sérotypes II et majoritairement III aux complexes CC17 et CC19 (Bohnsack *et al*., 2008, Davies *et al*., 2004, Manning *et al*., 2008, Salloum *et al*., 2010). Le CC17 est considéré comme clone “hyper-invasif”, puisque les souches appartenant à ce complexe clonal et au sérotype III sont fortement représentées parmi celles isolées d’infections néonatales invasives (Bohnsack *et al*., 2008, Jones *et al*., 2003, Luan *et al*., 2005, Manning *et al*., 2009, Poyart *et al*., 2008). Des études récentes ont montré que ces souches sont associées significativement aux infections néonatales tardives (Manninng *et al*., 2009, Poyart *et al*., 2008) et aux méningites (Manning *et al*., 2009). Par ailleurs, Manning *et al*. ont montré que les souches appartenant au complexe clonal CC17 sont plus difficilement éliminées de l’organisme après antibioprophylaxie (Manning *et al*., 2008). Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi ces souches sont particulièrement retrouvées dans les infections tardives du nouveau-né (Manning *et al*., 2008, Manning *et al*., 2009). Une hypothèse d’ancestralité bovine du clone hyper-invasif ST-17 a été proposée par plusieurs auteurs (Bisharat *et al*., 2004, Héry-Arnaud *et al*., 2007).

Contrairement au CC17, le potentiel infectieux des CC1, CC19 et CC23 ne fait pas consensus : certaines études les relient au portage asymptomatique (Jones *et al*., 2003, Van der Mee-Marquet *et al*., 2008), alors que d’autres travaux les rattachent aux infections néonatales précoces pour CC19 (Manning *et al*., 2009) et CC23 (Martins *et al*., 2007) et aux infections de l’adulte (cutanées et ostéo-articulaires) pour CC1 et CC23 (Salloum *et al*., 2010).

Enfin, les résultats de MLST sont en accord avec les résultats des techniques historiques. Le CC17 correspond vraisemblablement au clone hyper invasif ET-1 identifié par MLEE et au RDP III-3 identifié par RFLP (Jones *et al*., 2003, Musser *et al*., 1989, Nagano *et al*.,1991).

# III- Génome de *S. agalactiae*

C'est en 2002 que les deux premiers génomes de *S. agalactiae* ont été séquencés, ceux des souches NEM316 (sérotype III) et 2603 (sérotype V) (Glaser *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2002). La taille du génome est de 2,211,485 bp pour NEM316 et de 2,160,267 bp pour 2603 et le pourcentage de G+C est bas et de l'ordre de 35,6%. Récemment, six nouveaux génomes de souches de *S. agalactiae* de divers sérotypes (Ia, Ib, II, III et V) ont été séquencés (Tettelin *et al*., 2005). La génomique comparative de ces 8 souches responsables d'infections chez l'homme indique que l'espèce possède un « pan-génome » composé d'un squelette génomique conservé ou «core» génome qui représente environ 80% de chaque génome, le reste étant partiellement partagé voire spécifique de souche, constituant ainsi le génome «dispensable» groupé dans des îlots (Tettelin *et al*., 2005). Le «core» génome compte 1811 gènes alors que 765 gènes constituent le génome «dispensable» (Maione *et al*., 2005, Tettelin *et al*., 2005). Des modèles mathématiques ont permis d'évaluer à 33 le nombre de gènes venant enrichir le pan-génome pour chaque génome nouvellement séquencé de cette espèce (Tettelin *et al*., 2005). Ces modèles prédisent un pan-génome si vaste que des gènes spécifiques seraient encore découverts même après le séquençage de plusieurs centaines de génomes de cette espèce. Enfin, l'ensemble de ces études a mis en évidence une structure mosaïque avec un ensemble d'îlots représentant environ 20% du génome (Brochet *et al*., 2008a, Glaser *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2005). Ces îlots sont responsables de la diversité génomique au sein de l'espèce et contiennent notamment des gènes de virulence connus ou putatifs, des gènes codant des protéines de surface et des gènes associés à des éléments génétiques mobiles (transposases, intégrases) (Glaser *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2002, Tettelin *et al*, 2005). Certains de ces îlots pourraient donc correspondre à des îlots de pathogénicité (Herbert *et al*., 2005). Ces études mettent en évidence l'importance des transferts horizontaux dans l'acquisition de la virulence et dans la diversité génétique (Brochet *et al*., 2008a, Brochet *et al*., 2008b). Brochet *et al*. ont montré que ces transferts horizontaux sont de grande ampleur, pouvant représenter plusieurs centaines de kb. Chaque génome apparaît ainsi comme un patchwork de régions d'origines diverses. L'analyse de la distribution de ces régions a montré que la

majorité des souches isolées actuellement provient probablement de trois "clones" ancestraux (CC1, CC23 et CC17) ayant échangé des régions génomiques (Brochet *et al*., 2008b).

# IV- Pathogénie des infections à *S. agalactiae*

La pathogénie des infections à *S. agalactiae* est multifactorielle. Elle dépend de facteurs de virulence de la bactérie mais également de facteurs de l'hôte.

## IV.1 Rôle de l'hôte dans la virulence de *S. agalactiae*

L'opsonisation par le complément et les immunoglobulines ainsi que la phagocytose médiée par les polynucléaires (PNNs) et les macrophages, jouent un rôle important dans la défense de l'hôte contre *S. agalactiae*. Une déficience ou une immaturité combinée de ces défenses immunitaires chez le nouveau-né et chez les personnes âgées contribue à leur sensibilité accrue aux infections à *S. agalactiae* (Castle, 2000, Kallman *et al*., 1998).

### IV.1.1 Le complément

Le complément est un des principaux acteurs de la réponse immunitaire contre les infections bactériennes. Il joue un rôle critique dans la défense de l'hôte contre *S. agalactiae.* Ainsi, Wessels *et al*. ont montré que dans des modèles d'infections murins, des souris déficientes en composant C3 du complément sont significativement plus sensibles à *S. agalactiae* que les souris sauvages correspondantes (Wessels *et al*., 1995). Dès la première semaine de gestation, les constituants du complément peuvent être détectés dans le sérum fœtal, toutefois leur quantité reste faible jusqu'au début du troisième trimestre de la grossesse où elle atteint 50 à 75% de la quantité maternelle, l'augmentation étant proportionnelle à l'âge gestationnel (Fleer *et al*, 1988).

### IV.1.2 Les immunoglobulines

Les anticorps sont nécessaires à une opsonisation adéquate et à la protection contre *S. agalactiae*. Ainsi, les anticorps dirigés contre l'antigène spécifique de type capsulaire se sont avérés essentiels pour une réponse immunitaire protectrice dans des modèles animaux. Le nouveau-né à terme produit uniquement des IgM et IgA à des taux faibles. La quantité d'IgG dans le sérum foetal est proportionnelle à l'âge gestationnel. Environ 66% des IgG maternelles sont transmises au fœtus par voie transplacentaire de la 34$^{ème}$ à la 36$^{ème}$ semaine de grossesse (Lin *et al*., 2001, Lin *et al*., 2004). Ainsi, une colonisation maternelle tardive par *S. agalactiae* ne permet pas la transmission d'anticorps protecteurs au fœtus (Christensen, 1988). De plus, la sévérité de l'infection néonatale à *S. agalactiae* est corrélée à une déficience du mécanisme d'opsonisation des IgG transplacentaires par rapport aux IgG maternelles (Fleer *et al*., 1988). Des complexes immuns IgM- ou IgG- antigène spécifique de type capsulaire ont été détectés chez des nouveau-nés atteints de méningite à *S. agalactiae* de sérotype III. Le rôle de ces complexes immuns dans la pathogénie des infections à *S. agalactiae* n'a pas été élucidé ; toutefois leur implication dans l'activation des réactions inflammatoires chez l'hôte, induisant la gravité des infections bactériennes à *S. agalactiae* a été suggéré (Vallejo *et al*., 1994).

### IV.1.3. Les cellules phagocytaires

Une réduction fonctionnelle de la phagocytose et de l'opsonisation de *S. agalactiae* par les PNNs des nouveau-nés prématurés par rapport à celles de l'adulte ont été observées (Källman *et al*., 1998). La lyse intracellulaire de *S. agalactiae*, mais non pas de *S. pyogenes* ou d' *E. coli*, par les PNNs et les monocytes présents dans le sang placentaire est significativement réduite par rapport à celle de l'adulte, ce qui pourrait expliquer en partie la fréquence des infections à *S. agalactiae* chez les nouveau-nés (Henneke et Berner, 2006, Marodi *et al*., 1984). De plus, Martin *et al*. ont montré que les macrophages alvéolaires des rats nouveau-nés phagocytaient moins efficacement *S. agalactiae* que les macrophages d'adultes (Martin *et al*., 1992). Egalement, une diminution de l'activité des PNNs et de la réponse inflammatoire ont été démontrés chez les personnes âgées (Amaya *et al*., 2004,

Edwards et Baker, 2005) ainsi qu' un dysfonctionnement des cellules T (Castle, 2000).

## IV.2 Facteurs de virulence de *S. agalactiae*

La physiopathologie des infections à *S. agalactiae* implique que cette bactérie puisse (i) adhérer à et/ou envahir différents types de cellules épithéliales (en particulier, les cellules vaginales, les cellules de la barrière fœto-placentaire et les cellules pulmonaires) et celles formant l'endothélium en particulier celui de la barrière hémato-méningée ; (ii) échapper à la réponse immunitaire de l'hôte à différents niveaux du processus infectieux ; (iii) s'adapter rapidement à des conditions environnementales différentes. En effet, *S. agalactiae* est doté d'un véritable arsenal de facteurs de virulence. Exprimés à la surface bactérienne ou sécrétés dans l'environnement proche de *S. agalactiae,* ils contribuent à la virulence de la bactérie et lui confèrent une forte faculté d'adaptation à son environnement infectieux. Ils interviennent à chaque étape du processus pathologique, de l'adhésion à l'épithélium vaginal à l'invasion du système nerveux central du nouveau-né. Ci-après, ne sont décrits que les principaux facteurs :

### IV.2.1 La capsule

Principal facteur de virulence de *S. agalactiae*, la capsule est formée par différents arrangements de quatre sucres : le glucose, le galactose, la N-acétylglucosamine et l'acide N-acetylneuraminique ou acide sialique, formant ainsi une sous-unité unique et répétée. La structure finale contient un acide sialique terminal lié au galactose par une liaison α2-3 (Cieslewicz *et al*., 2005). Cet acide sialique est identique à un épitope sucré très largement réparti à la surface des cellules eucaryotes, et même surexprimé à la surface des cellules humaines (Angata et Varki, 2002, Carlin *et al*., 2007). Il est impliqué dans de nombreux processus biologiques et notamment la communication intercellulaire ou la reconnaissance par la cellule de molécules de petite taille (Severi *et al*., 2007). On peut donc supposer que *S. agalactiae* a évolué de façon à ressembler à son hôte afin de ne pas être reconnu par le système immunitaire.

La capsule polysaccharidique permet de protéger la bactérie de la réponse immunitaire de diverses manières. Tout d'abord, grâce au mimétisme moléculaire dû à l'acide sialique terminal, mais aussi en limitant l'opsonisation de la bactérie par inhibition de la fixation de la fraction C3 du complément sur celle-ci (Carlin *et al*., 2007, Marques *et al*., 1992). Ainsi, l'action d'une sialidase sur des souches de *S. agalactiae* de sérotype III, ou l'utilisation de mutants non capsulés ou présentant une capsule mais dépourvue d'acide sialique, entraînent une perte de la virulence dans un modèle animal de rat nouveau-né, et induisent une augmentation de l'opsonisation et de la phagocytose des bactéries par les neutrophiles humains (Marques *et al*., 1992, Martin *et al*., 1992). Par ailleurs, la capsule polysaccharidique rend les composants de la paroi bactérienne, capables de déclencher la réponse immune, moins accessibles aux cellules immunitaires.

Les gènes impliqués dans la production de la capsule sont regroupés dans la même région chromosomique et forment l'opéron *cps.* Cet opéron est constitué de seize gènes (*cpsA* à *L* et *neuA* à *D*) tous impliqués dans la synthèse de la capsule. Quelque soit le sérotype, l'organisation générale de l'opéron *cps* est la même. Le sérotype III possède en 5' un gène additionnel, le régulateur transcriptionnel *cpsY*, de transcription monocistronique divergente (Chaffin *et al*., 2000). La région en 5' de l'opéron *cps* regroupe les gènes impliqués dans la régulation, l'élongation et le transport de la chaîne sucrée, la région centrale (sérotype-spécifique) regroupe les gènes impliqués dans la polymérisation de la sous-unité unique et répétée, et la région 3' regroupe les gènes impliqués dans la synthèse et l'activation de l'acide sialique (Cieslewicz *et al*., 2001).

## IV.2.2. Les produits du locus *cyl*

### IV.2.2.1 La ß-Hémolysine/cytolysine (ß-H/C)

Codée par le gène *cylE* (Pritzlaff *et al*., 2001), et produite par la majorité des souches de *S. agalactiae*, la ß-H/C est responsable de l'hémolyse ß observée en culture sur gélose au sang. L'expression de cette protéine dépend également d'autres gènes faisant partie du locus *cyl* comme *cylA*, *cylB*, *cylJ* et *cylK* qui sont impliqués dans la modification post traductionnelle et dans la sécrétion de ß-H/C (Forquin *et al*., 2007, Gottschalk *et al*., 2006). La ß-H/C est une toxine exposée à la

surface des bactéries qui perfore les membranes cellulaires, facilitant ainsi la dissémination de la bactérie et à dose sublytique l'invasion cellulaire (Nizet *et al*., 1996). De ce fait, la capacité in vitro des mutants ß-H/C- de lyser et d'envahir les cellules alvéolaires épithéliales et endothéliales pulmonaires ainsi que les cellules endothéliales cérébrales, est significativement diminuée en comparaison des souches sauvages (Gibson *et al*., 1999, Nizet *et al*., 1996, Nizet *et al*., 1997). La ß-H/C active également l'excrétion de cytokines déclenchant ainsi le processus inflammatoire (Doran *et al*., 2002). Ces propriétés cytolytiques, pro-invasives et pro-inflammatoires sont neutralisées par les composants phospholipidiques du surfactant pulmonaire (Doran *et al*., 2002). Ceci pourrait expliquer en partie la fréquence des atteintes pulmonaires et invasives chez les nouveau-nés prématurés dont le surfactant est immature. De plus, des mutants ß-H/C- se sont montrés moins virulents dans plusieurs modèles animaux d'infections incluant septicémie et pneumonie en comparaison des souches sauvages (Hensler *et al*., 2005 ; Puliti *et al*., 2000).

#### IV.2.2.2 Le pigment ß-caroténoïde

Le pigment caroténoïde, codé par le locus *cyl*, colore les colonies en orange et constitue une barrière physique de surface, permettant ainsi la survie de *S. agalactiae* au contact des molécules oxydantes des phagolysosomes au sein des macrophages (Liu *et al*., 2004). De plus, des souches hyper pigmentées ont montré une plus grande virulence dans un modèle d'infection murin par rapport aux autres souches (Liu *et al*., 2004).

### IV.2.3 Le facteur CAMP

Codée par le gène *cfb*, cette protéine excrétée est capable de lier la région Fc des IgG et IgM de diverses espèces de mammifères (homme, lapin, souris, bovin) *via* une réaction non immune (Jurgens *et al*., 1987). Cette interaction non spécifique pourrait masquer d'autres antigènes de surface vis-à-vis d'immunoglobulines. Sans action hémolytique directe, le facteur CAMP présente une activité co-cytolysine avec l'hémolysine ß de *Staphylococcus aureus* sur une variété de globules rouges en formant des pores au niveau des membranes des cellules hôtes (Lang et Palmer,

2003). Son administration par voie intraveineuse est létale dans des modèles expérimentaux animaux (Skalka et Smola, 1981).

### IV.2.4 La hyaluronate lyase

Codée par le gène *hylB*, la hyaluronate lyase est sécretée en concentration plus importante chez les souches virulentes, notamment du sérotype III, que chez les souches de portage (Lin *et al*., 1994, Musser *et al*., 1989). Elle clive l'acide hyaluronique, composant essentiel du tissu conjonctif, permettant ainsi la dissémination dans l'organisme (Mello *et al*., 2002).

### IV.2.5 La protéine SodA

Outre le pigment ß-caroténoïde, la superoxide dismutase manganèse-dépendante (Mn-SodA) permet à *S. agalactiae* de tolérer l'oxygène environnemental ou la présence de formes réactives de l'oxygène (Poyart *et al*., 2001a). SodA convertit les superoxydes en oxygène moléculaire $O_2$ et en péroxyde d'hydrogène $H_2O_2$, qui sera ensuite métabolisé par des catalases ou des péroxydases (Poyart *et al*., 2001a). Cette détoxification permet à la bactérie de résister au stress oxydatif mis en place à l'intérieur du phagosome pour détruire les bactéries et par conséquent joue un rôle dans la pathogénie de *S. agalactiae*. Ainsi un mutant SodA- présente une sensibilité accrue à la phagocytose par des macrophages murins en comparaison de la souche sauvage (Poyart *et al*., 2001a). De plus, il est éliminé plus rapidement que la souche sauvage du sang de souris infectées par voie intraveineuse (Poyart *et al*., 2001a).

### IV.2.6 La protéine C

La proteine C, également appelée antigène C, est une protéine de surface composée de deux antigènes, alpha et bêta, qui sont synthétisés indépendamment l'un de l'autre et exprimés chez la plupart des souches de sérotype Ia, Ib, et II, mais exceptionnellement chez les souches de sérotype III et rarement chez les souches de sérotype V (Madoff *et al.,* 1991, Manning *et al*., 2006). L'antigène alpha, codé par le gène *bca*, possède, à son extrémité N-terminale, un peptide signal de 41 acides

aminés suivi d'un motif peptidique de 82 résidus répété en tandem responsable des variations de taille et d'immunogénicité de cette protéine. A son extrémité C-terminale, une séquence peptidique caractéristique d'ancrage au peptidoglycane et à la membrane bactérienne (Madoff *et al.,* 1996, Michel *et al.,* 1992). L'antigène alpha C permet la liaison avec des intégrines (α1ß1) présentes à la surface cellulaire (Bolduc et Madoff, 2007). Il est impliqué également dans l'invasion cellulaire. Ainsi, l'invasion de lignées épithéliales cervicales (ME180) par un mutant isogénique alpha C- est significativement diminuée en comparaison de celle de la souche sauvage (Bolduc *et al*., 2002). De plus, la virulence d'une souche mutante alpha C- est considérablement diminuée dans un modèle d'infection murin (Li *et al.,* 1997b).

L'antigène bêta possède, à son extrémité N-terminale, un peptide signal de 37 acides aminés suivi de motifs peptidiques répétés riches en résidus proline et, à son extrémité C-terminale, une séquence peptidique caractéristique d'ancrage au peptidoglycane et à la membrane bactérienne. Deux domaines peptidiques, A et B, sont impliqués dans la fixation des IgA via une réaction non immune (Jerlstrom *et al*., 1991). Cette interaction non spécifique pourrait masquer d'autres antigènes de surface vis-à-vis d'immunoglobulines et empêche probablement l'interaction avec le complément bloquant ainsi la phagocytose de la bactérie (Jerlstrom *et al*., 1996). Les deux protéines alpha et bêta injectées à la souris, dans le cadre d'un protocole vaccinal, ont entraîné la production d'anticorps protecteurs (Michel *et al*., 1991).

### IV.2.7 La protéine Rib

La protéine Rib (Resistance to proteases, immunity, group B) est également une protéine de surface avec des séquences répétées. Elle est exprimée chez la majorité des souches de sérotype III mais aussi chez de nombreuses souches de sérotype II et quelques unes de sérotype V (Stalhammar-Carlemalm *et al*., 1993, Manning *et al*., 2006). La protéine Rib présente des homologies structurales avec d'autres protéines de surface, notamment, la protéine alpha (Wastfelt *et al*., 1996). Elle possède comme la protéine alpha, un motif peptidique répétée 12 à 14 fois. Injectée à la souris, la protéine Rib entraîne une bonne réponse immunitaire de type IgG (Larsson *et al*., 1996).

### IV.2.8 La protéine Srr

La protéine Srr (Serine-rich repeat) possède, à son extrémité N-terminale, un peptide signal de 50 acides aminés suivi d'une large région Srrs et, à son extrémité C-terminale, une séquence peptidique d'ancrage caractéristique des protéines de surface (Seifert *et al*., 2006). Deux variants de Srr ont été décrits. Ainsi, les souches de *S. agalactiae* de sérotype Ia, Ib, II, V et certaines de sérotype III expriment la protéine Srr1, alors que les souches de sérotype III qui appartiennent à la lignée ˝hyper-invasive˝ ST-17, expriment la protéine Srr2 (Seifert *et al*., 2006, Brochet *et al*., 2006). L'alanine, la thréonine et la méthionine alternent avec la sérine dans la région Srrs de la protéine Srr1 (Seifert *et al*., 2006). La valine, l'isoleucine, la thréonine, l'asparagine et l'acide glutamique alternent avec la sérine dans la région Srrs de la protéine Srr2 (Seifert *et al*., 2006). Ces deux protéines présentent moins de 20% d'homologie. Les gènes qui codent pour ces proteines font partie du locus *secA2* (Brochet *et al*., 2006, Mistou *et al*., 2009, Seifert *et al*., 2006). La protéine Srr1 est synthétisée sous forme d'un précurseur glycosylé, est sécrétée par le système SecA2 et est ensuite ancrée à la paroi bactérienne par la sortase A (Mistou *et al*., 2009). Srr1 joue un rôle important dans l'adhésion de *S. agalactiae* à la kératine humaine K4 (Samen *et al*., 2007) et dans l'adhésion cellulaire. Ainsi, des mutants Srr1- adhèrent significativement moins aux lignées épithéliales humaines (HEp-2, TC7 et A549) en comparaison de leurs souches sauvages (Samen *et al*., 2007, Mistou *et al*., 2009). De plus, un mutant Srr1- s'est montré moins virulent dans un modèle animal du rat nouveau-né (Mistou *et al*, 2009). Le rôle de Srr1 a aussi été mis en évidence dans l'invasion des cellules endothéliales vasculaires du cerveau humain (HBMEC) ce qui suggère que Srr1 participe au passage de la barrière hémato-méningée permettant l'entrée des bactéries dans le système nerveux central lors des infections neuroméningées du nouveau-né (van Sorge *et al*., 2009). La synthèse de la protéine Srr1 est dépendante du régulateur transcriptionnel Rga situé en 5' du locus *secA2* (Mistou *et al*., 2009). Le rôle de la protéine Srr2 et son implication dans la pathogénicité des souches de *S. agalactiae* appartenant à la lignée ST-17 n'ont pas été évalués.

### IV.2.9 La protéine BibA

La protéine BibA (immunogenic bacterial adhesin) est exprimée chez toutes les souches de *S. agalactiae* soit sous forme de protéine de surface, soit sous forme secrétée (Santi *et al*., 2007 ; Santi *et al*., 2009). BibA est capable de lier la fraction C4b du complément, régulateur de la voie classique. Ainsi, un mutant isogénique BibA-, s'est montré plus sensible à la phagocytose *in vitro* par les leucocytes humains en présence de sérum non immun et sa survie est significativement diminuée *ex vivo* dans le sang humain en comparaison de celle de la souche sauvage. De plus, sa virulence est considérablement diminuée dans un modèle d'infection murin (Santi *et al*., 2007). Par ailleurs, le mutant BibA- adhère significativement moins aux cellules épithéliales pulmonaires (A549) et cervicales (ME180). De plus, Mereghetti *et al*. ont montré que l'expression du gène codant la protéine BibA, *bibA (ou gbs2018*), est activée en contact du sang humain (Mereghetti *et al*, 2008a).

Dans le cadre d'un protocole vaccinal, la protéine BibA purifiée injectée à la souris, a permis d'obtenir des anticorps protecteurs. Le développement d'un vaccin fondé sur cette protéine reste prometteur (Santi *et al*., 2009).

### IV.2.10 Les acides lipoteichoiques

La D-alanylation des acides lipoteichoiques (LTAs) permet aux bactéries à Gram positif de moduler leur charge de surface, de réguler la fixation de ligands et de contrôler les propriétés électromécaniques de leur paroi. Chez *S. agalactiae*, l'incorporation des résidus D-Ala dans les LTAs requiert l'activité de 4 protéines (DltABCD) codées par l'opéron *dlt* (Poyart *et al*., 2001b, Poyart *et al*., 2003b) Ainsi, un mutant isogénique DltA- dont la surface cellulaire est chargée plus négativement que la souche sauvage, présente une sensibilité accrue aux défensines (ou peptides antimicrobiens cationiques) humaines et animales (Poyart *et al*., 2003b). Cette souche mutante est également plus sensible que la souche sauvage à la lyse par des macrophages murins et par des neutrophiles humains (Poyart *et al*., 2003b). De plus, sa virulence est considérablement diminuée dans des modèles d'infection de la souris et du rat nouveau-né (Poyart *et al*., 2003b, Poyart *et al*., 2001b). Ce mutant est éliminé plus rapidement que la souche sauvage des poumons de souris infectées par

voie intra-nasale, et par conséquent, est incapable d'induire une pneumonie. Sa survie dans le sang et le cerveau de souris infectées par voie intraveinale est significativement diminuée (Poyart *et al*., 2003b).

### IV.2.11 La protéine ScpB ou C5a peptidase

Le gène *scpB* de *S. agalactiae* présente 97% d'homologie avec le gène *scpA* des streptocoques du groupe A (Cleary *et al*., 1992). Il est présent chez quasiment toutes les souches humaines de *S. agalactiae* et rarement chez les souches bovines (Bohnsack *et al*., 2000, Duarte *et al*., 2005, Franken *et al*., 2001). Afin de montrer son importance dans les infections humaines à *S. agalactiae*, Gleich-Theurer *et al*. ont étudié *in vitro* l'activité du promoteur du gène *scpB* et ont montré son activation en présence de sérum humain et non bovin (Gleich-Theurer *et al*., 2009).

ScpB est une protéine de surface possédant à son extrémité C-terminale un motif de liaison au peptidoglycane (Beckmann *et al*., 2002) et est ancrée à la paroi bactérienne par la sortase A (Lalioui *et al*., 2005). C'est une protéine bifonctionnelle : clivant le composé C5a du complément par son activité C5a peptidase (sérine-protéase), c'est également une adhésine et/ou invasine permettant la liaison des bactéries à la fibronectine, glycoprotéine de la matrice extracellulaire (Beckmann *et al*., 2002) (Cheng *et al*., 2001a). Ainsi un mutant ScpB- se lie significativement moins à la fibronectine en comparaison de la souche sauvage (Beckmann *et al*., 2002). L'invasion des cellules pulmonaires A549 par *S. agalactiae* est significativement diminuée en présence d'anticorps anti-ScpB, suggérant que la protéine ScpB est une invasine (Cheng *et al*., 2001a). Ceci a été confirmé par l'utilisation d'un mutant ScpB- dont l'invasion des cellules épithéliales pulmonaires et laryngées (A549 et HEp-2) a été fortement réduite par rapport à la souche sauvage (Cheng *et al*., 2001a).

Par l'inactivation de l'élément C5a du complément, chemoattractant des polynucléaires neutrophiles produit durant l'activation du complément, ScpB contribue à la virulence de *S. agalactiae* et joue un rôle majeur dans le blocage de la réponse pro- inflammatoire (Bohnsack *et al*., 1991, Cleary *et al*., 1992). L'étude de la lyse *in vitro* par des macrophages murins et des neutrophiles humains de souches de *S. agalactiae* de sérotype Ia, Ib, II, III, et V préincubées avec des anticorps anti-ScpB, montre que la protéine ScpB protège la bactérie contre l'opsonisation précédant la phagocytose (Cheng *et al*., 2001b). Un mutant ScpB- est éliminé plus

rapidement que la souche sauvage des poumons de souris infectées par voie intra-nasale (Cheng *et al*., 2002). L'activité C5a-ase est variable selon les souches. Takahashi *et al*. ont montré que certaines souches de sérotype III, présentant le profil de restriction RDP III-3b (voir chapitre II.2.1), ont une activité C5a-ase faible voire nulle (Takahashi *et al*., 1998). Le séquençage du gène *scpB* de ces souches a mis en évidence une délétion de 12 nucléotides qui inactive la fonction C5a-ase alors que la capacité de liaison à la fibronectine demeure inaltérée (Bohnsack *et al*., 2000, Tamura *et al*., 2006).

La protéine ScpB purifiée injectée seule ou conjuguée à l'antigène capsulaire de type III à la souris, dans le cadre d'un protocole vaccinal, a permis d'obtenir des anticorps protecteurs dirigés contre cette protéine (Cheng *et al*., 2002).

### IV.2.12 La protéine Lmb

Lmb est une lipoprotéine associée à la membrane bactérienne; elle comporte une séquence signal de 20 acides aminés à son extrémité N-terminale, deux domaines transmembranaires et un domaine exposé à priori en surface et qui contient un motif de liaison à la laminine humaine, glycoprotéine majoritaire de la lame basale (Spellerberg *et al*., 1999a). Lmb présente un haut degré d'homologie avec la famille d'adésines LraI de *S. pyogenes* (Elsner *et al.,* 2002, Spellerberg *et al*., 1999a, Terao *et al*., 2001). Le gène *lmb* est présent chez quasiment toutes les souches humaines de *S. agalactiae* et rarement chez les souches bovines (Bohnsack *et al*., 2000, Duarte *et al*., 2005, Franken *et al*., 2001). Un mutant Lmb- se lie significativement moins à la laminine en comparaison de la souche sauvage (Spellerberg *et al.*, 1999a). La liaison à la laminine pourrait permettre l'adhésion des bactéries à l'épithélium pulmonaire endommagé suivi du passage dans le système sanguin. La protéine Lmb est impliquée également dans l'invasion des cellules endothéliales vasculaires du cerveau humain (HBMEC) participant ainsi à l'entrée des bactéries dans le système nerveux central lors des infections neuroméningées du nouveau-né (Tenenbaum *et al*., 2007).

## IV.2.13 Les protéines de liaison au fibrinogène

Le fibrinogène est une glycoprotéine abondante dans le plasma sanguin où elle est impliquée dans les mécanismes de la coagulation et d'hémostase. Elle est également retrouvée dans la matrice extracellulaire et sa synthèse est considérablement augmentée au cours des phénomenes inflammatoires et infectieux. L'adhésion aux cellules de l'hôte des bactéries possédant des molécules de liaison au fibrinogène s'effectue *via* leur liaison au fibrinogène. Le fibrinogène est capable de s'unir à des récepteurs (intégrines) situés à la surface des cellules (D'Souza *et al*., 1991). Il sert ainsi de pont entre les cellules bactériennes et l'hôte, favorisant la colonisation et l'invasion de ce dernier. *S. agalactiae* possède deux protéines de liaison au fibrinogène nommées FbsA et FbsB.

### IV.2.13.1 La protéine FbsA

FbsA est une protéine exposée à la surface des bactéries grâce à une séquence peptidique à son extrémité C-terminale caractéristique d'ancrage d'une part au peptidoglycane, d'autre part à la membrane bactérienne (Rivera *et al*., 2007, Schubert *et al*., 2002) (Figure 3). Elle possède à son extrémité N-terminale un peptide signal de 35 acides aminés suivi d'un motif peptidique de 16 résidus (habituellement GNVLERRQRDAENRSQ) répété de 3 à 30 fois selon les souches. Le motif peptidique répété constitue la majeure partie de cette protéine et est responsable de la liaison au fibrinogène. Le domaine de liaison au fibrinogène de FbsA est considéré comme le plus petit motif de liaison identifié jusqu'à présent et ne présente pas d'homologie avec d'autres motifs de liaison au fibrinogène connus chez les bactéries à Gram positif (Rivera *et al.*, 2007, Schubert *et al*., 2002).

La taille de la protéine FbsA varie de 185 à 617 acides aminés environ, en fonction du nombre de répétitions. A l'aide d'un peptide synthétique composé d'une unique répétition, il a été montré que ce motif de 16 acides aminés permet la liaison au fibrinogène humain sous forme native (Schubert *et al*., 2002). Il apparaît que les souches possédant entre 4 et 7 répétitions sont significativement plus adhérentes que les autres (Rosenau *et al*., 2007). Il existe une forme tronquée de FbsA. Cette forme ne possède qu'une seule répétition et est inactivée par une mutation ponctuelle, laissant supposer que cette forme tronquée n'est pas exprimée (Brochet *et al*., 2006, Schubert *et al*., 2002).




**Figure 3. Représentation schématique de la protéine FbsA.**

Le domaine de liaison au fibrinogène de la protéine FbsA est formé d'un motif de 16 acides aminés répété de 3 à 30 fois selon les souches. W, wall-spanning région est la région enclavée dans la paroi. LPKTG, est le motif d'ancrage au peptidoglycane. M, Membrane-spanning région est la région de fixation à la membrane (Schubert *et al*., 2002).

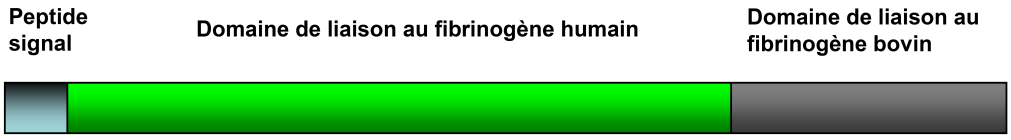



**Figure 4. Représentation schématique de la protéine FbsB.**

La protéine FbsB possède un domaine de liaison au fibrinogène humain de 388 acides aminés et en C-terminal, un domaine de liaison au fibrinogène bovin de 223 acides aminés (Gutekunst *et al*., 2004, Jacobsson *et al*., 2003).

La délétion du gène *fbsA* réalisée sur cinq souches possédant un nombre variable de répétitions (3, 10, 17, 19 ou 30 répétitions), diminue de façon drastique leur liaison au fibrinogène ainsi qu'à la lignée cellulaire épithéliale pulmonaire A549. De même l'invasion de ces cellules est amoindrie. Ces propriétés sont restaurées après complémentation par le gène *fbsA* via un vecteur d'expression (Schubert *et al*., 2004). En outre l'expression du gène *fbsA* chez *Lactococcus lactis* lui confère des propriétés d'adhésion au fibrinogène et aux cellules A549 (Schubert *et al*., 2004). Ceci laisse supposer le rôle de FbsA dans le développement des infections pulmonaires chez le nouveau-né en permettant l'adhésion de la bactérie à l'épithélium pulmonaire (Schubert *et al*., 2004). Le rôle de FbsA a aussi été mis en évidence dans l'adhésion aux cellules endothéliales vasculaires du cerveau humain (HBMEC) ce qui suggère qu'elle participe au passage de la barrière hémato méningée et à l'entrée dans le système nerveux central lors des infections neuroméningées du nouveau-né (Tenenbaum *et al*., 2005). De plus, FbsA joue un rôle dans la protection de la bactérie contre l'opsonisation précédant la phagocytose (Pierno *et al*., 2006 Schubert *et al*., 2002). Le rôle de FbsA dans la virulence *in vivo* a également été montré. Ainsi, l'inoculation intra articulaire à des souris d'un mutant FbsA- entraîne une diminution de la gravité des arthrites et de la mortalité en comparaison de la souche sauvage (Jonsson *et al*., 2005). Enfin, la fixation du fibrinogène par FbsA stimule l'agrégation plaquettaire: FbsA se lie au fibrinogène qui se lie par la suite à des intégrines présentes à la surface des plaquettes formant ainsi un réseau de bactéries/plaquettes (Pietrocola *et al*., 2005). L'agrégation plaquettaire contribue à la formation de thrombus, de ce fait, Pietrocola *et al*. suggèrent le rôle de FbsA dans le développement des endocardites à *S. agalactiae* (Pietrocola *et al*., 2005).

#### IV.2.13.2 La protéine FbsB

FbsB apparaît comme étant une protéine secrétée et exposée à la surface bien qu'elle ne posséde pas de liaison covalente avec la membrane et la paroi bactériennes (Gutekunst *et al*., 2004). Elle se lie au fibrinogène mais ne présente pas d'homologie avec FbsA. Codée par le gène *fbsB*, cette protéine est aussi connue sous le nom de FgagV2 (Jacobsson, 2003) ou encore FbsB2 dont il existe un variant, FbsB2b qui présentent 97,6% d'identité avec FbsB (Brochet *et al*., 2006). FbsB possède à son extrémité N-terminale un peptide signal de 27 acides aminés, suivi

d'un domaine de 388 acides aminés impliqué dans la liaison au fibrinogène humain (Gutekunst *et al*., 2004), et en C-terminal, 223 acides aminés impliqués dans la liaison au fibrinogène bovin (Devi et Ponnuraj., 2010, Jacobsson, 2003) (Figure 4). Diverses souches *de S. agalactiae* humaines et bovines n'ont pas le gène *fbsB senso stricto* mais possèdent des variants appelés *fgag* (*fgag*V1 et *fgag*V3). Ces différents variants Fgag (Jacobsson, 2003) n'ont pas les 388 acides aminés de FbsB qui permettent la liaison au fibrinogène humain mais présentent une séquence signal identique et une région C-terminale quasi identique qui leur permet toujours la liaison au fibrinogène bovin. Brochet *et al*. ont nommé ces variants FbsB1 et FbsB3 et ont identifié deux autres variants FbsB4 et FbsB5 qui n'ont également pas le domaine de liaison au fibrinogène humain (Brochet *et al*., 2006).

Il a été montré pour une souche pourvue à la fois d'un gène *fbsB* et d'un gène *fbsA* responsable d'une forte activité de liaison au fibrinogène que la délétion du gène *fbsB* ne modifie pas l'adhésion aux cellules A549 mais diminue leur invasion. Après recomplémentation de la souche à l'aide d'un vecteur plasmidique d'expression contenant le gène *fbsB*, l'activité d'invasion des cellules est totalement restaurée. Gutekunst *et al*. ont ainsi déduit que FbsB aurait principalement un rôle d'invasine et que son rôle dans l'adhésion au fibrinogène et aux cellules épithéliales serait mineur par rapport à celui de FbsA (Gutekunst *et al*., 2004). Par ailleurs, l'étude d'une collection de 111 souches d'origine humaine (portage ou infection) montre que 49,5% de ces souches possèdent le gène *fbsB* décrit par Gutekunst *et al*. les souches restantes possédant un variant *fgag* ; 81,1% des souches possèdent un gène *fbsA* complet avec 2 à 26 répétitions, les souches restantes possédant un gène *fbsA* tronqué. Cette étude montre que les souches possédant les gènes *fbsA* et *fbsB* sont significativement plus adhérentes au fibrinogène que les souches ne possédant que *fbsA*. Il apparaît de plus que les propriétés de liaison au fibrinogène sont équivalentes pour les souches possédant seulement le gène *fbsA* et pour celles possédant un gène *fbsA* tronqué. Par ailleurs, parmi ces 111 souches, la présence d'un gène *fbsA* tronqué est corrélée à l'absence de *fbsB* (Rosenau *et al*., 2007). Ces travaux sont donc en faveur d'un rôle important de *fbsB* dans la liaison au fibrinogène humain, ce qui est en opposition avec les travaux de Schubert *et al.* et de Gutekunst *et al*. qui considèrent que FbsA est la principale protéine impliquée dans l'adhésion de *S. agalactiae* au fibrinogène humain (Gutekunst *et al*., 2004, Schubert *et al*., 2002).

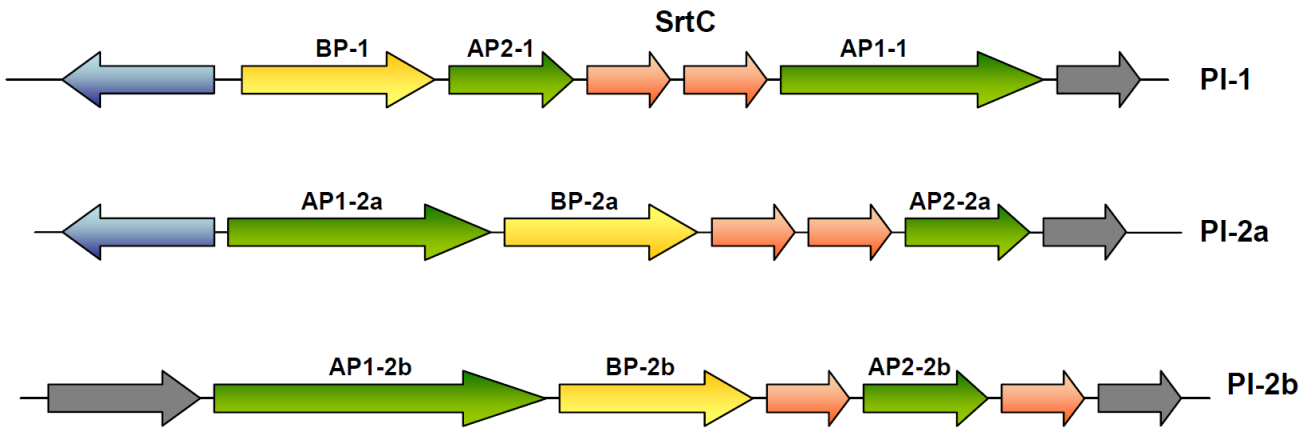



**Figure 5. Représentation schématique des Pilus Islands (PI) de *S. agalactiae.***

Les gènes codant pour les trois protéines structurales de pilus portant un motif LPXTG sont représentés : en jaune, la protéine majeure de pilus ou backbone “BP” et en vert, les deux protéines auxiliaires : AP1 et AP2. Les gènes codant pour les sortases C sont représentés en orange. Les régulateurs transcriptionnels sont représentés en bleu (image d’après Nobbs *et al*., 2008 et Margarit *et al*., 2009).

### IV.2.14 Les pili

Les pili sont des filaments protéiques s'étendant hors de la paroi bactérienne qui ont été récemment décrits. Deux loci distincts, PI-1 et PI-2, sont impliqués dans la biosynthèse de pili chez *S. agalactiae* (Dramsi *et al*., 2006, Lauer *et al*., 2005, Rosini *et al*., 2006). Le locus PI-2 existe sous forme de deux variants, PI-2a et PI-2b (Dramsi *et al*., 2006, Rosini *et al*., 2006). PI-1 et PI-2 possèdent une organisation génétique similaire (Figure 5). En effet, chaque locus est constitué de 2 gènes de sortases C impliquées dans l'assemblage et la polymérisation des composants du pilus (*srtC1-srtC2* pour PI-1 et *srtC3-srtC4* pour PI-2), flanqués de 3 gènes codant pour les protéines structurales du pilus qui possèdent toutes un motif d'ancrage au peptidoglycane LPXTG (Figure 5) : un composant majeur "backbone" (BP) et 2 composants mineurs ou auxiliaires (AP1 et AP2). Ces 3 protéines se polymérisent pour former des pili (Dramsi *et al*., 2006, Rosini *et al*., 2006). L'ancrage des pili à la surface bactérienne est sous le contrôle d'une autre sortase (dont le gène ne fait pas partie des loci PI), la sortase A qui permet l'ancrage de la protéine AP2-2a au peptidoglycane (Dramsi *et al*., 2006, Konto-Ghiorghi *et al*., 2009, Nobbs *et al*., 2008). PI-1 et PI-2a possèdent à leur extrémité 5' un régulateur transcriptionnel divergent (Figure 5). L'expression des gènes codant AP1-2a, BP-2a et AP2-2a, est activée par le régulateur transcriptionnel RogB situé en 5' du locus PI-2a (Dramsi *et al*., 2006, Gutekunst *et al*., 2003).

L'analyse de la distribution des gènes de pili dans une collection de 289 souches de *S. agalactiae* montre que toutes les souches étudiées possédent au moins 1 de ces 3 loci et que 94% de ces souches expriment des pili à leur surface (Margarit *et al*., 2009). En effet, PI-1 est présent chez 72% des souches, et PI-2 est présent chez toutes les souches sous forme PI-2a (73%), ou PI-2b (27%). La combinaison PI-1 avec PI-2a est la plus fréquente (46%) (Margarit *et al*., 2009). Une certaine corrélation entre la présence d'une combinaison particulière de PI et le sérotype des souches est observée. De fait, la plupart des souches de sérotype Ia (91%) ne contiennent que PI-2a, la majorité des souches de sérotype Ib (85%) et V (96%) possèdent PI-1 et PI-2a, alors que 30% des souches de sérotype III contenaient PI-1 et PI-2a, et 70% contiennent PI-1 et PI-2b. Enfin, les souches de sérotype II sont associées à PI-2a (Margarit *et al*., 2009).

La protéine auxiliaire AP1-2a joue un rôle d'adhésine. Ainsi, des mutants AP1-2a- adhèrent significativement moins aux cellules épithéliales pulmonaires et intestinales (A549, TC7) (Dramsi *et al*., 2006, Konto-Ghiorghi *et al*., 2009) et aux cellules endothéliales micro vasculaires de cerveau humain (Maisey *et al*., 2007) en comparaison des souches sauvages correspondantes (Maisey *et al*., 2007). Les pili sont impliqués également dans la formation de biofilms. Ainsi, la capacité des mutants AP1-2a- et BP-2a- (de la souche NEM316) de former un biofilm est considérablement diminuée en comparaison de la souche sauvage (Konto-Ghiorghi *et al*., 2009). Récemment, Rinaudo *et al*. ont montré que l'implication de pili dans la formation de biofilm de *S. agalactiae* est une propriété spécifique des pili PI-2a. Ces auteurs montrent également que contrairement à ce qui a été décrit par Konto-Ghiorghi *et al*. (Konto-Ghiorghi *et al*., 2009), la délétion de la protéine auxiliaire AP1-2a ne modifie pas la capacité de formation de biofilm de la souche de *S. agalactiae* 515 alors que la délétion de AP2-2a- et BP-2a- diminue de façon drastique cette capacité (Rinaudo *et al*., 2010). Par ailleurs, Maisey *et al*. ont montré qu'un mutant BP-2a- présentait une sensibilité accrue aux défensines (ou peptides antimicrobiens cationiques) humaines. Cette souche mutante s'est montrée plus sensible que la souche sauvage à la phagocytose *in vitro* par des macrophages murins et des neutrophiles humains et moins virulente dans un modèle d'infection murin (Maisey *et al*., 2008b).

Dans le cadre d'un protocole vaccinal, les protéines structurales de pilus codées par les 3 locis de pili, BP-1 et AP1-1 du locus PI-1 (Maione *et al.,* 2005, Margarit *et al*., 2009), BP-2a et PI-2a du locus PI-2a (Maione *et al.,* 2005, Margarit *et al*., 2009, Rosini *et al.,* 2006) et API-2b et BP-2b du locus PI-2b (Margarit *et al*., 2009), seules ou combinées se sont montrées immunogènes dans des modèles murins.

# V- Systèmes de régulation transcriptionnelle

Afin de s'adapter aux changements environnementaux, les bactéries ont la capacité de moduler finement l'expression de leurs gènes grâce à des systèmes de régulation transcriptionnelle. L'analyse *in silico* du génome de *S. agalactiae* a révélé la présence de 107 régulateurs transcriptionnels putatifs (Glaser *et al.*, 2002, Tettelin

**Tableau I. Principaux facteurs de virulence et leurs régulations chez *S. agalactiae*.**

| Facteurs de virulence | Mode d'action | gènes | régulation |
|---|---|---|---|
| Capsule | Inhibition de la phagocytose<br>Retard dans le recrutement des PMNs | *cpsA-L,*<br>*neuA-D* | -Inhibé par RogB<br>-Activé par CovR/CovS |
| Pili | Adhésion cellulaire<br>Formation de biofilm<br>Résistance aux défensines | locus PI-1,<br>locus PI-2 | -Activé par RogB<br>(souche dépendant) |
| FbsA<br>(fibrinogen-binding) | Liaison au fibrinogène<br>Adhésion cellulaire<br>Résistance à la phagocytose | *fbsA* | -Inhibé par RovS<br>-Activé par RogB,<br>et par CovR/CovS<br>(souche dépendant) |
| FbsB<br>(fibrinogen-binding) | Liaison au fibrinogène<br>Invasion cellulaire | *fbsB* | -Légèrement inhibé<br>par MtaR |
| C5a peptidase<br>ou ScpB | Inhibition du recrutement des PMNs<br>Liaison à la fibronectine<br>Adhésion et invasion des épithéliums | *scpB* | -Inhibé par RgfC/RgfA<br>et par CovS/covR |
| Lmb<br>(laminin-binding) | Liaison à la laminine<br>Adhésion et invasion cellulaire | *lmb* | inconnu |
| Srr1<br>(serine rich repeat) | Liaison à la Kératine<br>Adhésion cellulaire | *srr1* | -Activé par Rga |
| BibA | Adhésion cellulaire<br>Résistance à la phagocytose | *bibA* | inconnu |
| SodA | Résistance au stress oxydatif | *sodA* | -Activé par RovS |
| Ala-LTAs | Résistance aux défensines | *dltA-D* | -Activé par DltR/DltS |
| Protéine C | Adhésion et invasion des épithéliums<br>résistance à la phagocytose | *bca*,<br>*cba* | inconnu |
| ß-hémolysine/cytolysine | Cytotoxicité directe<br>Invasion cellulaire<br>Activation de la réponse inflammatoire | *cyl* | -Inhibé par CovR/CovS<br>-Activé par StK1<br>(qui inhibe CovR) et par RovS |
| Pigment caroténoïde | Résistance au stress oxydatif | *cyl* | -Inhibé par CovR/CovS<br>-Activé par StK1 (qui inhibe CovR) |
| CAMP factor | Cytotoxicité directe<br>Perturbation de l'action des anticorps | *cfb* | -Activé par CovR/CovS<br>-Inhibé par StK1 |
| Hyaluronate lyase | Dissémination dans l'organisme<br>Perturbation du trafic leucocytaire | *hylB* | inconnu |

*et al.*, 2002, Tettelin *et al*., 2005). L'importance quantitative de ces systèmes de régulation laisse penser que *S. agalactiae* a une grande capacité d'adaptation aux changements environnementaux (Figure 6, Tableau I). Il existe différents types de systèmes de régulation : les facteurs sigma (σ), les régulateurs transcriptionnels à simple composant, les systèmes à deux composants (TCS), et les systèmes de signalisation de type eucaryote (Rajagopal, 2009).

## V.1 Les facteurs σ

Les facteurs σ sont des sous-unités de l'ARN polymérase holoenzyme qui lui permettent de reconnaître et de se fixer aux promoteurs des gènes. Il existe différents types de facteurs σ, les facteurs σ primaires et les facteurs σ alternatifs. Le facteur σ primaire est le facteur σ de la phase végétative. Il est essentiel à la survie des bactéries et reconnaît des séquences consensus situées 35 (TTGACA) et 10 (TATAAT) nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Les autres facteurs σ sont non essentiels à la survie cellulaire en conditions de croissance favorables et sont appelés facteurs σ alternatifs. Les facteurs σ alternatifs sont impliqués dans des fonctions diverses comme par exemple la régulation de l'expression de gènes des cellules exposées à divers stress, la compétence, la production d'antibiotiques, des facteurs de virulence.

L'étude *in silico* du génome de *S. agalactiae* montre l'existence de seulement trois gènes codant pour trois facteurs σ : $\sigma^A$, un facteur primaire, ComX, un facteur de compétence et $\sigma^{ECF}$, présent également chez d'autres bactéries Gram-positive telles que *Streptococcus equi*, *Lactococcus lactis* et *Bacillus subtilis* mais pas chez *S. pneumoniae* ni chez *S. pyogenes* (Glaser *et al.*, 2002, Tettelin *et al.*, 2002, Tettelin *et al*., 2005).

## V.2 Les régulateurs transcriptionnels (stand alone or one component regulator)

Les régulateurs transcriptionnels à simple composant sont des protéines se liant à l'ADN permettant d'activer ou de réprimer la transcription du gène cible en réponse à un changement cytoplasmique ou du milieu extérieur. Certains régulateurs peuvent être activateurs pour certains gènes et inhibiteurs pour d'autres (Schell,

1993). Il existe différentes familles de régulateurs transcriptionnels qui sont définies par leurs homologies de séquences de liaison à l'ADN (composées du motif hélice-tour-hélice) (Aravind *et al*., 2005). Ils se fixent sur des sites spécifiques (dits consensus) dans la région promotrice du gène cible. Parmi les régulateurs transcriptionnels identifiés au sein du génome de *S. agalactiae*, trois appartiennent à la famille RALP et trois appartiennent à la famille Rgg, deux familles impliquées dans la régulation de l'expression de gènes de virulence chez de nombreuses espèces de streptocoques, et un appartient à la famille LysR (Glaser *et al*., 2002, Shelver *et al*., 2003, Tettelin *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2005).

### V.2.1 RovS

RovS (regulator of virulence in *Streptococcus agalactiae*) appartient à la famille des régulateurs Rgg (Samen *et al*., 2006). Le rôle de ces régulateurs a principalement été étudié chez *S. pyogenes*, ils contrôlent des gènes de nature très variée, souvent essentiels à la survie des cellules en conditions de stress et à la colonisation de leurs hôtes (Chaussee *et al*., 2003, Chaussee *et al*., 2004, Kreikemeyer *et al*., 2003). La délétion du gène *rovS* du génome d'une souche de *S. agalactiae* de sérotype III entraîne une augmentation de l'adhésion au fibrinogène et aux cellules épithéliales (A549) ainsi qu'une réduction de l'activité hémolytique (Samen *et al*., 2006). En comparant les niveaux de transcription de quelques gènes de virulence entre cette souche mutante RovS- et la souche sauvage, il a été montré que RovS inhibe la transcription du gène *fbsA* et active celle des gènes *sodA*, *rogB*, et *cyl*. RovS peut agir directement sur ces gènes cibles ou encore *via* d'autres régulateurs transcriptionnels (Samen *et al*., 2006). En effet, des expériences de retard sur gel, montrent que RovS se fixe sur les régions promotrices des gènes *fbsA*, *sodA* et *cyl* mais pas sur celle du gène *rogB*. L'alignement de ces régions promotrices suggère que RovS pourrait se fixer sur l'ADN au niveau d'une séquence consensus AWAAWVHTDAW-$N_{6/7}$-WTKWWAMDWAK (Samen *et al*., 2006). La recherche, *in silico,* de cette séquence consensus, dans l'ensemble des promoteurs putatifs du génome de *S. agalactiae* NEM316 a révélé la présence de 25 gènes potentiellement régulés par RovS (régulon RovS): 5 gènes impliqués dans le métabolisme, 5 gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels, 4 gènes codant pour des transporteurs, 3 gènes codant pour des protéines de surface et 8 gènes de

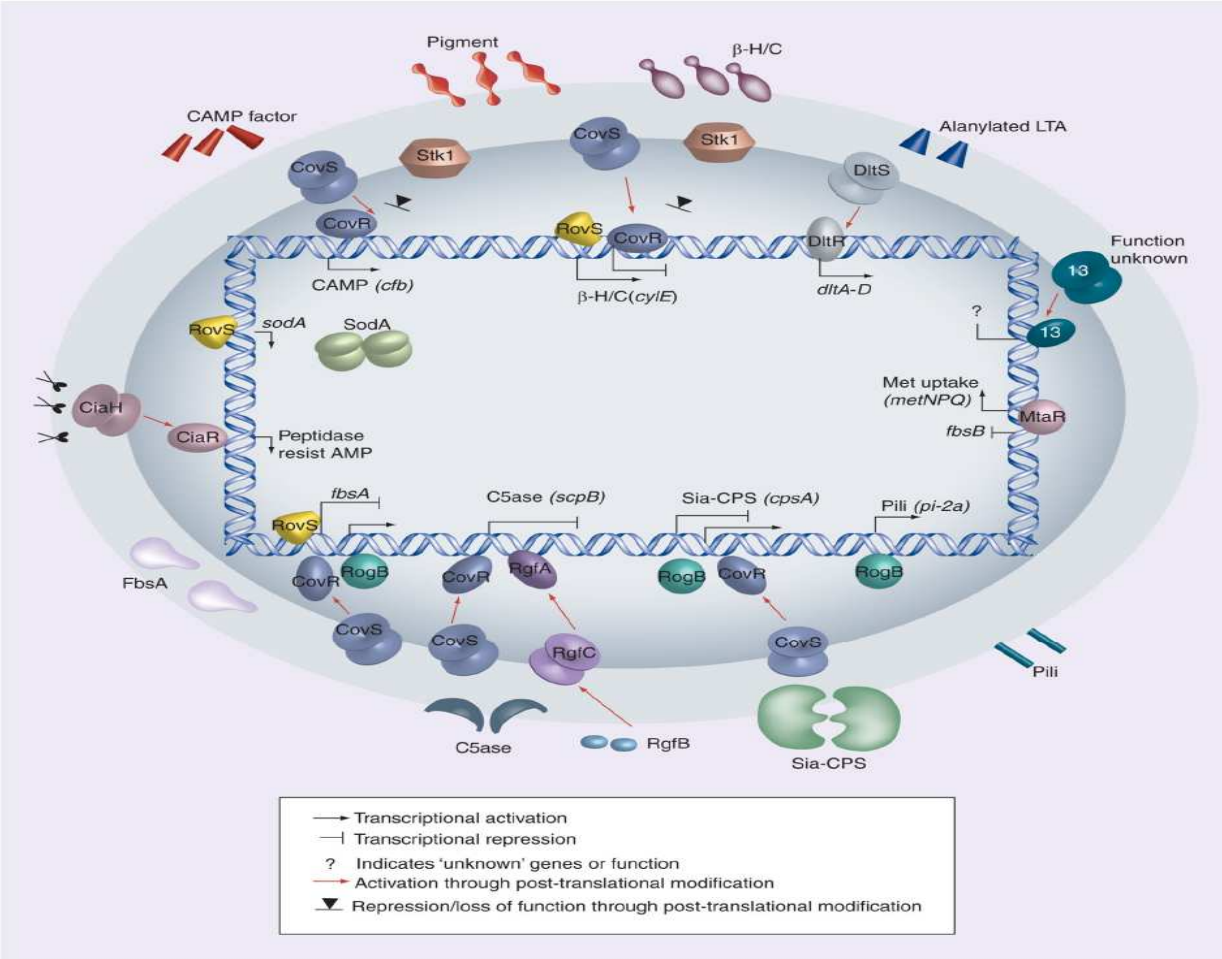



**Figure 6. Régulation des principaux facteurs de virulence chez *S. agalactiae*.**

L'expression des gènes impliqués dans l'adhésion, l'invasion cellulaire ainsi que dans l'évasion au système immunitaire par *S. agalactiae*, contribuant ainsi à sa virulence est contrôlée par les systèmes suivants: les systèmes à deux composants formés par les régulateurs de réponse CovR, RgfA, CiaR et DltR et par les senseurs correspondants CovS, RgfC, CiaH et DltS; le système de signalisation eucaryote formé par la sérine thréonine kinase Stk1 et la phosphatase correspondante Stp1; et trois régulateurs transcriptionnels (simple composant) RogB, RovS et MtaR.

13 : treize autres TCS de fonction inconnue; β-H/C: β-hemolysine/cytolysine; AMP: peptide antimicrobien; C5ase: C5a peptidase; FbsA: fibrinogen-binding protein A; LTA: acide lipteichoique; Met: méthionine; Sia-CPS: acide sialique capsulaire; SodA: Superoxide dismutase. Le système CspD/B et le régulateur Rga ne sont pas représentés (image d'après Rajagopal *et al*., 2009).

fonction inconnue (Samen *et al*., 2006). Ceci suggère que RovS contrôle l'expression d'une grande variété de gènes chez *S. agalactiae.*

### V.2.2 RogB

RogB (regulator of group B streptococcus) appartient à la famille des régulateurs RofA-like proteins (RALP) (Gutekunst *et al*., 2003). Ces régulateurs sont retrouvés chez différentes espèces de streptocoques notamment chez *S. pyogenes* (Beckert *et al*., 2001, Kreikemeyer *et al*., 2003). Le gène *rogB* est situé en 5' du locus PI-2a (impliqué dans la biosynthèse des pili) mais est de transcription divergente. L'inactivation du gène *rogB* d'une souche de *S. agalactiae* de sérotype III, entraîne une réduction de l'adhésion au fibrinogène ainsi qu'aux cellules épithéliales (A549) (Gutekunst *et al*., 2003). De même, un mutant RogB- de la souche NEM316 adhère significativement moins aux cellules épithéliales pulmonaires (A549) que la souche sauvage (Dramsi *et al*., 2006). Il a été montré que RogB active la transcription du gène *fbsA* et de 3 gènes fimbriaux, *gbs1477* (codant BP-2a), *gbs1478* (codant AP1-2a) et *gbs1474* (codant AP2-2a) et inhibe celle du gène *cspA* impliqué dans la synthèse de la capsule (Gutekunst *et al*., 2003, Dramsi *et al*., 2006). Comme le gène *rogB* n'est pas conservé chez toutes les souches de *S. agalactiae*, la régulation de ces gènes par RogB apparaît souche dépendante (Brochet *et al*., 2006, Herbert *et al*., 2005, Tettelin *et al*., 2005).

### V.2.3 Rga

La protéine Rga présente des homologies avec des régulateurs des familles Mga et RALP (Kreikemeyer *et al*., 2003, Mistou *et al*., 2009). Ces protéines sont retrouvées chez *S. pyogenes* où elles régulent l'expression des gènes de virulence impliqués notamment dans l'adhésion et l'invasion cellulaire ainsi que dans l'évasion au système immunitaire de l'hôte (Kreikemeyer *et al*., 2003, Mclver et Myles, 2002). L'inactivation du gène *rga*, situé en amont du locus *secA2* de la souche NEM316 mais de transcription divergente, entraîne une transcription 100 fois moindre du gène *srr1* situé en 5' du locus *secA2,* tandis que la transcription des gènes *gtfC*, *gtfB* et *secA2* faisant aussi partie du locus *secA2* n'est pas été modifiée, indiquant ainsi que

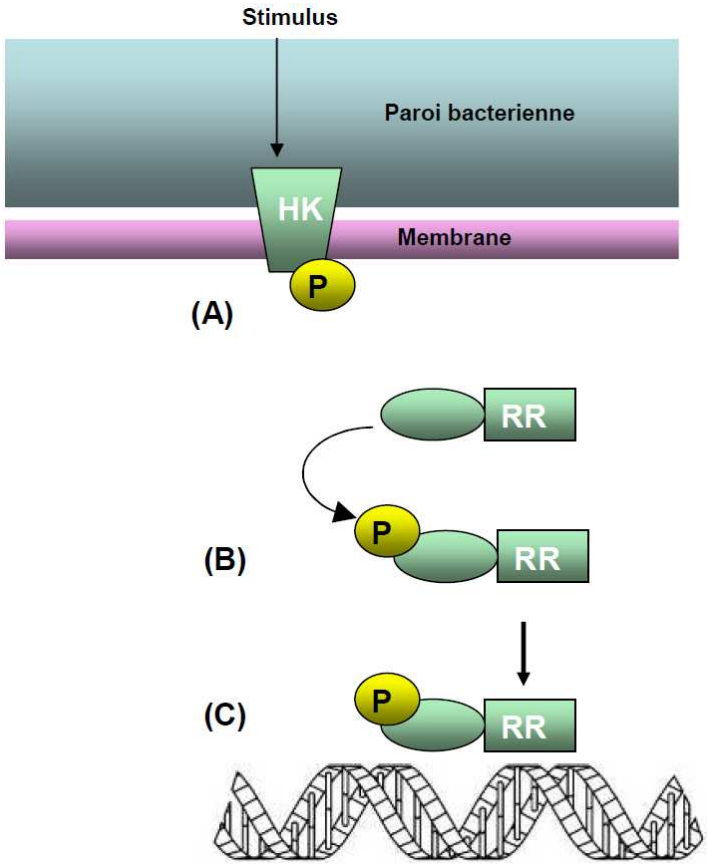



**Figure 7. Représentation schématique d'un système à deux composants**

L'histidine kinase (HK), ou senseur, est formée d'un domaine membranaire qui perçoit le signal et d'un domaine cytoplasmique qui contient un résidu histidine toujours conservé et qui correspond au site d'autophosphorylation des HK. Le régulateur de réponse (RR) est formé d'un domaine receveur comportant le site de phosphorylation (résidu aspartate) et d'un domaine effecteur comportant le domaine de liaison à l'ADN. (A) Perception d'un stimulus externe provoquant l'autophosphorylation de l'histidine kinase (HK); (B) Transfert du groupement phosphate par HK vers le régulateur de réponse (RR); (C) RR ainsi phosphorylè peut jouer le rôle de régulateur transcripionnel en se fixant sur les régions promotrices des gènes cibles [image d'après Paterson *et al*., 2006].

Rga induit la transcription du gène *srr1* (codant pour la protéine de surface Srr1) (Mistou *et al*., 2009). Ces résultats ont été confirmés par des expériences d'immunodétection utilisant des anticorps dirigés contre l'extrémité N-terminale de la protéine Srr1 qui ont montré l'absence de Srr1 dans les extraits protéiques du mutant Rga- (Mistou *et al*., 2009).

### V.2.4 MtaR

MtaR appartient à la famille des régulateurs LysR (Shelver *et al*., 2003). L'inactivation du gène *mtar* chez une souche de *S. agalactiae* entraîne son incapacité à croître *ex-vivo* dans du plasma humain et une baisse considérable de sa virulence dans un modèle d'infection du rat nouveau-né. De plus, il a été montré que MtaR active des gènes impliqués dans des systèmes de transport de la méthionine (Shelver *et al*., 2003).

## V.3 Les systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants (TCS), sont constitués d'un senseur à activité histidine kinase et d'un effecteur, régulateur de réponse. L'histidine kinase localisée dans la membrane va percevoir les stimuli extérieurs et activer par phosphorylation le régulateur de réponse. Une fois activé, le régulateur va se fixer grâce à son domaine de liaison avec l'ADN, de manière spécifique à l'ADN et réguler ainsi la transcription des gènes cibles (Figure 7). Le génome de *S. agalactiae* contient entre 17 et 20 systèmes à deux composants (Glaser *et al.*, 2002, Tettelin *et al.*, 2002, Tettelin *et al*., 2005).

### V.3.1 CovSR

Le TCS CovS/CovR (également appelé CsrS/CsrR) (senseur/régulateur), a été décrit chez plusieurs espèces de streptocoques, notamment chez *S. pyogenes* où il fonctionne comme un régulateur pléiotropique des gènes de virulence (Graham *et al*., 2002, Levin et Wessels, 1998, Treviño *et al*., 2009). La protéine CovR appartient à la famille OmpR; elle contient un domaine N-terminal comportant le site de phosphorylation de la protéine, et un domaine C-terminal comportant le motif de liaison à l'ADN (wHTH winged Helix-Turn-Helix). Chez *S. agalactiae*, le locus *covSR*

a été inactivé dans le génome de la souche NEM316 et le mutant correspondant CovS-/CovR- s'est montré hyper-hémolytique et hyper-adhérent aux cellules épithéliales humaines (A549, HeLa) et murines (L2) (Lamy *et al*., 2004). Cependant, ce mutant s'est révélé incapable de croître dans le sang humain et sa virulence était considérablement diminuée dans un modèle du rat nouveau-né infecté par voie intrapéritonéale (Lamy *et al*., 2004). L'analyse comparative du transcriptome de la souche sauvage NEM316 et de son mutant a montré que ce système agissait comme un activateur (sur 63 gènes) ou un répresseur (sur 76 gènes) (Lamy *et al*., 2004). La protéine CovR purifiée se fixe spécifiquement aux régions régulatrices de nombre de ces gènes au niveau d'une séquence consensus (TATTTTAAT) définie par des expériences d'empreinte à la DNase I et une analyse bioinformatique (Lamy *et al*., 2004). Le gène *covR* a été ensuite inactivé chez deux autres souches de *S. agalactiae* (2603 et 515) (Jiang *et al*., 2008). L'analyse comparative du transcriptome de ces souches sauvages et de leurs mutants CovR- correspondants a montré une variabilité de régulons CovR (ensemble de gènes contrôlés par CovR) souche dépendante. Ainsi, dans la souche 2603, le régulateur CovR active 13 gènes et inhibe 94 gènes alors que dans la souche 515, il en active 12 et en inhibe 57 (Jiang *et al*., 2008). Sur l'ensemble des gènes régulés par CovRS chez les trois souches étudiées (NEM316, 2603 et 515), seuls 39 gènes sont conservés (Jiang *et al*., 2008). La plupart de ces derniers sont soit des gènes de virulence soit des gènes appartenant aux systèmes de transport d'acides aminés, de peptides, de sucres ou de métaux (Jiang *et al*., 2008). Enfin, la variation des régulons CovR est susceptible de jouer un rôle important dans l'adaptation des souches aux changements environnementaux et pourrait ainsi expliquer la différence de potentiel pathogène de différentes souches.

### V.3.2 RgfAC

L'opéron *rgf* (regulator of fibrinogen binding) est constitué de 4 gènes : *rgfBDAC*. Il code pour un TCS formé de la protéine RgfC (histidine kinase) et de la protéine RgfA (régulateur de réponse) qui appartient à la famille LytR contenant en N-terminal un domaine de phosphorylation et en C-terminal un domaine de liaison à l'ADN. RgfD correspond à un peptide hormone qui pourrait participer à l'activation du TCS RgfC/RgfA. RgfB est une protéine de fonction inconnue (Spellerberg *et al*.,

2002). Le système *rgf* présente des similarités avec le système *agr* (*agrBDCA,* accessory gene regulator) de *Staphylococcus aureus* (Spellerberg *et al*., 2002). Chez *S. aureus*, Agr régule la synthèse de la majorité des protéines, incluant des facteurs de virulence et des enzymes nécessaires à l'acquisition de nutriments (Janzon et Arvidsson, 1990, Li *et al*., 1997a, Novick *et al*., 1993, Queck *et al*., 2008, Recsei *et al*., 1986). L'inactivation du gène *rgfC* chez une souche de *S. agalactiae* entraîne une réduction significative de sa liaison au fibrinogène (Spellerberg *et al*., 2002). De plus, la transcription du gène *scpB* codant pour une protéine de surface impliquée dans la liaison de *S. agalactiae* à la fibronectine, est significativement augmentée chez le mutant RgfC- montrant ainsi que *rgf* inhibe la transcription de ce gène (Spellerberg *et al*., 2002). Son rôle dans la virulence *in vivo* de *S. agalactiae* n'a pas été étudié.

### V.3.3 Autres TCS

Le TCS DltS/DltR contrôle l'expression des gènes de l'opéron *dlt* impliqués dans l'incorporation des résidus D-Alanyl dans les acides lipotéichoiques (LTAs) contribuant ainsi à la virulence de *S. agalactiae* (Poyart *et al*., 2001b). Le TCS CiaH/CiaR active l'expression de 7 gènes (4 gènes de fonctions inconnues et trois gènes codant pour des peptidases) (Quach *et al*., 2009). Son rôle dans la virulence de *S. agalactiae* a été mis en évidence dans un modèle d'infection murin. Le CiaH/CiaR permet à *S. agalactiae* de résister à l'action des peptides antimicrobiens cationiques (AMPs) (Quach *et al*., 2009) produits par les cellules épithéliales, les neutrophiles ou les macrophages (Nizet et Gallo, 2003). Enfin, 13 autres TCS sont conservés dans le génome de *S. agalactiae* mais leur fonction reste à déterminer.

## V.4 Les systèmes de signalisation de type eucaryote

Le génome de *S. aglactiae* contient deux systèmes de signalisation de type eucaryote (Glaser *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2005). Le premier est constitué d'une tyrosine kinase (CspD) et de la phosphatase correspondante (CspB). Le deuxième est constitué d'une sérine/thréonine kinase (Stk1) et de la phosphatase correspondante (Stp1) ; ces deux protéines sont impliquées dans une large gamme de processus cellulaires allant du métabolisme à la réponse au stress et au développement ainsi qu'à la virulence de *S. agalactiae* (Rajagopal *et al*., 2003, Rajagopal *et al*., 2005). En effet, il a été montré que Stk1 phosphoryle la thréonine

en position 65 (T65) du régulateur de réponse CovR (faisant partie du TCS CovR/CovS) entrainant ainsi une réduction de son activité (Lin *et al*., 2009, Rajagopal *et al*., 2006).

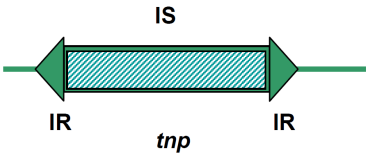
# VI- Eléments génétiques mobiles

Les éléments génétiques mobiles (EGM) sont des segments d'ADN codant des enzymes ou d'autres protéines permettant la mobilité de l'ADN à l'intérieur et entre des génomes. Les EGM regroupent diverses entités : les séquences d'insertion, les transposons, les plasmides, les phages et les introns du groupe II (Frost *et al*., 2005). Chez les bactéries, les EGM jouent un rôle important dans le transfert génétique horizontal et sont connus pour séquestrer et transmettre un grand nombre de gènes impliqués dans des fonctions cellulaires accessoires diverses telles que la résistance antimicrobienne, le catabolisme des xénobiotiques, la pathogénicité, et la symbiose (Depardieu *et al*., 2007, Garcia *et al*., 1994, Nicoloff et Bringel, 2003). Les EGM peuvent entraîner également des inversions et des délétions nucléotidiques et possèdent de plus la capacité d'inactiver ou d'activer l'expression des gènes (Brosh *et al*., 2001, Cole *et al*., 2001, Depardieu *et al*., 2007, Frost *et al*., 2005, Granlund *et al*., 1998, Kiss *et al*., 2003, Lopez de Felipe *et al*., 1996, Olliver *et al*., 2005). Ils peuvent en conséquence influencer profondément la structure du génome. Le génome de *S. agalactiae* comporte un grand nombre d'EGM, principalement localisés dans les zones de haute variabilité génétique (Glaser *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2005). Six séquences d'insertion, un intron de groupe II, des transposons composites, et trente cinq transposons conjugatifs et dérivés ont été identifiés chez *S. agalactiae*. Le séquençage des génomes de plusieurs souches a par ailleurs révélé de nombreux gènes typiques de phages ou de plasmides souvent intégrés dans des blocs génomiques caractéristiques appelés ilots génomiques (Glaser *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2005).

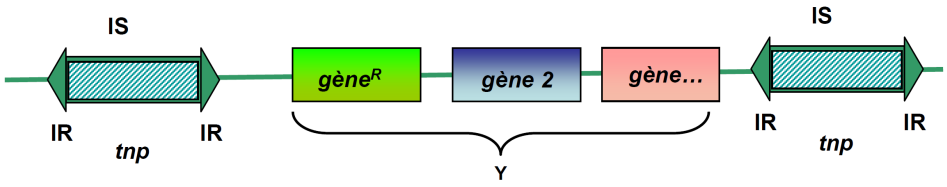
## VI.1 Les séquences d'insertion

Les séquences d'insertion (ou IS) se définissent comme des segments d'ADN de petite taille (de 700 pb à 2,5 kb), ne codant que pour des fonctions impliquées dans

1. Séquence d'insertion (IS)




2. Transposon composite




3. Transposon intégratif conjugatif (ICE)

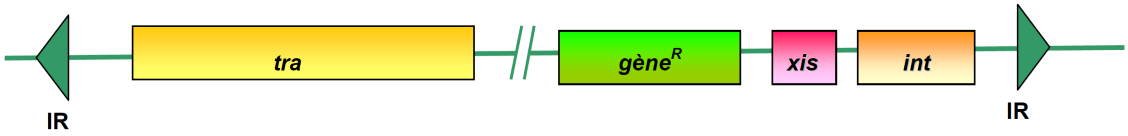



**Figure 8. Principaux éléments génétiques mobiles rencontrés chez *S. agalactiae*.**

1. Séquence d'insertion (IS) : IR, séquence inversée répétée ; *tnp*, codant pour la transposase. 2. Transposon composite : constitué de 2 IS +Y ; Y, fragment d'ADN contenant des gènes de résistance aux antibiotiques, de virulence et/ou métaboliques. 3. Transposon intégratif congugatif (ICE) : *xis*, codant pour l'excisionase ; *int*, codant pour l'intégrase ; *gène*$^R$, codant pour la résistance aux antibiotiques ; *tra*, contenant les gènes nécessaires au transfert par conjugaison.

leur propre mobilité (Mahillon et Chandler, 1998). La plupart des IS ont des courtes répétitions inversées (ou IR) à leurs extrémités (Figure 8). Ces IR ont une longueur de 10 à 40 pb. Par convention, l'IR située en amont du gène de la transposase est appelée IRL (Inverted Repeat Left) alors que celle située en aval est l'IRR (Inverted Repeat Right). Les IR comportent deux domaines. Le domaine I, qui comprend les 2 ou 3 dernières paires de bases, est impliqué dans le clivage et le transfert du brin permettant la transposition. Le domaine II permet l'attachement de la transposase (Mahillon et Chandler, 1998).

Les IS codent pour des transposases et sont capables ainsi de s'insérer à divers endroits du génome. La transposase est une enzyme codée généralement par un ou deux cadres ouverts de lecture qui occupent presque la totalité de la séquence d'insertion. La transposase est l'élément clé dans la mobilité des EGM. Le site catalytique de cette activité est généralement composé par une triade d'acides aminés caractéristique appelée motif DDE (Asp Asp Glu). Les séquences impliquées dans l'attachement à l'ADN sont localisées dans la région N-terminale et le domaine catalytique est situé en C-terminal de la protéine. Cette organisation permettrait l'interaction de la protéine naissante avec ses sites d'attachement sur l'IS, couplant ainsi l'expression et l'activité de l'enzyme (Mahillon et Chandler, 1998).

Le degré de spécificité des IS pour leur cible est variable. Certaines IS répondent à une séquence nucléotidique précise, d'autres à un simple dinucléotide (TA, par exemple), d'autres encore à la conformation de l'ADN, liée par exemple à son degré de super enroulement (Mahillon *et al.*, 1999). Une des caractéristiques des IS est de provoquer la duplication directe de quelques nucléotides (entre 2 et 14) au niveau de la zone d'insertion. Une IS donne généralement une duplication de longueur fixe (Reimmann et Haas, 1990).

Les IS sont regroupées en familles établies sur la base de leur organisation génétique (disposition des ORF codant la transposase), la similtude dans leur transposase (domaines ou motifs communs), la longueur et la similitude des séquences inversées terminales (IR), et le nombre de pb de la séquence ADN cible (Mahillon et Chandler, 1998).

Le génome de *S. agalactiae* recèle de nombreux gènes de transposases (Glaser *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2005), dont certains

correspondent à des IS. Plusieurs IS ont été bien caractérisées : l'IS*861*, l'IS*1381*, l'IS*1548*, l'IS*Sa4,* l'IS*Sag2* et l'IS*Sag1* (Dimitriev *et al*., 2004, Franken *et al*., 2001, Granlund *et al*., 1998, Rubens *et al*., 1989, Sellin *et al*., 2000, Spellerberg *et al*., 2000, Tamura *et al*., 2000).

### VI.1.1 L'IS*861*

L'IS*861* est la première IS décrite chez *S. agalactiae*. Elle comprend 1442 pb (Rubens *et al*., 1989). Elle comporte des séquences inversées répétées (IR) de 22 et 26 pb et deux ORF. La séquence cible, ACA, est dupliquée lors de de l'insertion. L'IS*861* appartient à la famille IS*3* (données de l'IS Finder : http://www-is.biotoul.fr/is.html)

Neuf copies de cette IS ont été identifiées dans le chromosome de la souche COH1, souche productrice d'une grande quantité d'antigènes capsulaires. En effet, une de ces copies a été identifiée en amont du locus *cps*, codant la synthèse de la capsule et Rubens *et al.* ont suggéré que l'IS*861* pouvait induire la surexpression du *cps*. Sellin *et al.* ont mis en évidence chez une souche de *S. agalactiae* non typable, une copie de l'IS*861* dans le gène *cpsD* (impliqué dans la synthèse de la capsule), inactivant ce dernier et responsable ainsi du phénotype de la souche (la non typable) (Sellin *et al*., 2000). Au final, ces résultats suggèrent le rôle de l'IS*861* dans la virulence de *S. agalactiae*.

### VI.1.2 L'IS*1381*

L'IS*1381* comprend 900 pb. Elle appartient à la famille IS*5*, a des IR de 23 et 24 pb et comporte deux ORF (données de l'IS Finder : http://www-is.biotoul.fr/is.html).

Une à huit copies d'IS*1381* ont été identifiées dans le génome de *S. agalactiae* (Tamura *et al*., 2000). Sa présence a été reliée à la fois à la virulence et à la résistance aux antibiotiques de *S. agalactiae*. En effet, elle a été détectée à proximité du gène *bac* (codant une protéine de surface) (Nagano *et al*., 2006), dans le gène *cylA* (impliqué dans l'activité ß- hémolytique) (Spellerberg *et al*., 1999b), dans le gène *cpsE* (impliqué dans la synthèse de la capsule) (Ramaswamy *et al*., 2006) et

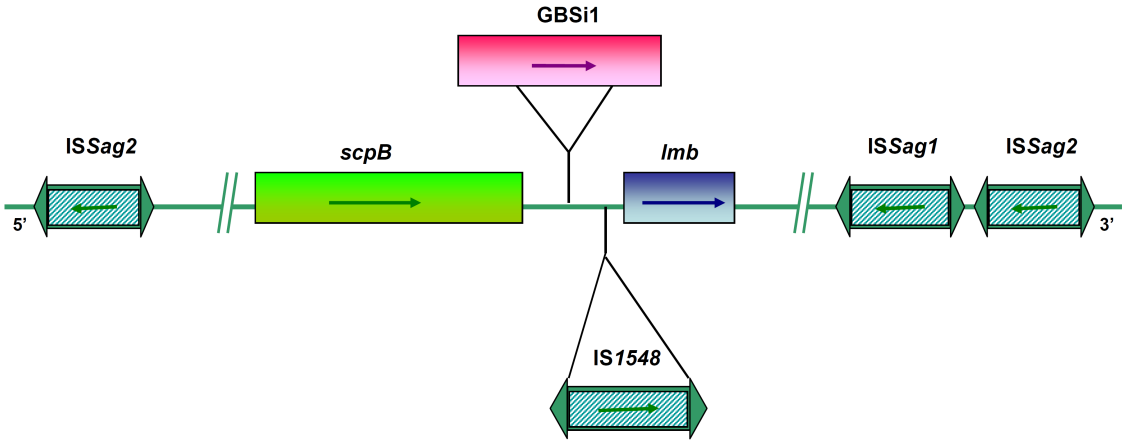



**Figure 9. Structure du transposon composite *scpB-lmb* de *S. agalactiae*.**

Les 2 gènes *lmb* et *scpB* font partie d'un transposon composite encadré par deux séquences d'insertion IS*Sag2*. La région intergénique *scpB-lmb* est le site d'insertion d'un intron de groupe II, GBSi1 ou d'une séquence d'insertion, IS*1548*. IS*Sag1* fait aussi partie de transposon composite. Les flèches indiquent le sens de la transcription.

dans le gène atténuateur d'*erm(A)* (impliqué dans la resistance aux antibiotiques) (Culebras *et al*., 2005). Un travail réalisé au sein de notre équipe de recherche lors d'une cartographie des sites d'insertion d'EGM dans le génome de *S. agalactiae* a permis de mettre en évidence deux nouveaux sites d'insertion de l'IS*1381* non publiés à ce jour (Héry-Arnaud, communication personnelle) : un site dans le gène *sag1433* codant une protéine de fonction inconnue (Tettelin *et al*., 2002), et un site dans le gène *cpsY* codant un régulateur transcrptionnel (Chaffin *et al*., 2000).

### VI.1.3 L'IS*1548*

L'IS*1548* comprend 1316 pb. Elle appartient à la famille IS*As1*, comporte deux ORF, des IR de 20 et 24 pb et s'insère en provoquant une duplication de 14 pb (données de l'IS Finder : http://www-is.biotoul.fr/is.html).

Elle a été détectée en premier lieu dans le gène *hylB* qui code la hyaluronidase, entrainant ainsi son inactivation (Granlund *et al*., 1998). L'insertion de l'IS*1548* dans *hylB* a été retrouvée préférentiellement chez des souches d'endocardite sans que le mécanisme physiopathologique ait pu être expliqué (Granlund *et al*., 1998). Entre trois et huit sites de l'IS ont été mis en évidence par Southern blot (Granlund *et al*., 1998). Un des sites préférentiels d'insertion est situé entre le gène *scpB* (codant la C5a peptidase et une protéine de liaison à la fibronectine) et le gène *lmb* (codant une protéine de surface impliquée dans l'adhésion à la laminine) exactement à -9 pb du promoteur -35 du gène *lmb* (Figure 9) (Granlund *et al*., 1998, Granlund *et al*., 2001, Héry-Arnaud *et al*., 2005, Spellerberg *et al*., 1999a). L'impact de cette insertion n'a pas été déterminé. L'IS*1548* a été également retrouvée insérée dans le gène *cpsD* de l'opéron capsulaire chez des souches non typables de *S. agalactiae* (Sellin *et al*., 2000). Un travail réalisé au sein de notre équipe de recherche lors d'une cartographie des sites d'insertion d'EGM dans le génome de *S. agalactiae* a permis de mettre en évidence six nouveaux sites d'insertion de l'IS*1548* non publiés à ce jour (Héry-Arnaud, communication personnelle). Parmi les 6 nouveaux sites identifiés, quatre correspondent à l'insertion de l'IS dans l'ORF d'un gène. Il s'agit : du gène *gbs0667* qui code une enzyme IIBC impliquée dans le transport actif d'un substrat (Glaser *et al*., 2002), du gène *sag1963* codant un transporteur de type ABC permettant le

transport actif du phosphate inorganique (Tettelin *et al*., 2002), du gène *sag0911* codant un transporteur cationique ATPase, et du gène *sag2048* codant une méthyltransférase impliquée dans la biosynthèse de la méthionine. (Tettelin *et al*., 2002). Les deux derniers sites d'insertion identifiés sont localisés dans des fragments intergéniques : un site situé entre le gène *sag0155* codant un transporteur ABC du zinc et le gène *sag0154* qui code un répresseur du gène *sag0155* (Tettelin *et al*., 2002), ce site d'insertion étant retrouvé uniquement chez des souches responsables de méningites (Héry-Arnaud, communication personnelle); enfin un site situé entre le gène *mfd* qui code un facteur de transcription et le gène *sag0009* qui code une protéine de fonction hypothétique (Tettelin *et al*., 2002).

### VI.1.4 L'IS*Sa4*

L'IS*Sa4* comprend 963 pb. Elle appartient à la famille IS*982* et comporte des IR de 24 pb, un ORF et s'insère en provoquant une duplication de 9 pb (données de l'IS Finder : http://www-is.biotoul.fr/is.html).

Elle a été détectée dans le gène *cylB* (impliqué dans l'activité ß- hémolytique de *S. agalactiae*) entrainant ainsi son inactivation (Spellerberg *et al*., 2000). Neuf autres sites ont été détectés dans différentes souches mais aucun lien avec leur phénotype n'a été mis en évidence (Dimitriev *et al*., 2004).

### VI.1.5 L'IS*Sag2*

L'IS*Sag2* comprend 1220 pb. Elle appartient à la famille IS*3* et comporte des IR de 33 et 45 pb et deux ORF (données de l'IS Finder : http://www-is.biotoul.fr/is.html).

Elle a été découverte par Franken *et al*. qui ont révélé la présence de deux copies de l'IS*Sag2* encadrant le fragment *scpB-lmb* déjà connu pour accueillir l'IS*1548* ou l'intron GBSi1 (Figure 9) (Franken *et al*., 2001). Deux IS*Sag2*, qui encadrent les gènes *scpB* et *lmb*, font partie d'un transposon composite qui aurait été acquis par transfert horizontal (Franken *et al*., 2001). Ce transposon a été retrouvé chez quasiment toutes les souches humaines mais rarement chez les souches bovines (Franken *et al*., 2001).

### VI.1.6 L'IS*Sag1*

L'IS*Sag1* comprend 1251 pb. Elle appartient à la famille IS*3* et comporte des IR de 37 pb et deux ORF (Franken *et al*., 2004). Une seule copie de l'IS*Sag1* a été détectée dans le génome de *S. agalactiae*, au niveau du transposon composite *scpB-lmb* en aval du gène *lmb* (Figure 9) (Franken *et al*., 2004). Aucun impact potentiel sur le phénotype de *S. agalactiae* n'a été rapporté à ce jour.

## VI.2 Les transposons composites

Les transposons composites possèdent une région centrale, contenant des gènes non liés aux fonctions de transposition, encadrée par deux modules de type IS. Il semble donc que les transposons composites soient formés par l'association de deux éléments IS auparavant indépendants (Figure 8). Les transposons composites sont un important moyen de dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. Ainsi, chez *S. agalactiae* le transposon composite Tn*3706* a été détecté chez une souche présentant une résistance particulière à la gentamicine (Horaud *et al*., 1996). Egalement, le transposon composite Tn*917*/Tn*916*-like porte le gène *ermB* codant la résistance croisée aux macrolides et à la clindamycine (Puopolo *et al*., 2007). Enfin, le transposon composite *scpB-lmb* a été associé à la capacité de *S. agalactiae* à coloniser voire infecter l'homme (Franken *et al*., 2001).

## VI.3 Les transposons intégratifs conjugatifs et autres transposons dérivés

Les transposons intégratifs conjugatifs (ICE) sont des éléments qui sont normalement intégrés dans le chromosome des bactéries sauf pendant leur transfert où ils sont sous forme circulaire. Ces éléments combinent de nombreux caractères communs à ceux des plasmides et des phages. Comme les prophages, ils sont capables de s'exciser et de s'intégrer dans le chromosome. Ils peuvent être transférés d'une bactérie à une autre par conjugaison de la même façon que les plasmides conjugatifs (Roberts *et al*., 2008). Leur transfert contribue entre autres à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. Leurs extrémités sont formées de séquences inversées répétées de 20 à 30 pb (Figure 8) (Roberts *et al*., 2008). Ils sont définis par la présence de gènes impliqués dans la mobilité, incluant

des gènes pour l'excision et l'intégration (*xis* et *int*) ainsi que par la présence d'une grande variété de gènes, dont des gènes de résistance aux antibiotiques (Salyers *et al*., 1995b). Les deux gènes *int* et *xis* se trouvent à l'extrémité du transposon conjugatif en aval de ces derniers. Les fonctions catalysant la conjugaison (Tra) sont similaires à celles portées par les plasmides conjugatifs d'*E. coli* (Salyers *et al*., 1995b). L'intégration du transposon peut intervenir dans le même génome ou après conjugaison dans un nouvel hôte. L'intégration a lieu principalement au niveau des régions 3' des gènes codant des ARNt (Burrus *et al*., 2002).

Les éléments intégratifs et mobilisables (IME), dérivés des ICE, possèdent des gènes pour l'excision ou pour l'intégration, mais à la différence des ICE font appel à d'autres éléments codant les fonctions nécessaires à la conjugaison (Roberts *et al*., 2008). Ainsi, la plupart porte une origine de transfert *oriT* et des gènes de protéines mobilisatrices comme la relaxase, mais ils utilisent la machinerie conjugative d'autres éléments (mobilisation en *trans*) (Salyers *et al*., 1995a). D'autres types d'EGM apparaissent après délétion de certains modules, intégratifs ou conjugatifs, et/ou, au contraire, l'accrétion d'autres modules. C'est par exemple les cas des éléments mobilisables en *cis* (CIME) (Pavlovic *et al*., 2004).

La comparaison de huit génomes séquencés de *S. agalactiae* a mis en évidence la présence de 12 ICE, 6 IME et 13 CIME (Brochet *et al*., 2008a). Ces éléments pourraient participer à l'acquisition de nouveaux déterminants du pouvoir pathogène, à l'évolution et à la diversité du génome de *S. agalactiae* et à la conquête de nouvelles niches écologiques.

## VI.4 L'intron de groupe II (GBSi1)

Chez *S. agalactiae*, GBSi1 est un intron de groupe II de 1876 pb. Il transpose via un intermédiaire ARN, appelé ribozyme, qui agit comme une enzyme. Le ribozyme catalyse *in vitro* son excision à partir du transcrit primaire par un procédé d'auto-épissage. Sa séquence possède un domaine RT (reverse transcriptase), un domaine X (maturase) et un domaine En (nucléase utilisée lors de la réaction de mobilité) (Michel et Ferat, 1995). Le site d'insertion de GBSi1 est soit un site cible typique d'intron de groupe II, soit un motif spécifique correspondant à une séquence répétée inversée avec une queue poly(A) (Granlund *et al*., 2001, Luan *et al*., 2003). L'hypothèse concernant GBSi1 est qu'il aurait été acquis par *S. agalactiae* par

l'intermédiaire d'un plasmide intégratif (Luan *et al*., 2003). Trois sites d'insertion de GBSi1 ont été détectés dans le génome de *S. agalactiae,* dans les régions intergéniques : *scpB-lmb* (Figure 9), *ftsY-sag0728*, ou *lplA-1-sag0883* (Bohnsack *et al*., 2002, Granlund *et al*., 2001, Héry-Arnaud *et al*., 2005, Luan *et al*., 2003). Aucune corrélation entre ces sites et la pathogénicité des souches n'a pu être établie.

## VI.5 Les îlots génomiques et les îlots de pathogénicité

Les îlots génomiques, sont des régions qui diffèrent du reste du génome par leur teneur en bases G+C (Hacker *et al*., 1997). Ils sont flanqués de séquences directes répétées qui semblent résulter de leur intégration dans le chromosome. Ils sont habituellement intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant pour un ARNt. Ils possèdent souvent des gènes codant pour leur mobilité tels que des gènes de phages, des séquences d'insertion, des intégrases, des transposases, et des origines de transfert (Hacker *et al*., 1997). Les îlots génomiques codent pour plusieurs fonctions qui dépendent du contexte environnemental dans lequel vivent les bactéries. Les questions concernant les mécanismes de transfert des îlots génomiques sont loin d'être résolues. Selon les fonctions codées par ces îlots génomiques, ces éléments peuvent aussi être appelés îlots de pathogénicité, possèdant alors un ensemble de gènes impliqués dans la production de facteurs de virulence. Par définition, les îlots de pathogénicité sont présents dans le génome des souches pathogènes et sont le plus souvent absents des variants non pathogènes au sein de la même espèce bactérienne (Hacker *et al*., 1997). La comparaison des génomes de 8 souches de *S. agalactiae* a permis d'identifier de 11 à 14 îlots génomiques et seuls quatre étaient de véritables îlots de pathogénicité : les îlots I (contenant un régulateur transcriptionnel de type *rgg*), VI (contenant le locus *cyl*), X (contenant 3 gènes codant des protéines de surface) et XII (contenant les gènes *scpB* et *lmb*) (Herbert *et al*., 2005). Aucune corrélation n'a pu être formellement établie entre la présence d'un de ces quatre îlots et un pouvoir pathogène spécifique (Herbert *et al*., 2005).

# VII- Prévention des infections à *S. agalactiae*

Face à l'importance et à la gravité des infections à *S. agalactiae* en particulier chez le nouveau-né, de nombreux travaux de recherche et d'analyse ont été réalisés

dans le but d'établir une stratégie efficace de prévention des infections néonatales à *S. agalactiae*.

## VII.1 Antibioprophylaxie

Seule l'antibiothérapie prophylactique per-partum a montré son intérêt dans la diminution de l'incidence des infections précoces à *S. agalactiae*. En cas de diagnostic de portage vaginal de *S. agalactiae* au cours de la grossesse, ou de bactériurie à *S. agalactiae* au cours de la grossesse, ou d'antécédent d'infection néonatale à *S. agalactie* ainsi que pour les sujets à risque (accouchement prématuré, rupture prolongée des membranes, fièvre) (Quentin *et al*., 2002), la prophylaxie repose sur l'injection de pénicilline G ou d'amoxicilline durant le travail. En cas d'allergie à la pénicilline, l'érythromycine ou une céphalosporine peuvent être utilisés. Malheureusement, l'antibioprohylaxie peut se révéler inefficace et ne permet pas d'empêcher la majorité des syndromes tardifs. Outre les réactions allergiques potentiellement sévères chez les mères (Chaudhuri *et al*., 2008), l'utilisation répandue de l'antibiothérapie dans le but d'abaisser l'incidence des infections à *S. agalactiae* s'est montrée problématique notamment sur les risques de sélection de souches de *S. agalactiae* résistantes aux antibiotiques mais aussi l'émergence de bactéries à Gram négatif résistantes et d'infections néonatales à ces germes.

### VII.1.1 Résistance de *S. agalactiae*

Une incidence accrue de souches de *S. agalactiae* résistantes à l'érythromycine et à la clindamycine a été signalée. C'est ainsi que Lin *et al*. ont montré que parmi 6 centres universitaires américains, les taux de résistance sont passés pour l'érythromycine de 15% en 1995 à 22% en 1998 , et pour la clindamycine de 7,5% en 1995 à 9,8% en 1998 (Lin *et al*., 2000). Ces taux de résistance à la clindamycine et l'érythromycine sont respectivement de 25,3% et 29% chez des souches isolées entre 1998 et 2002 (Borchardt *et al*., 2006). Selon des études françaises, les taux de résistance à l'érythromycine et à la clindamycine sont de 15% en 1998 (Poyart *et al*., 2003a), et d'environ 18% pour l'érythromycine entre 2000 et 2007 (Domelier *et al*., 2008, Fitoussi *et al*., 2001). Une variation de la fréquence du taux de résistance à l'érythromycine et à la clindamycine en fonction de

l'origine clinique et du sérotype capsulaire des souches a été observée (Borchardt *et al*., 2006, Domelier *et al*., 2008, Florindo *et al*., 2009).

### VII.1.2 Emergence de bactéries à Gram négatif résistantes et d'infections néonatales à ces germes

Stoll *et al*. ont recensé les sepsis précoces parmi les enfants nés dans 15 centres appartenant au NICHD (National Institute of Child and Human Development) (Stoll *et al*., 2002). Il n'y a pas eu de diminution significative de l'incidence de ces sepsis entre 1991-1993 (19,3 cas pour 1000 naissances) et 1998-2000 (15,0 cas pour 1000 naissances). La majorité (60,7%) de ces sepsis précoces était due à des bacilles à Gram négatif. *E. coli* était le plus commun des pathogènes, comptant pour 44% de toutes les infections. La comparaison entre 1991-1993 et 1998-2000 indiquait une chute de l'incidence des sepsis à *S. agalactiae* : 5,9 cas pour 1000 versus 1,7 cas; et parallèlement une augmentation des sepsis à *E. coli* : 3,2% cas pour 1000 naissances versus 6,8%. Ces auteurs rapportent l'augmentation des septicémies néonatales provoquées par des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques employés pour empêcher les infections à *S. agalactiae*. En effet, la résistance aux antibiotiques était retrouvée pour 33 des 37 sepsis à *E. coli* : 28 sur 33 (85%) étaient résistants à l'ampicilline et les mères des enfants ayant des souches résistantes à l'ampicilline avaient reçu de l'ampicilline en intra-partum (93% soit 26/28). De la même façon, Kaye cite une étude réalisée à Seattle montrant que le taux de sepsis à bacilles à Gram négatif a doublé dans les 5 ans qui ont suivi l'introduction de l'antibioprohylaxie *per-partum* (Kaye, 2001).

## VII.2 Vaccination

Pour les raisons évoquées précédemment, de nombreuses équipes travaillent à l'élaboration d'un vaccin contre *S. agalactia*e. Bien que ces travaux soient encore préliminaires, ils sont toutefois encourageants. Initialement, Baker et Kasper, ont montré que les polysaccharides natifs sont non toxiques et présentent des propriétés immunogènes chez des sujets adultes (Baker et Kasper, 1985). Baker *et al*. se sont ensuite focalisés sur un vaccin utilisant l'antigène capsulaire de type III (Baker *et al*., 1990). L'administration de ce vaccin chez des femmes enceintes (au cours de la

31ème semaine de grossesse) montre que 63% d'entre elles produisent des anticorps dirigés contre le polysaccharide de type III, qui sont transmis au fœtus par voie transplacentaire (Baker *et al*., 1988). Ce même vaccin administré à des femmes colonisées par des streptocoques du groupe B et mères d'enfants ayant développé une infection invasive, a montré que moins de 60% des femmes produisaient des anticorps dirigés contre le polysaccharide de type III (Baker *et al*., 1990). Wessels et Kasper ont proposé l'utilisation d'un vaccin tétravalent dirigé contre les sérotypes capsulaires Ia, Ib, II et III qui sont impliqués dans plus de 90% des infections néonatales (Wessels et Kasper, 1993). Cependant, là encore, moins de 70% des sujets vaccinés produisaient des anticorps dirigés contre les différents sérotypes capsulaires. L'ensemble de ces travaux a montré que les antigènes capsulaires sont faiblement immunogènes et qu'ils induisent une réponse T-indépendante. L'immunisation utilisant les polysaccharides capsulaires (Ia, Ib, II et III) conjugués à une toxine tétanique modifiée (TT) permet de passer outre cette faible immunogénicité ; une réponse immunitaire protectrice, T-dépendante, a été induite par ces vaccins expérimentaux dans un modèle d'infection murin (Paoletti *et al*., 1994). L'immunisation par des vaccins conjugués monovalents : Ia-TT, Ib-TT, II-TT, III-TT, IV-TT V-TT, VII-TT, montre des anticorps spécifiques chez 80% des sujets immunisés par Ia-TT ou Ib-TT, chez 87% des sujets immunisés par II-TT et chez 93% des sujets immunisés par III-TT ou V-TT (Baker et Edwards, 2003) et respectivement chez 93% et 100% des souriceaux nouveau-nés issus des mères immunisées par IV-TT et VII-TT (Paoletti et Kasper, 2002). Cependant, le problème rencontré avec ces vaccins conjugués monovalents, reside dans le fait que la vaccination contre un sérotype donné n'est pas protectrice vis-à-vis d'un autre sérotype. Pour couvrir cette diversité, un vaccin conjugué multivalent constitué de 5 sérotypes prédominants en France et aux Etats-Unis : (Ia-TT, Ib-TT, II-TT, III-TT et V-TT) a été suggéré (Baker et Edwards, 2003, Johri *et al*., 2006). Toutefois, ce vaccin n'est pas adapté au Japon où la prévalence des sérotypes n'est pas la même (les sérotypes VI et VIII prédominent en portage vaginal) (Lachenauer *et al*., 1999).

Par ailleurs, d'autres antigènes protecteurs ont également été utilisés dans des approches vaccinales, notamment des protéines de surface : ScpB, les deux antigènes alpha et bêta de la protéine C, la protéine LrrG (leucin rich repeat) et la protéine Rib (Cheng *et al*., 2002, Larsson *et al*., 1996, Larsson *et al*., 1999, Michel *et*

*al*., 1991, Seepersaud *et al*., 2005). Ainsi, l'utilisation d'un vaccin bivalent comprenant les protéines Rib (exprimée par la majorité des souches de sérotype III) et alpha (exprimée par la majorité des souches de sérotype Ia, Ib et II) a permis de protéger expérimentalement des souris infectées par des souches de ces 4 sérotypes (Larsson *et al*., 1999).

Afin d'intégrer le problème de la diversité antigénique des différentes souches de *S. agalactiae* dans la conception d'un vaccin universel, une autre approche vaccinale a fait appel à la vaccinologie inverse (Maione *et al*., 2005). Elle a recours à la génomique comparative. Ainsi, les génomes des 8 souches séquencées de *S. agalactiae* (de sérotype Ia, Ib, II, III et V), ont été analysés et comparés (Maione *et al*., 2005). L'analyse *in silico* a permis d'identifier 589 protéines de surface, 396 faisant partie du « core » génome et 193 du génome « dispensable ». Parmi elles, 312 ont été exprimées avec succès sous forme de protéines recombinantes, purifiées et employées pour immuniser des souris. Une combinaison de quatre protéines a entraîné une réponse immunitaire protectrice chez des souris infectées par 12 souches de *S. agalactiae* appartenant aux principaux sérotypes circulants Ia, Ib, III, V et VIII (Maione *et al*., 2005). Une de ces quatre protéines, la protéine Sip est de fonction inconnue et fait partie du « core » génome. Les trois autres protéines, sont des protéines structurales de pili appartenant à deux des trois loci existants et font partie du génome « dispensable ». Il s'agit de GBS67, composant majeur BP-2a de pilus du locus PI-2a (Figure 5), de GBS80, composant majeur BP-1 de pilus du locus PI-1 (Figure 5), et de GBS104, protéine auxiliaire AP1-1 de pilus du locus PI-1 (Figure 5). Récemment, Margarit *et al*. ont montré qu'une combinaison de trois protéines structurales de pili dont chacune appartient à un des trois loci existants, la protéine majeure du loci PI-1, la protéine majeure du loci PI-2b et la protéine auxiliaire AP1-2a du loci PI-2a, était immunogène dans des modèles murins et conférait une protection importante contre des souches de *S. agalactiae* appartenant aux principaux sérotypes circulants (Margarit *et al*., 2009). Aucun essai clinique de ces différentes combinaisons n'a été étudié et aucun vaccin commercial n'est actuellement disponible contre *S. agalactiae*, mais des progrès sont attendus dans l'élaboration d'un vaccin universel efficace (Johri *et al*., 2006).

# Partie expérimentale

# Partie 1.

# Activation du gène *lmb* par la séquence d'insertion IS*1548* située dans la région intergénique *scpB-lmb*

**Partie 1.** Activation du gène *lmb* par la séquence d'insertion IS*1548* située dans la région intergénique *scpB-lmb*

## A-Introduction

La structure génétique de *S. agalactiae* a été étudiée par plusieurs techniques de typage parmi lesquelles la technique de MLST s'est imposée comme la méthode de choix (Bisharat *et al*., 2005, Davis *et al* 2005, Jones *et al*, 2003). Ces différentes techniques montrent une répartition clonale au sein de l'espèce et mettent en évidence des lignées phylogénétiques spécifiques associées à un pouvoir pathogène accru (Bisharat *et al*., 2005, Bohnsack *et al*., 2008, Musser *et al*., 1989, Quentin *et al* 1995). Certaines de ces lignées sont marquées par des éléments génétiques mobiles (EGM). De fait, le complexe clonal CC17, majoritaire dans les méningites néonatales, est marqué par l'intron de groupe II GBSi1, alors que le CC19 responsable d' infections chez le nouveau-né et chez l'adulte fragile, est marqué par la séquence d'insertion IS*1548* (Héry-Arnaud *et al*., 2005, Luan *et al*., 2005). Bien que le rôle de ces EGM sur la virulence reste encore à déterminer, IS*1548* et GBSi1 pourraient représenter des marqueurs indirects de la virulence des souches de *S. agalactiae* appartenant aux CC17 et CC19.

Les deux gènes *lmb* et *scpB* codant pour des protéines de surface, sont situés sur un transposon composite (Franken *et al*., 2001). Ce transposon a été associé à la capacité de *S. agalactiae* à coloniser voire infecter l'homme. Trois structures différentes de la région intergénique *scpB-lmb* ont été décrites (Broker et Spellerberg, 2004, Dmitriev *et al*., 2004, Granlund *et al*., 2001, Luan *et al*, 2003), puisque cette région est le site d'intégration de deux EGM, l'intron GBSi1 ou l'IS*1548* qui sont insérés respectivement 97- et 9-pb en amont du promoteur du gène *lmb* (Granlund *et al*., 2001). L'effet de ces EGM sur l'expression des deux gènes *lmb* et *scpB* n'a pas été exploré. La protéine Lmb permet la liaison des bactéries à la laminine humaine (Spellerberg *et al*., 1999a) ce qui favorise l'invasion des cellules endothéliales vasculaires du cerveau humain, permettant ainsi le franchissement de la barrière hémato-méningée (Tenenbaum *et al*., 2007). La protéine ScpB permet la liaison à la fibronectine (Beckmann *et al*., 2002) ce qui favorise l'invasion des cellules épithéliales (Cheng *et al*., 2001a). Par son activité C5a peptidase, ScpB participe également à l'évasion du système immunitaire en clivant la fraction C5a du complément (Cheng *et al*., 2001b). L'induction de l'expression du gène *scpB* en présence de sérum humain a été rapportée récemment (Gleich-Theurer *et al*., 2009). Toute modification de l'expression des gènes *lmb* et *scpB* pourrait donc influencer la virulence des souches de *S. agalactiae*.

L'objectif de ce travail expérimental était de caractériser l'impact de GBSi1 et d'IS*1548* sur l'expression des deux gènes *scpB* et *lmb.* Dans cette perspective, nous avons déterminé dans un premier temps la structure de la région intergénique *scpB-lmb* dans une collection de 111 souches de *S. agalactiae* appartenant aux principales lignées phylogénétiques de l'espèce. Dans un second temps, nous avons choisi 26 souches représentatives des trois configurations génétiques de la région *scpB-lmb*, dans le but de quantifier le niveau de transcription des gènes *scpB* et *lmb*, la capacité de liaison des bactéries à la fibronectine et à la laminine humaine et le niveau d'expression de la protéine Lmb à la surface bactérienne. Enfin, nous avons construit un mutant de délétion de l'IS*1548* entre les gènes *scpB* et *lmb* et montré que IS*1548* active directement le gène *lmb*. Afin d'élucider le mécanisme de cette activation, nous avons mis en évidence un promoteur additionnel actif porté par l'extrémité 3' de l'IS*1548* qui pourrait coopérer avec le promoteur initial du gène *lmb* pour l'activation de ce gène.

**Partie 1.** Activation du gène *lmb* par la séquence d'insertion IS*1548* située dans la région intergénique *scpB-lmb*

# B-Matériel et Méthodes

**Tableau II. Caractères des 111 souches de *S. agalactiae* étudiées.**

| Souche | Sérotype capsulaire | ST | CC |
|---|---|---|---|
| G5 | Ib | 8 | 10 |
| G8 | Ib/ | 7 | 7 |
| G12 | Ib | 400 | 10 |
| G17 | Ib | 12 | 10 |
| G30 | Ia | 23 | 23 |
| G32 | II | 28 | 19 |
| G35 | III | 197 | 19 |
| G40 | Ib | 10 | 10 |
| G41 | II | 78 | 10 |
| G42 | II | 10 | 10 |
| G47 | II | 407 | |
| G49 | III | 17 | 17 |
| G51 | V | 398 | 1 |
| G61 | V | 202 | 1 |
| G62 | Ia | ND | |
| G64 | II | 2 | 1 |
| G69 | III | 17 | 17 |
| G71 | III | 7 | 7 |
| G77 | III | 188 | 17 |
| G81 | Ib | 10 | 10 |
| G82 | III | 46 | |
| L1 | III | 201 | 17 |
| L2 | III | 17 | 17 |
| L3 | III | 17 | 17 |
| L5 | III | 17 | 17 |
| L6 | II | 19 | 19 |
| L7 | III | 17 | 17 |
| L8 | III | 17 | 17 |
| L9 | III | 19 | 19 |
| L10 | III | 19 | 19 |
| L11 | Ib | 6 | 7 |
| L12 | II | 28 | 19 |
| L13 | III | 17 | 17 |
| L14 | III | 19 | 19 |
| L15 | IV | 196 | 1 |
| L16 | III | 23 | 23 |
| L17 | III | 195 | |
| L18 | Ib | 10 | 10 |
| L19 | Ia | 23 | 23 |
| L20 | III | 17 | 17 |
| L21 | III | 17 | 17 |
| L22 | III | 19 | 19 |
| L23 | III | 17 | 17 |
| L24 | III | 17 | 17 |
| L25 | IV | 196 | 1 |
| L26 | Ia | 23 | 23 |
| L27 | III | 17 | 17 |
| L28 | Ia | 223 | 23 |
| L29 | III | 19 | 19 |
| L30 | III | 17 | 17 |
| L31 | III | 193 | 19 |
| L32 | III | 17 | 17 |
| L33 | III | 17 | 17 |
| L34 | III | 19 | 19 |
| L35 | III | 19 | 19 |
| L36 | III | 19 | 19 |
| L37 | III | 17 | 17 |
| L38 | III | 164 | 19 |
| L39 | III | 17 | 17 |
| L40 | III | 17 | 17 |
| L41 | III | 17 | 17 |
| L42 | Ia | 406 | 23 |
| L43 | III | 19 | 19 |
| L44 | Ia | 17 | 17 |
| L45 | III | 17 | 17 |
| L46 | III | 17 | 17 |
| L47 | III | 17 | 17 |
| L48 | II | 19 | 19 |
| L49 | II | 86 | 19 |
| L50 | III | 17 | 17 |
| L51 | III | 17 | 17 |
| L52 | III | 17 | 17 |
| L53 | III | 17 | 17 |
| L54 | III | 17 | 17 |
| L55 | III | 44 | 19 |
| V4 | Ia | 314 | |
| V5 | III | 6 | 7 |
| V7 | Ib | 12 | 10 |
| V12 | III | 405 | |
| V17 | Ia | 199 | 23 |
| V18 | III | 201 | 17 |
| V19 | Ia | 23 | 23 |
| V20 | III | 315 | 17 |
| V21 | II | 19 | 19 |
| V23 | NT | 17 | 17 |
| V24 | IV | 7 | 7 |
| V25 | NT | 19 | 19 |
| V27 | Ia | 23 | 23 |
| V29 | II | 10 | 10 |
| V30 | II | 226 | |
| V31 | Ia | 23 | 23 |
| V37 | Ia | 221 | 23 |
| V38 | Ia | 403 | |
| V44 | Ia | 402 | |
| V57 | III | 17 | 17 |
| V64 | III | 17 | 17 |
| V71 | Ib | 8 | 10 |
| V80 | II | 12 | 10 |
| V82 | III | 17 | 17 |
| V87 | NT | 401 | |
| V88 | II | 10 | 10 |
| V89 | NT | 2 | 1 |
| V91 | II | 49 | 1 |
| V93 | NT | 17 | 17 |
| V99 | II | 399 | 10 |
| V101 | V | 41 | 7 |
| V104 | II | 28 | 19 |
| V105 | III | 404 | |
| V11 | Ib | 84 | 7 |
| V113 | Ia | 221 | 23 |
| V114 | Ib | 10 | 10 |

G, souches gastriques ; L, souches isolées de LCR ; V, souches vaginales ; ST, sequence type et CC, complexe clonal determinés par MLST ; NT, non typable ; ND, non déterminé.

## 1. Souches bactériennes

Une collection de 111 souches humaines représentative de la diversité génétique de l'espèce *S. agalactiae*, a été sélectionnée parmi 276 souches de *S. agalactiae* épidémiologiquement non reliées, isolées en France entre 1986 et 1990, et provenant de 25 hôpitaux (Quentin *et al*., 1995).

Les souches provenaient de prélèvements réalisés à visée diagnostique ou de dépistage, selon la répartition suivante : 54 souches isolées de liquide céphalorachidien de nouveau-nés (atteints de méningites), 21 souches isolées de liquide gastrique de nouveau-nés asymptomatiques et 36 souches de colonisation vaginale (Tableau II).

Le sérotype de ces souches avait été préalablement déterminé par double diffusion en gel d'agarose et/ou agglutination de particules de latex selon le protocole décrit par Quentin *et al*. (Quentin *et al*., 1995). Six sérotypes ont été identifiés (Tableau II) : les sérotypes Ia (16 souches), Ib (12 souches), II (17 souches), III (55 souches), IV (3 souches) et V (3 souches), et cinq souches étaient non typables. La souche de *S. agalactiae* NEM316 de sérotype III et de ST23, et son mutant isogénique *ΔscpB-lmb* qui comprend une délétion pour l'intégralité du transposon composite comprenant les gènes *scpB* et *lmb* ont été utilisés comme souches témoins. La souche mutante NEM316*ΔscpB-lmb* a été générée par l'insertion du plasmide pG$^+$host5 dans le gène *lmb* de la souche sauvage NEM316, et la mobilisation ultérieure de ce plasmide selon le protocole décrit par Franken *et al*. (Franken *et al*., 2001).

Les souches ont été conservées a -80ºC en milieu Schaedler-vitamine K3 (bioMérieux, Marcy l'Etoile) contenant 10% de glycérol. Les souches de *S. agalactiae* ont été cultivées sur gélose Trypticase-soja (TS) comprenant 5% de sang de cheval (bioMérieux).

La souche *Escherichia coli* DH5α a été utilisée comme hôte pour l'amplification et la sélection de plasmides, et cultivée à 37℃ en milieu Luria Bertani (LB : 0,5% NaCl, 0,5% Extrait de levure, 1% Bactotryptone) supplémenté avec 300 μg/mL d'érythromycine afin de sélectionner les cellules transformées par le plasmide pG$^+$host5 portant le gène *erm* de résistance à l'érythromycine. Les souches de *S. agalactiae* transformées par p$^+$Ghost5 ont été sélectionnées en présence de 2 μg/mL d'érythromycine.

## 2. Extraction de l'ADN génomique

### 2.1. Extraction de l'ADN

Chaque souche est ensemencée sur une gélose TS à 5% de sang de cheval et incubée pendant 24 heures à 37°C. Les colonies sont mises en suspension dans 700 µL de tampon de lyse (NaCl 1 M, Tris HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 5 mM pH 8, Triton 0,5 X), auquel sont ajoutés 20 µL de lysozyme 10% (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier) et incubées à 37°C pendant 1 heure. Vingt microlitres de protéinase K (20 mg/mL, Sigma-Aldrich) sont ajoutés à la suspension bactérienne qui est ensuite incubée à 60°C pendant 1 heure. L'extraction de l'ADN est réalisée par addition d'un volume égal du mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1 v/v). Après agitation, la suspension obtenue est centrifugée pendant 15 min à 15000 × g, la phase aqueuse supérieure contenant l'ADN est récupérée et une nouvelle extraction est réalisée dans des conditions identiques. Après une centrifugation de 10 min à 15000 × g, l'ADN contenu dans la phase supérieure est précipité par addition de 0,1 volume de NaCl 1 M et 2 volumes d'éthanol absolu conservé à -20°C puis incubation du mélange 30 minutes à -80°C. Après une centrifugation de 10 min à 15000 × g, le surnageant est éliminé et le culot séché et repris dans 100 µL de TE 1X (Tris 10 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM). Le mélange obtenu est conservé à 4°C afin d'éviter la dégradation des ADN.

### 2.2. Dosage des ADN

La concentration de l'ADN extrait est déterminée par spectrophotométrie à 260 nm (longueur maximale d'absorbance des acides nucléiques). Par application de la loi de Beer-Lambert, une unité d'Absorbance (Abs) à 260 nm correspond à une concentration d'ADN bicatenaire de 50 µg/mL. La pureté de l'ADN est contrôlée en mesurant l'absorbance à 280 nm (longueur maximale d'absorbance des protéines). Ainsi, un rapport $Abs_{(260\ nm)}$ / $Abs_{(280\ nm)}$ inférieur à 1,8 indiquera une contamination de l'échantillon par des protéines.

## 3. Amplification par polymérisation en chaine (PCR)

Les conditions optimales d'amplification sont obtenues avec un mélange réactionnel de 20 µL constitué de : tampon Taq 1X (Roche Diagnostics, Mannheim,

Allemagne), MgCl2 1,5 mM, 0,2 µM de chacune des amorces sens et antisens (Eurogentec, Seraing, Belgique), 0,2 mM de chacun des dNTP, 0,5 U de *Taq* polymérase (Roche Diagnostics) et 50 ng d'ADN génomique bactérien comme matrice. La PCR se déroule en plusieurs étapes dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Foster City, USA), à une température d'hybridation de 55℃. Elle commence par une étape initiale de dénaturation (5 minutes à 94℃), une seconde étape de 35 cycles comportant 1 minute de dénaturation à 94℃, 30 secondes d'hybridation à 55 ℃ et 1 minute d'élongation à 72℃, suivie d'une élongation finale de 10 minutes.

Les amorces utilisées lors des différentes réactions d'amplifications (Eurogentec) ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer3 Plus disponible sur Internet (http://www.bioinformatics.nl/cgi_bin/primer3plus/ primer3plus .cgi).

### 3.1 Amplification par PCR en point final des gènes *lmb* et *scpB* ainsi que de la région intergénique *scpB-lmb*

La présence des gènes *lmb* et *scpB* ainsi que des éléments génétiques mobiles de la région intergénique *scpB-lmb* est déterminée par PCR en utilisant les couples d'amorces présentés dans le tableau III.

**Tableau III. Amorces utilisées lors des amplifications par PCR des gènes *lmb, scpB* et des éléments génétiques mobiles.**

| Amorces | Séquence (5'-3') | Taille de l'amplicon (pb) | Région cible |
|---|---|---|---|
| *lmb130*<br>*lmb970rc* | GTTGTGQGTTTAGTAATGATAGC<br>GATATGTCTTGTTTCCGCTTG | 840 | *lmb* |
| *scpB40*<br>*scpB1996rc* | ATTGCGCTTATGTCTACGAG<br>GAACGGTGACTTGTTTGCTG | 1956 | *scpB* |
| *scpB1516*<br>*scpB3402rc* | GCCAAACTTTCTGGAACTAGT<br>TCCCAAGAAGAAAGTGGTCA | 1886 | *scpB* |
| *scpB3382*<br>*rlmb51* | TTATGACCACTTTCTTCTTGGGA<br>CTATCATTACTAAACTCACAAC | 400,1600<br>ou 2200 | région intergénique *scpB-lmb* |
| *scpB3382*<br>*rIS1548* | TTATGACCACTTTCTTCTTGGGA<br>CTTCATCCTTTTGTGCCCGGACATC | 1430 | IS*1548* entre *scpB* et *lmb* |
| *scpB3382*<br>*rGBSi143* | TTATGACCACTTTCTTCTTGGGA<br>CTCCATTTCCTCATCGTCAG | 1546 | GBSi1 entre *scpB* et *lmb* |

### 3.2 Amplification par PCR en point final de l'ADNc du gène *lmb*.

Afin de déterminer la taille de l'UTR (untranslated region) en 5' du gène *lmb* chez les souches présentant IS*1548*, des PCR ont été effectuées sur les ADNc de souches avec et sans IS*1548* dans la région intergénique *scpB-lmb*, en utilisant les amorces présentées dans le tableau IV. La position de ces amorces est representée dans la figure 18.

**Tableau IV. Amorces utilisées pour caractériser l'extrémité 5' de l'ADNc du gène *lmb.***

| Amorces | Séquence (5'-3') | Taille de l'amplicon (pb) | Région cible |
|---|---|---|---|
| *Primer1 rlmb715* | CTGGTTAATAACTGGTTAAATTAT<br>CTTTCAATTGGCGAGGAGAG | 754 | Région intergénique *lmb-scpB* |
| *Primer2 rlmb715* | TTGACAAAGCATTGATAAAGGA<br>CTTTCAATTGGCGAGGAGAG | 786 | Région intergénique *lmb-scpB* |
| *Primer3 rlmb715* | GGGCACAAAAGGATGAAGAG<br>CTTTCAATTGGCGAGGAGAG | 848 | Extrémité 3' de l'IS*1548* |
| *Primer4 rlmb715* | TGGAGAAAGAGGCTAAGCAGA<br>CTTTCAATTGGCGAGGAGAG | 908 | Extrémité 3' de l'IS*1548* |

## 4. Construction de mutants de délétion

### 4.1 Préparation des cellules électrocompétentes et protocole d'électroporation

4.1.1 *E.coli* DH5α.

La souche est précultivée dans 5 mL de milieu SOB (tryptone 20 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 0,5 g/L) sous agitation pendant une nuit à 37℃. Puis ces 5 mL de préculture sont ensemencés dans 250 mL de bouillon SOB préchauffé à 37℃ et sont mis à incuber sous agitation jusqu'à atteindre une $DO_{595}$ de 0,4. La culture est alors mise dans la glace et les manipulations qui suivent sont effectuées au froid. La culture est centrifugée à 3000 x g à 4℃ pendant 15 min et le culot est lavé par resuspension dans 100 mL de glycérol 10 %. Cette opération est répétée plusieurs

fois avec des volumes de glycérol décroissants. Le culot est enfin repris dans 1 mL du même tampon puis des aliquots de 40 µL sont conservés à - 80°C.

Pour l'électroporation d'*E. coli* DH5α, les cellules compétentes sont décongelées quelques minutes dans la glace. Entre 1 à 3 µL de produits de ligation sont ajoutés à 40 µL de cellules, puis le mélange est transféré dans une cuvette d'électroporation (0,2 cm) (Eurogentec). La cuvette est placée dans le Micropulser TM (BioRad) en utilisant le programme Ec2 (2,5 kV; 5 ms). Après l'électroporation, 1 mL de milieu SOC (glucose 20 mM, MgCl2 10 mM, MgSO4 10 mM, KCl 2,5 mM, NaCl 10 mM, tryptone 20 g/L, extrait de levure 5 g/L) est ajouté immédiatement. La suspension est incubée 1 h à 37°C avant d'être étalée sur gélose LB additionnée d'érythromycine à 300 µg/mL.

4.1.2 *S. agalactiae*.

La souche L29 de *S. agalactiae* de ST19 et de sérotype III, qui possède IS*1548* dans la région intergénique *scpB-lmb*, est rendue compétente selon le protocole décrit par Framson *et al.* (Framson *et al*., 1996). La souche est précultivée dans 10 mL de milieu Todd Hewitt enrichi (THE : saccharose 0,5 M, extrait de levure 2 g/L) additionné de glycine à concentration subinhibitrice (0,4 à 1%) sous agitation pendant une nuit à 37°C. Puis ces 10 mL de préculture sont ensemencés dans 100 mL du même milieu préchauffé à 37°C. Cette culture est ensuite incubée à 37°C sous agitation jusqu'a atteindre une $DO_{595}$ de 0,25. La culture est alors mise dans la glace et les manipulations qui suivent sont effectuées au froid. La culture est centrifugée à 3000 x g à 4°C pendant 15 min et le culot est lavé une fois par resuspension dans 35 mL de tampon saccharose 0,625 M, pH 4. Le culot de centrifugation est ensuite repris dans 150 µL du même tampon puis des aliquots de 50 µL sont congelés et conservés à - 80°C.

Pour l'électroporation, les cellules compétentes sont décongelées quelques minutes dans la glace. Environ 1 µg d'ADN plasmidique sont ajoutés à 50 µL de cellules, puis le mélange est transféré dans une cuvette d'électroporation (0,2 cm) (Eurogentec). La cuvette est placée dans le Micropulser TM (BioRad) en utilisant le programme Ec2 (2,5 kV; 5 ms). Après l'électroporation, 2 mL de milieu THE sont ajoutés immédiatement. La suspension est incubée 2 h à 28°C, avec ajout de 0,01 µg

d'érythromycine durant la deuxième heure d'incubation, avant d'être étalée sur gélose TS additionnée d'érythromycine à 2 µg/mL.

### 4.2 Clonage dans le vecteur pG$^+$host5

Ce plasmide de 5,2 kb (Figure 10) comprend un système de réplication thermosensible (Ts) effectif à 28°C chez les bactéries Gram+, un système de réplication pBR322 effectif à 37°C chez les bactéries Gram-, un site multiple de clonage et un gène de résistance à l'érythromycine (Biswas *et al*., 1993). Le système de réplication Ts comporte une origine de réplication ainsi que la protéine RepA induisant son fonctionnement. Cette protéine est inactive au dessus d'une température de 37°C inhibant ainsi le système de réplication. Un tel plasmide se réplique normalement à 28°C chez les bactéries Gram +. A une température supérieure à environ 37°C, la réplication de ce plasmide est inhibée.

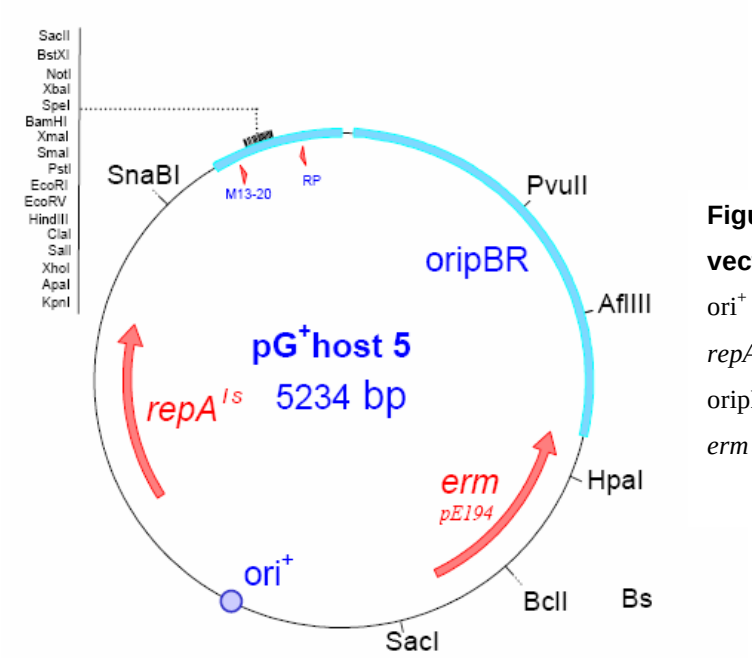



**Figure 10. Représentation schématique du vecteur pG$^+$host5.**

ori$^+$ origine de réplication Gram +

*repA*$^{ts}$ : gène codant la protéine RepA thermosensible

oripBR : origine de réplication Gram- (pBR322)

*erm* : gène de résistance à l'érythromycine

La délétion de la séquence d'insertion IS*1548* située dans la région intergénique *scpB-lmb*, a été effectuée par remplacement de la totalité de cette région chez la souche L29 possédant IS*1548* par celle de la souche V27 sans élément génétique mobile entre *lmb* et *scpB* (Figure 11). Pour cela, nous avons dans un premier temps amplifié par PCR une séquence comprenant 421 pb de l'extrémité 3' du gène *scpB*, l'ensemble de la région intergénique *scpB-lmb* et 400 pb de l'extrémité 5' du gène *lmb,* en utilisant comme matrice l'ADN génomique de la souche

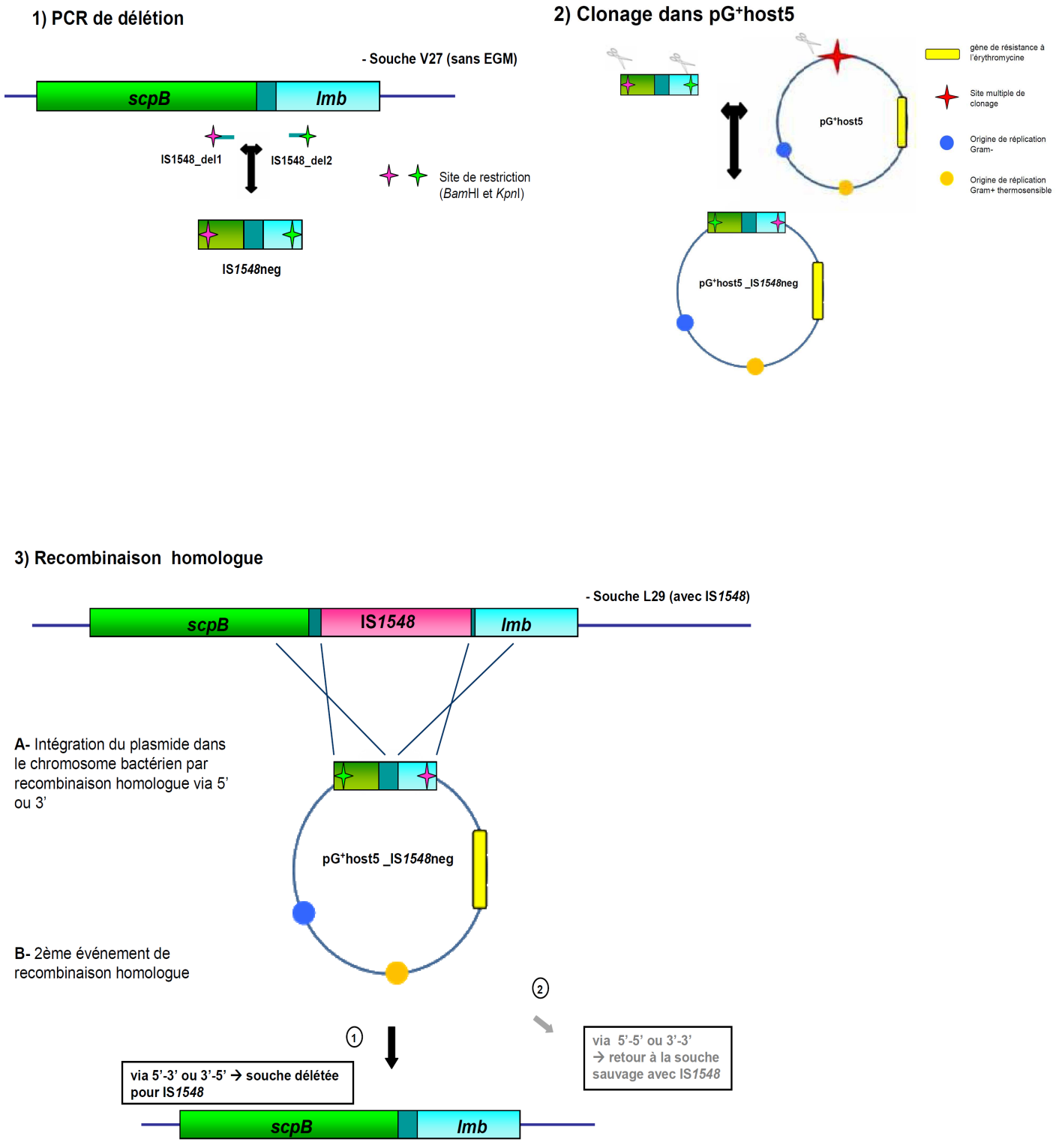



**Figure 11. Construction de mutants de délétion de l'IS*1548* située dans la région intergénique *scpB-lmb* de la souche L29.**

1) Construction de la PCR de délétion à partir d'une souche sans EGM entre *scpB* et *lmb*

2) Clonage de la PCR de délétion dans le plasmide pG$^+$host5

3) Délétion de l'IS*1548* par double recombinaison homologue

V27 et comme amorces *IS1548*_del1 et *IS1548*_del2 (Figure 11-1) (Tableau V). Les sites de restriction *Bam*H1 de l'amorce *IS1548*_del1 et *Kpn*I de l'amorce *IS1548*_del2 sont soulignés. Le produit de PCR est ensuite purifié grâce au kit Montage® PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore Corporation, Bedford, USA), selon les recommandations du fabricant.

Le produit de PCR purifié ainsi que le plasmide pG$^+$host5 sont digérés par les deux enzymes de restriction *Bam*HI et *Kpn*I (Roche Diagnostics) dans un mélange réactionnel de 30 µL (tampon L 1X ; enzymes 0,25 unité) pendant 3 h à 37°C. La réaction est stoppée à 70°C pendant 20 min puis les produits de restriction sont précipités à l'éthanol absolu avant d'être suspendus dans de l'eau. La ligation s'effectue dans un mélange réactionnel constitué de tampon ligase 1X et d'1 unité T4 DNA ligase (BioLabs®, New England) en présence de 150 ng d'insert et 150 ng de plasmide restreint (environ 5 fois plus de moles d'insert que de vecteur), pendant une nuit à 19°C (Figure 11-2).

Le produit de ligation est électroporé dans les cellules électrocompétentes d'*E. coli* DH5α. Les bactéries transformées sont sélectionnées par leur croissance en présence d'érythromycine à 300 µg/mL. Pour s'assurer de la présence de l'insert dans le plasmide, une PCR est réalisée sur les colonies avec les amorces *pG+host4630/5117* (Tableau V) spécifiques du vecteur et qui encadrent le site multiple de clonage. Les transformants sont mis en culture en bouillon LB contenant de l'érythromycine à 300 µg/mL afin d'extraire le plasmide à l'aide du kit Mini Prep Qiaprep Spin (Qiagen, Hilden, Allemagne). Une restriction enzymatique est réalisée sur l'ADN plasmidique obtenu afin de vérifier la présence de l'insert dans le plasmide pG$^+$host5_IS*1548*neg.

**Tableau V. Amorces utilisées lors de la délétion de la séquence IS*1548*.**

| Amorces | Séquence (5'-3') | Région cible |
|---|---|---|
| *IS1548*_del1 | CCGCGGATCCGGCCACTCTAATAAGCCAGAA | *scpB* 3'+région intergénique |
| *IS1548*_del2 | GGGGGTACCAATGCCTTGTGTGACTTCCA | *scpB-lmb+ lmb* 5' |
| *scpB2987* | AATGGAAGGCGCTACTGTTC | région intergénique *scpB-lmb* |
| *rlmb497* | GGATCCAAACGTCCTAGCTC | |
| *pG$^+$host 4630* | *ATGGCGCATTAACGGAATAA* | région encadrant le MCS |
| *pG+host 5517* | TGTGGAATTGTGAGCGGATA | |

### 4.3 Recombinaison homologue

Le plasmide pG$^+$host5_IS*1548*neg est ensuite introduit dans la souche L29 de *S. agalactiae* par électroporation (Figure 11-3). Les transformants sont sélectionnés sur gélose TS contenant 2 µg/mL d'érythromycine à la température permissive de 28℃. Ces transformants sont ensuite repiqués à 37° C pendant une nuit sur le même milieu. A cette température, le plasmide ne peut plus se répliquer et seules les bactéries ayant intégré le plasmide dans leur génome par recombinaison homologue peuvent se développer. Le deuxième événement de recombinaison conduit à l'élimination de la partie interne aux fragments homologues (Figure 11-3). Pour favoriser cet événement, quatre transformants ayant intégré le plasmide dans leur génome sont ensuite ensemencés dans des bouillons TH à 28℃ sans antibiotique et des repiquages quotidiens sont réalisés pendant 6 jours afin d'obtenir l'excision du plasmide et la délétion de la séquence d'insertion IS*1548*. Cette délétion est ensuite vérifiée par PCR à l'aide des amorces *scpB2987/ rlmb497* (Tableau V) qui encadrent le site de délétion puis par séquençage de ce produit de PCR.

## 5. Traitement des ARN

### 5.1 Extraction des ARN

Les souches sont cultivées dans 10 mL de bouillon TH pendant une nuit. Ces cultures sont ensuite repiquées à raison de 1% du volume final dans 50 mL de ce même milieu et incubées à 37℃ jusqu'à obtenir une $DO_{595}$ égale à 1,2 correspondant à la phase stationnaire. La culture bactérienne est alors centrifugée 20 minutes à 3000 × g et le culot bactérien est repris dans 1,5 mL de tampon TE pour être à nouveau centrifugé 3 minutes à 10000 × g. Le culot est alors congelé à -80ºC. Notons que le matériel et les solutions utilisées ont été préalablement traités par incubation à 37℃ avec du diéthylpyrocarbonate (DEPC) 0,1% (Sigma) pendant une nuit puis autoclavés.

La lyse bactérienne et la purification des ARN sont réalisées à l'aide de l'appareil Tissue Lyser (Qiagen) et du kit RNeasy Plus Mini (Qiagen). La totalité du culot bactérien est repris dans 500 µL de solution de lyse puis transférée dans un

tube de 2 mL contenant 0,5 g de billes de verre de 150 à 212 µm de diamètre (Sigma). Une lyse mécanique des bactéries est réalisée par l'appareil Tissue Lyser sous une agitation de 30Hz 2 fois pendant 3 minutes à 4℃. Les tubes sont ensuite centrifugés 5 minutes à 15000 × g à 4℃ afin de sép arer les billes du surnageant. Les ARN contenus dans le surnageant sont purifiés par passage sur les colonnes d'extraction du kit RNeasy Plus Mini suivant le protocole du fabricant. Au final, les ARN sont élués par 30 µL d'eau (RNase free) et dosés à 260 nm. La concentration d'ARN est calculée par application de la loi de Beer-Lamber, 1 unité d'Abs à 260 nm correspondant à une concentration d'ARN monocaténaire de 40 µg/mL.

Afin d'éliminer l'ADN résiduel, les échantillons sont ensuite traités par le kit TurboDNA-*free* (Ambion, Cambridgeshire, Royaume-Uni). Sous un volume de 50 µL, 10 µg d'ARN totaux sont traités par 2 unités de TurboDNase selon le protocole de fabricant. Pour vérifier que l'ADN a bien été éliminé, l'absence d'amplification du gène de ménage *gyrA* est recherchée par PCR (35 cycles d'amplification) en utilisant 2 µL de l'ARN extrait comme matrice.

La qualité des ARN extraits est vérifiée en réalisant une migration de 2 µL d'ARN sur gel d'agarose à 1%. La bonne intégrité de l'ARN se traduit par la présence de deux bandes correspondant aux ARN ribosomaux 23S et 16S alors que la présence d'un « smear » indique une dégradation des acides nucléiques.

### 5.2 Obtention d'ADN complémentaire par transcription inverse

A l'aide du kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen), 1 µg d'ARN extrait est rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) selon les instructions du fournisseur. Ce kit inclut une étape préalable d'élimination de toute contamination d'ADN (traitement à la DNase à 42ºC pendant 2 minutes). La réaction de transcription inverse est ensuite réalisée à 42ºC pendant 15 minutes sous un volume final de 20 µL par la Quantiscript® Reverse Transcriptase. La réaction est ensuite stoppée par inactivation de l'enzyme à 95ºC pendant 3 minutes. Enfin, les ADNc ainsi obtenus sont stockés à -80 ºC pour une utilisation ultérieure.

## 5.3 Quantification des ADNc par PCR en temps réel

### 5.3.1 Principe

La PCR quantitative permet de quantifier en temps réel les produits de la réaction de PCR. Cette méthode se base sur la détection d'un signal fluorescent qui est produit de façon proportionnelle à l'amplification du produit de PCR, cycle après cycle. La détection de l'ADN se fait avec un fluorophore, le SYBR-Green, un agent intercalant très stable qui peut s'insérer dans la chaine d'ADN uniquement si elle se trouve sous la forme double brin. En solution, le SYBR-Green n'est pas fluorescent lorsqu'il est sous sa forme libre, alors qu'il l'est lorsqu'il est lié à l'ADN. Le taux de fluorescence libéré est alors proportionnel à la quantité de produits de PCR générés à chaque cycle. Un système optique couplé au thermocycleur permet de mesurer cette fluorescence à la fin de chaque cycle. Cette variable augmentant selon une loi exponentielle, on obtient une courbe d'amplification de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. Le Ct (cycle threshold) correspond au nombre de cycles nécessaires pour obtenir une quantité de fluorescence donnée. A partir du Ct, on peut déduire la quantité d'ADNc de départ (elle même liée à la quantité d'ARNm avant la réaction de transcription inverse). L'efficacité de l'amplification qui peut être calculée à partir de cette relation doit être entre 95 et 100%. Une efficacité de 100% correspond au doublement du nombre de copies à chaque cycle. Dans le but de déterminer l'efficacité d'amplification de chaque gène, des gammes d'étalonnage (50 ng, 5 ng et 0,5 ng) sont réalisées avec l'ADNc de la souche L19 choisie comme référence.

### 5.3.2 Conditions et protocole

Les couples d'amorces permettant l'amplification des gènes *gyrA*, *lmb* et *scpB* sont présentés dans le Tableau VI. La taille des fragments amplifiés est de l'ordre de 100 à 150 pb. La spécificité des amorces est contrôlée par une PCR en point final.

La PCR quantitative est réalisée dans des plaques 96 puits, scellées par un film plastique pour éviter l'évaporation. Chaque réaction est effectuée sous un volume final de 25 µL, contenant 50 ng d'ADNc, 12,5 µl de QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), et 0,3 µM d'amorces sens et antisens spécifiques à chacun des gènes étudiés, dans le thermocycleur iCycler iQ detection system

(BioRad). Les conditions de PCR sont de 95℃ pendant 15 minutes suivi de 40 cycles de 15 secondes à 94℃, 30 secondes à 58℃ et 30 secondes à 72℃. La spécificité de l'amplification est ensuite vérifiée lors d'une étape finale par la réalisation d'une «courbe de fusion». Cette etape consiste à placer les amplicons à 70℃, puis à augmenter la température jusqu'à 95℃ à raison de 0,05℃ par seconde Nous avons utilisé le gène *gyrA* (codant la sous unité A de l'ADN gyrase) comme gène de référence (Gutekunst *et al*., 2003, Samen *et al*., 2006) dont l'expression reste stable dans les différentes conditions expérimentales. Ainsi, pour chaque échantillon d'ADN testé, la quantification de *gyrA* est effectuée en parallèle de celle des gènes d'intérêt (ici *lmb* et *scpB*). Tous les tests sont réalisés en double à chaque expérience et les expériences sont répétées (au moins) trois fois.

**Tableau VI. Amorces utilisées pour l'amplification par PCR en temps réel des gènes *gyrA*, *lmb* et *scpB.***

| Amorces | Séquence (5'-3') | Taille de l'amplicon (pb) | Région cible |
|---|---|---|---|
| *lmb76*<br>*rlmb193* | CCCAAACAGCCTACGCAAG<br>TGCCTGCACCTGATTGGATC | 117 | *lmb* |
| *scpB99*<br>*rscpB238* | TGTGACAGAAGACACTCCTG<br>CGTCATCTGCTACTGTTTCTCC | 139 | *scpB* |
| *gyrA*<br>*rgyrA* | CGGGACACGTACAGGCTACT<br>CGATACGAGAAGCTCCCACA | 128 | *gyrA* |

5.3.3 Analyse des résultats

L'analyse des résultats s'effectue par la méthode comparative des Ct qui comporte deux niveaux de comparaison. Cette méthode consiste, dans un premier temps, après amplification en parallèle du gène d'intérêt et du gène de référence *gyrA*, à calculer le ΔCt correspondant à la différence entre le Ct du gène d'intérêt et le Ct du gène référence. Dans un second temps, les résultats obtenus pour chaque souche sont comparés à ceux de la souche L19 qui n'a pas d'EGM entres les gènes *scpB* et *lmb* choisie comme souche de référence. Ainsi, le calcul ΔΔCt correspond à la différence entre le ΔCt de la souche testée et celui de la souche de référence. Enfin, le niveau de transcription du gène d'intérêt est donné par la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

## 6. Liaison des bactéries aux protéines

### 6.1 Immobilisation des protéines et préparation des inoculums bactériens

Les protéines, fibronectine de plasma humain (Sigma) et laminine de placenta humain purifiée par chromatographie d'immunoaffinité (Sigma), sont diluées à raison de 10 µg/mL dans du tampon PBS stérile (150 mM NaCl, 10 mM phosphate de sodium, pH 7,2). Cent microlitres de ces solutions sont déposés dans des plaques en polystyrène 96 puits à fond plat (P96) (Ciblex, Ivry sur Seine) et incubés à température ambiante pendant 18 heures. Après 3 lavages au PBS pour éliminer les protéines en excès, les puits sont opérationnels pour le test d'adhésion.

Les souches bactériennes sont ensemencées dans 10 mL de bouillon TH durant une nuit à 37°C. Après centrifugation 10 minutes à 3000 × g, le culot est repris dans du tampon PBS. La concentration est ensuite ajustée par mesure de l'absorbance de la suspension à 595 nm selon l'inoculum désiré pour le test de liaison et pour le test ELISA.

### 6.2 Test de liaison à la fibronectine et à la laminine

Pour le test de liaison, 50 µL de suspension bactérienne contenant $1 \times 10^5$ à $1 \times 10^6$ UFC/mL sont mis en contact durant 90 min à 37°C avec les protéines d'intérêt préalablement immobilisées sur les plaques P96. Après 5 lavages au PBS pour éliminer les bactéries n'ayant pas adhéré aux protéines, 100 µL d'une solution de sérine-protéase 0,01% (Sigma) sont ajoutés dans les puits et incubés durant 15 min à 37°C afin de détacher les bactéries adhérentes comme décrit précédemment (Rosenau *et al*., 2007). Le contenu des puits est prélevé par aspirations et refoulements vigoureux et la quantité de bactéries recueillies est ensuite déterminée par dénombrement des UFC sur gélose TS. Pour chaque préparation, le pourcentage d'adhésion aux protéines étudiées est obtenu par le ratio entre le nombre de bactéries ayant adhéré et le nombre de bactéries présentes dans les inoculums.

## 7. Quantification de la protéine Lmb par la méthode ELISA

Afin de quantifier la protéine Lmb exprimée à la surface bactérienne, une plaque P96 (Ciblex) est inoculée avec 100 µL de PBS/puits contenant 5 × $10^5$ UFC de différentes souches bactériennes, incubée durant une nuit à 4°C, puis lavée 3 fois avec 200 µL de PBS. Les sites non spécifiques sont ensuite bloqués par 200 µL d'une solution de sérum albumine bovine 2% (BSA, Sigma) diluée dans du PBS, 1 h à température ambiante. La plaque est de nouveau lavée 3 fois avec du PBS, puis incubée 1 h à 37°C avec 100 µL d'un sérum de lapin immunisé par la protéine Lmb (Spellerberg *et al.,* 1999a) (Sérum anti Lmb dilué au 1/200 dans du PBS, BSA 2%, Tween 0,05%). Un témoin négatif est réalisé avec 100 µL d'une solution de sérum préimmun de lapin à la même dilution. La plaque est de nouveau lavée avec du PBS-Tween 0,05% puis incubée 1 h à 37°C avec 100 µL d'une solution d'Ac secondaire (Ac anti IgG de lapin dilué au 1/10000 dans du PBS, BSA 2%, Tween 0,05%) couplé à la péroxydase (Camarillo, CA, Etats Unis). L'ajout de 200 µL d'O-phénylènediamine dihydrochloride (OPD, Sigma) à 0,4 mg/mL pH 5 pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière permet le développement d'une coloration jaune proportionnelle à la quantité de protéine Lmb exprimée en surface des bactéries. La réaction est stoppée par 50 µL d'une solution d'HCl 3 M et l'intensité de la coloration est déterminée par spectrophotométrie à 492 nm (iEMS ReaderMF, Labsystems, Helsinki, Finlande).

Afin de rapporter la quantité de protéine Lmb au nombre de bactéries présentes dans chaque puits, le nombre de bactéries ayant adhéré au plastique est déterminé par la technique de coloration au cristal violet (CV) (Djordjevic *et al*., 2002, Hindré *et al*., 2008, Valle *et al*., 2003) selon le protocole suivant : parallèlement à la plaque pour test ELISA, une plaque 96 puits à fond plat (P96) est inoculée avec 100 µL de PBS/puits contenant 5 × $10^5$ UFC de différentes souches bactériennes et incubée durant une nuit à 4°C, permettant ainsi l'adhésion des bactéries au fond des puits. Les tapis bactériens sont lavés 3 fois avec 200 µL de PBS afin d'éliminer les bactéries qui ne sont pas fixées, puis colorés avec 100 µL de solution de CV 0,3% pendant 15 minutes et lavés 3 fois avec 200 µL d'eau milliQ. La décoloration par 100 µL d'éthanol absolu est faite sur un plateau rotatif pendant 45 minutes, puis pour la lecture au spectrophotomètre à 590 nm (Molecular devices, Versa max microplate reader), le contenu des puits est transvasé dans une nouvelle plaque P96.

## 8. Quantification de la protéine Lmb par Western blot.

L'extraction des protéines totales de *S. agalactiae* est effectuée selon le protocole décrit par KIing *et al*. (KIing *et al*., 1999). Pour chaque extrait, 10 µg de protéines sont séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide à 12% en présence de SDS (SDS-PAGE) puis transférées sur une membrane Immobilon P difluorure de polyvinylidène (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Allemagne). La membrane est saturée en PBS- lait écrémé 5% pendant une heure à température ambiante. Après 10 minutes de lavage en PBS, la membrane est révélée avec un sérum de lapin immunisé par la protéine Lmb dilués au 1/200 (Spellerberg *et al*., 1999a), pendant une heure à température ambiante. Elle est ensuite lavée 4 fois pendant 10 min en PBS-Tween 0,05%, puis incubée avec des anticorps secondaires anti-lapin couplés à la péroxydase de raifort (HRP) (Camarillo) dilués au 1/8000, pendant une heure à température ambiante. Après 4 lavage en PBS-Tween 0,05%, la détection des anticorps secondaires liés est visualisée par le système ECL (Amersham Biosciences), conformément aux instructions fournies par le fabricant.

## 9. Caractérisation génétique des souches par multilocus sequence typing (MLST)

### 9.1 Principe

La technique de typage par séquençage multilocus consiste en l'analyse du polymorphisme allélique de gènes de ménage. Pour *S. agalactiae*, le système a été développé par Jones *et al*. et déposé sur un site internet accessible en libre consultation (http://pubmlst.org/sagalactiae/) (Jones *et al*., 2003). Les gènes de ménage analysés sont au nombre de sept, répartis sur l'ensemble du génome de *S. agalactiae* : *adhP* (gène codant l'alcool déshydrogénase), *pheS* (gène codant la phénylalanine ARNt synthétase), *atr* (gène codant un transporteur des acides aminés), *glnA* (gène codant la glutamine synthétase), *sdhA* (gène codant la sérine déshydratase), *glck* (gène codant une glucose kinase) et *tkt* (gène codant une transcétolase) (Tableau VII).

### 9.2 Amplification des gènes de ménage

L'amplification est obtenue en utilisant les amorces dessinées par Jones et al. (Jones *et al*., 2003) (Tableau VII). Les conditions optimales d'amplification sont obtenues dans un volume final de 50 µL avec le mélange réactionnel suivant : 1,5 mM de MgCl2 (Applied Biosystems), 200 µM de chacun des dNTPs (Amersham Biosciences), 0,5 µM de chaque amorce (Eurogentec), et 2,5 unités d'*AmpliTaq* DNA Polymérase (Applied Biosystems) en presence du tampon 1X de l'enzyme auxquels sont ajoutés 50 ng d'ADN. La réaction de PCR est réalisée dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA). Après un premier cycle de dénaturation de l'ADN de 1,5 minute à 94°C, 30 cycles (comprenant une dénaturation de 30 secondes à 94°C, une hybridation des amorces de 30 secondes à 50°C et une élongation de 1 minute à 72°C) sont réalisés, suivis d'un cycle d'élongation finale de 7 minutes à 72°C. Les produits de PCR sont contrôlés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%

**Tableau VII. Amorces utilisées pour l'analyse en multilocus sequence typing.**

| Locus | Amorce sens (5' à 3') | Amorce anti-sens (5' à 3') | Taille de l'amplicon (pb) | Taille du fragment étudié (pb) |
|---|---|---|---|---|
| *adhP* | GGTGTGTGCCATACTGATTT | ACAGCAGTCACAACCACTCC | 611 | 498 |
| *pheS* | ATATCAACTCAAGAAAAGCT | TGATGGAATTGATGGCTATG | 597 | 501 |
| *atr* | ATGGTTGAGCCAATTATTTC | CCTTGCTCAACAATAATGCC | 665 | 501 |
| *glnA* | AATAAAGCAATGTTTGATGG | GCATTGTTCCCTTCATTATC | 594 | 498 |
| *sdhA* | AACATAGCAGAGCTCATGAT | GGGACTTCAACTAAACCTGC | 602 | 519 |
| *glck* | GGTATCTTGACGCTTGAGGG | ATCGCTGCTTTAATGGCAGA | 593 | 459 |
| *tkt* | ACACTTCATGGTGATGGTTG | TGACCTAGGTCATGAGCTTT | 588 | 480 |

D'après Jones *et al*., 2003

### 9.3 Purification des produits de PCR

Les produits de PCR sont purifiés à l'aide du kit Montage$^{TM}$ PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore). Les produits amplifiés sont déposés sur la colonne, et centrifugés 15 minutes à 1700 × g, puis, après ajout de 20 µL d'eau ultrapure (Millipore), de nouveau centrifugés 2 minutes à 1700 × g. Les produits sont ensuite dosés par spectrophotométrie à 260 nm.

### 9.4 Séquençage des produits de PCR

La réaction de séquençage est réalisée avec le kit BigDye$^{TM}$ Terminator Mix v.3.0 (Applied Biosystems) dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 9600. Deux microlitres du BigDye$^{TM}$ Terminator Mix et 5 µM de l'amorce sens ou antisens sont ajoutés à 300 ng d'ADN. Le programme appliqué est le suivant : une étape de dénaturation de 10 secondes à 94ºC, une hybridation de 10 secondes à 50ºC, et une étape d'élongation de 4 minutes à 60ºC, ce cycle de trois étapes étant répété 30 fois. Le séquençage est réalisé sur les deux brins de chaque ADN (sens et antisens). Les produits séquencés sont purifiés par ajout de 20 µL d'eau et 60 µL d'isopropanol absolu puis précipitation 15 minutes à température ambiante et centrifugation de 30 minutes à 3000 × g. La purification est suivie d'un lavage à l'isopropanol 70%, d'une deuxième centrifugation de 10 minutes à 2000 × g, puis d'un séchage et d'une mise en solution dans 10 µL de formamide (Applied Biosystems). Les séquences nucléotidiques sont analysées par le séquenceur capillaire automatique ABI Prism® 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems).

### 9.5 Analyse *in silico*

#### 9.5.1 Analyse des séquences nucléotidiques

L'analyse des séquences nucléotidiques est réalisée à l'aide du logiciel d'exploitation ABI Prism DNA Sequencing Analysis (Applied Biosystems). Le logiciel BioEdit (Biological sequence alignement editor), disponible en ligne http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) est utilisé pour l'ajustement des séquences : leur alignement est réalisé avec le logiciel ClustalW Multiple alignment. Les séquences obtenues sont comparées aux séquences de *S. agalactiae* déposées sur le site internet : http://pubmlst.org/sagalactiae/.

9.5.2 Assignement des allèles et des profils alléliques

Pour chaque locus, toute mutation dans la séquence nucléotidique, silencieuse ou non, définit un nouvel allèle. A chaque variant allélique correspond un numéro d'identification attribué par Nicola Jones, « webmaster » du site MLST de *S. agalactiae* (Jones *et al*., 2003).

La combinaison de numéros correspondant aux allèles des sept loci étudiés définit un profil allélique ou Sequence Type (ST) (Maiden *et al*., 1998). L'ordre d'affectation des numéros aux sept loci a été fixé arbitrairement : *adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glck* et *tkt*. A chaque profil allélique correspond un numéro d'identification (ST-1, ST-2,….), attribué par le webmaster (Jones *et al*., 2003). L'identification des allèles et du profil de chacune des 111 souches de la collection a été réalisée en ligne par interrogation directe de la base de données accessible à l'adresse : http://pubmlst.org/sagalactiae/.

Le programme eBURST v3 (http://eburst.mlst.net/) a permis d'identifier les complexes clonaux (CC) au sein du jeu de données correspondant aux 111 souches (Feil *et al*., 2004). L'identification des CC permet de définir un ancêtre hypothétique commun au sein du complexe qui est appelé le ST fondateur. Les ST assignés à un même CC possèdent au moins cinq allèles en commun sur les sept loci étudiés avec au moins un autre membre du complexe (Feil *et al*., 2004). Ainsi, au sein d'un CC, les ST sont soit des variants simple locus (6 allèles identiques sur 7), soit des variants double locus (5 allèles identiques sur 7) d'au moins un autre ST du complexe. Les ST qui ne sont affiliés à aucun CC sont appelés singletons.

## 10. Analyses statistiques

Les données sont analysées à l'aide de l'analyse de variance à un facteur (ANOVA) avec le test post-hoc de Fisher. Lorsque les conditions de normalité ne sont pas respectées, un test non paramétrique ANOVA (Kruskal-Wallis) avec la méthode de Dunn est utilisé. Les valeurs de P inferieurs à 0,05% sont considérées comme statistiquement significatives. Les tests paramétriques sont effectués avec la version Minitab 10,51 (Minitab Inc, State College, PA, USA) et les tests non paramétriques avec la version SigmaStat 2.03 (Systat Software Inc, Richmond, CA, USA).

**Partie 1.** Activation du gène *lmb* par la séquence d'insertion IS*1548* située dans la région intergénique *scpB-lmb*

# C-Résultats

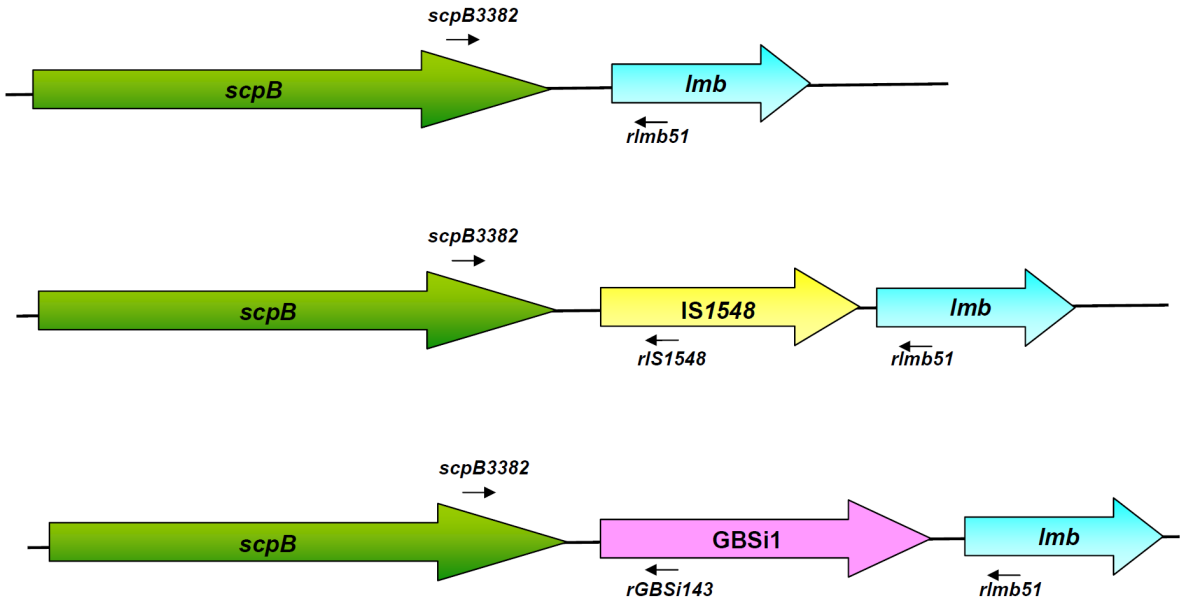



**Figure 12. Représentation schématique des différentes structures de la région intergénique *scpB-lmb*.**

Le couple d'amorces *scpB3382/rlmb51* a été utilisé pour déterminer la structure de la région intergénique *scpB-lmb*. La présence de la séquence d'insertion IS*1548* et de l'intron du groupe II GBSi1 entre les deux gènes *lmb* et *scpB* ont été confirmées en utilisant les amorces *scpB3382/r1S1548* et *scpB3382/rGBSi143.*

## 1. Prévalence des gènes *lmb* et *scpB*

L'amplification du gène *lmb* a été effectuée avec le couple d'amorces *lmb130/970rc* s'hybridant à l'intérieur du gène chez les 111 souches de GBS. Un fragment de la taille attendue est obtenu chez 109 souches et aucune amplification n'est obtenue chez seulement 2 souches (G8, V4) ainsi que chez la souche NEM316 Δ*scpB-lmb*.

En raison de la taille importante du gène *scpB* (3450 pb), l'amplification a été effectuée avec deux couples d'amorces *scpB40/1996rc* et *scpB1516/3402rc* s'hybridant à l'intérieur du gène. Un fragment de la taille attendue est obtenu avec les deux couples d'amorces chez les 109 souches possédant le gène *lmb* et aucune amplification n'est obtenue chez les deux souches dépourvues du gène *lmb* (G8 et V4) ainsi que chez la souche NEM316 Δ*scpB-lmb*.

## 2. Eléments génétiques mobiles (EGM) entre les gènes *lmb* et *scpB*

L'amplification de la région située entre les gènes *scpB* et *lmb* a été effectuée avec une amorce sens *scpB3382* s'hybridant vers l'extrémité 3' du gène *scpB* et une amorce anti-sens *lmb51rc* s'hybridant vers l'extrémité 5' du gène *lmb*. Un amplicon de trois tailles différentes peut être obtenu (Figure 12) : soit d'environ 400 pb signifiant que la souche ne possède pas d'EGM, soit d'environ 1,6 kb lorsque la souche possède la séquence d'insertion IS*1548*, soit d'environ 2,2 kb lorsque la souche possède l'intron de groupe II GBSi1. La présence de GBSi1 et celle de l'IS*1548* entre *scpB* et *lmb* ont ensuite été confirmées respectivement avec les amorces *scpB3382/rGBSi143* et *scpB3382/rIS1548* (Figure 12). GBSi1 a été trouvé chez 45,8% des souches (n=51), IS*1548* chez 16,5% des souches (n=18), et aucun EGM n'a été trouvé chez 36,7% des souches (n=40) et chez la souche NEM316.

## 3. Structure génétique de la population

Quarante profils alléliques différents (Sequence Types ST) ont été identifiés par MLST et les complexes clonaux (CC) regroupant les souches partageant au moins cinq allèles identiques sur sept ont été définis. La majorité de nos souches

sont regroupées dans quatre CCs : CC17 (34,2%), CC19 (18,9%), CC10 (13,6%), et CC23 (10,8%).

## 4. Distribution des éléments génétiques mobiles au sein des lignées clonales

Nous avons observé une forte corrélation entre la structure intergénique *scpB-lmb* et les lignées clonales obtenues par MLST. Ainsi, 94,7% des souches de CC17 possèdent l'intron GBSi1. De même toutes les souches de CC7, 91,7% des souches de CC23 et 73,3% des souches de CC10 n'ont pas d'EGM entre les gènes *scpB* et *lmb*. Enfin, 61,9% (13/21) des souches de CC19 possèdent IS*1548* alors que les 38,1% restantes (8/21) portent GBSi1 entre les gènes *scpB* et *lmb* (Tableau VIII).

**Tableau VIII. Distribution des 109 souches de *S. agalactiae* en fonction de la structure intergénique *scpB-lmb* et en fonction des complexes clonaux définis en MLST.**

| | | Complexes Clonaux (CC) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N° de souches | CC17 | CC19 | CC23 | CC10 | CC7 | CC1 | Autres CC |
| | | N° (%) | N° (%) | N° (%) | N° (%) | N° (%) | N° (%) | N° (%) |
| | n = 109 | n = 38 | n = 21 | n = 12 | n = 15 | n = 6 | n = 7 | n = 10 |
| Sans EGM | 40 | 2 (5.0) | 0 (0.0) | 11 (27.5) | 11 (27.5) | 6 (15.0) | 5 (12.5) | 5 (12.5) |
| GBSi1 | 51 | 36 (70.6) | 8 (15.7) | 1 (2.0) | 2 (3.9) | 0 (0.0) | 2 (3.9) | 2 (3.9) |
| IS*1548* | 18 | 0 (0.0) | 13 (72.2) | 0 (0.0) | 2 (11.1) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 3 (16.7) |

## 5. Confrontation entre complexes clonaux, structure intergénique *scpB-lmb*, sérotypes et origines cliniques des souches

Une corrélation entre les complexes clonaux et l'origine clinique des souches a été observée (Tableau IX). Ainsi, 73,7% (28/38) des souches de CC17 et 76,2% (16/21) des souches de CC19 sont responsables de méningites néonatales, alors que 58,3% (7/12) des souches de CC23 et 90,0% (36/40) des souches appartenant

aux autres CCs sont des souches de colonisation (souches gastriques néonatales et vaginales de l'adulte).

Une association entre structure intergénique *scpB-lmb*, CC, et sérotype capsulaire a été observée. Ainsi, 70,6% des souches qui possèdent GBSi1 appartiennent au CC17 et 72,2% des souches qui possèdent IS*1548* appartiennent au CC19 (Tableau VIII); toutes ces souches CC17 (sauf 2) et toutes ces souches CC19 sont de sérotype III (Tableau IX). Au contraire, 7 des 8 souches de CC19 qui possèdent l'intron GBSi1 sont de sérotype II (87,5%) (Tableau IX). Une plus grande diversité de sérotypes et de CC a été observée parmi les souches sans EGM avec notamment 32,5% de sérotype Ia dont la plupart appartiennent au CC23, 25% de sérotype Ib dont la plupart appartiennent au CC10, 12,5% de sérotype III, et 12,5% de sérotype II.

**Tableau IX. Propriétés des souches de *S. agalactiae* appartenant aux quatre principaux complexes clonaux (CC).**

| CC | Sérotype | N° de souches | EGM | N° souches invasives | N° souches de colonisation |
|---|---|---|---|---|---|
| 17 | Ia | 1 | GBSi1 | 1 | 0 |
| | **III** | **34** | **GBSi1** | **27** | 7 |
| | III | 1 | sans EGM | 0 | 1 |
| | NT[a] | 1 | GBSi1 | 0 | 1 |
| | NT | 1 | sans EGM | 0 | 1 |
| 19 | II | 7 | GBSi1 | 4 | 3 |
| | **III** | **13** | **IS*1548*** | **12** | 1 |
| | NT | 1 | GBSi1 | 0 | 1 |
| 23 | Ia | 10 | sans EGM | 4 | 6 |
| | Ia | 1 | GBSi1 | 0 | 1 |
| | III | 1 | sans EGM | 1 | 0 |
| 10 | Ib | 8 | sans EGM | 1 | 7 |
| | Ib | 1 | GBSi1 | 0 | 1 |
| | II | 3 | sans EGM | 0 | 3 |
| | II | 1 | GBSi1 | 0 | 1 |
| | II | 2 | IS1548 | 0 | 2 |

[a]NT: non typable

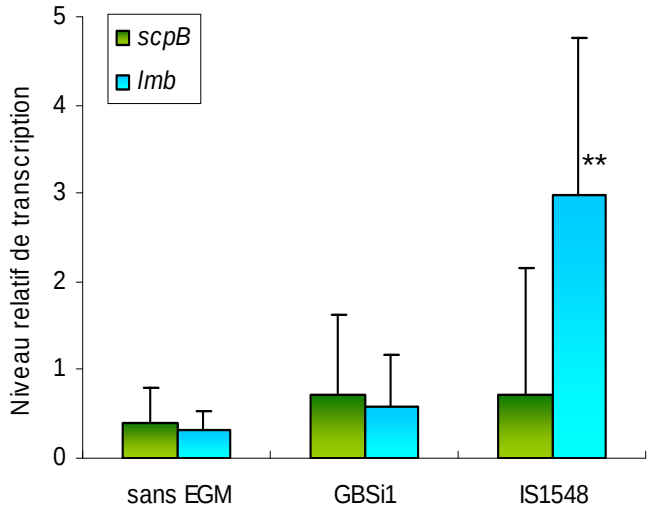



**Figure 13. Niveaux de transcription relative des gènes *scpB* et *lmb* de 26 souches de *S. agalactiae* en fonction de la structure de la région intergénique *scpB-lmb*.**

Le niveau de transcription de chaque gène est normalisé au niveau de transcription du gène *gyrA* et exprimé par rapport au niveau de la transcription chez la souche L19 (sans EGM). Les histogrammes sont les moyennes et les barres sont les écarts-types des moyennes de niveau de la transcription de chaque groupe de souches. ** Le niveau de transcription du gène *lmb* est significativement plus élevé dans le groupe des souches avec IS*1548* que dans les deux autres groupes de souches (P <0,001) et significativement plus élevé que celui du gène *scpB* (P =0,001).

**Tableau X. Expression du gène *lmb* chez 14 souches de *S. agalactiae* appartenant à deux lignées phylogénétiques en fonction de la présence d'IS*1548* entre les deux gènes *scpB* et *lmb*.**

| | CC19 | | CC10 | |
|---|---|---|---|---|
| | IS*1548* +<br>n = 4 | IS*1548* -<br>n = 5 | IS*1548* +<br>n = 2 | IS*1548* -<br>n = 3 |
| Niveau de transcription du gène *lmb* | 2,69 ± 1,34 | 0,86 ± 0,69 | 2,17 ± 0,34 | 0,19 ± 0,16 |
| Pourcentage de liaison à la laminine | 9,36 ± 2,25 | 2,60 ± 1,06 | 12,84 ± 6,74 | 2,52 ± 1,10 |
| Quantité de Lmb exprimée à la surface bactérienne | 6,01 ± 2,70 | 2,50 ± 0,70 | 4,80 ± 1,50 | 1,45 ± 0,20 |

# 6. Détermination de l'impact de la structure de la région intergénique scpB-lmb sur le niveau d'expression des gènes *scpB* et *lmb*

## 6.1 Quantification des transcrits des gènes *scpB* et *lmb*

Afin d'étudier si la présence de GBSi1 ou d'IS*1548* dans la région intergénique *scpB-lmb* affecte la transcription des gènes *scpB* et *lmb*, 26 souches représentant les trois configurations génétiques et appartenant à différentes lignées phylogénétiques ont été sélectionnées parmi les 111 souches: neuf souches ont GBSi1 et appartiennent aux CC17 (3 souches), CC19 (5 souches) et CC1 (1 souche), neuf souches ont IS*1548* et sont de CC19 (4 souches), CC10 (2 souches) et de trois singletons (3 souches), huit souches n'ont pas d'EGM et sont de CC23 (3 souches), CC10 (3 souches) et CC1 (2 souches). Les niveaux de transcription des deux gènes *lmb* et *scpB* ont été déterminés par PCR en temps réel chez ces 26 souches et il a été vérifié qu'aucun transcrit n'était détecté chez les souches NEM316 *ΔscpB-lmb* et V4. Les niveaux relatifs de transcription des gènes *lmb* et *scpB* en fonction de la structure de la région intergénique *scpB-lmb* sont représentés dans la Figure 13.

La comparaison du niveau de transcription du gène *scpB* des souches appartenant aux trois groupes étudiés (avec IS*1548*, avec GBSi1 et sans EGM dans la région intergénique *scpB-lmb*) ne montre pas de différence significative ($P = 0,96$), indiquant que la transcription du gène *scpB* ne dépend pas de la struture de la région intergénique *scpB-lmb*. Au contraire, le niveau moyen de transcription du gène *lmb* dans le groupe des souches avec IS*1548* est respectivement de 5,0 à 9,6 fois plus élevé que dans les groupes de souches avec GBSi1 et sans EGM dans la région intergénique *scpB-lmb* ($P < 0,001$).

La comparaison du niveau de transcription du gène *lmb* de souches d'un même CC montre que le niveau de transcription n'est pas lié à la phylogénie des souches, mais à la structure de la région intergénique *scpB-lmb*. En effet, comme indiqué dans le tableau X, pour les neuf souches de CC19 étudiées, le niveau de transcription du gène *lmb* est de 0,86 ± 0,69 pour les cinq souches ayant GBSi1, et 2,69 ± 1,34 pour les quatre souches ayant IS*1548*. De même, pour les cinq souches de CC10 étudiées, le niveau de transcription du gène *lmb* est de 0,19 ± 0,16 pour les

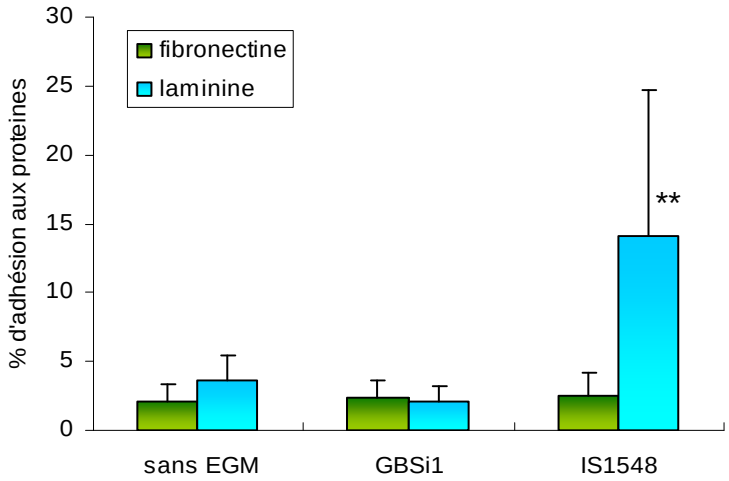



**Figure 14. Capacités de liaison à la laminine et à la fibronectine de 26 souches en fonction de la structure de la région intergénique *scpB-lmb.***

Les protéines sont immobilisées sur une plaque P96. $1 \times 10^5$ à $1 \times 10^6$ UFC/mL sont ensuite ajoutées et incubées pendant 90 min à 37ºC. Le pourcentage de liaison aux protéines est obtenu par le ratio entre le nombre de bactéries ayant adhéré et le nombre de bactéries présentes dans les inoculums. Les histogrammes sont les moyennes et les barres sont les écarts-types des moyennes des pourcentages de liaison aux protéines de chaque groupe de souches ** La capacité moyenne de se lier à la laminine est significativement plus élevée dans le groupe des souches avec IS*1548* que dans les deux autres groupes de souches (P <0,001).

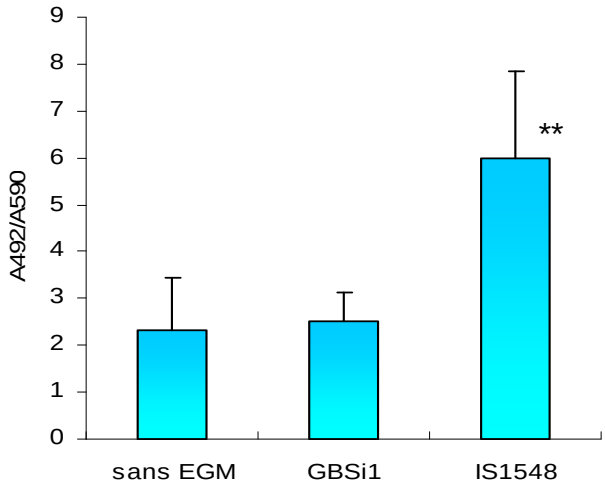



**Figure 15. Expression de la protéine Lmb à la surface des 26 souches de *S. agalactiae* en fonction de la structure de la région intergénique *scpB-lmb*.**

Les 26 souches de *S. agalactiae* sont immobilisées sur une plaque P96. La quantité de Lmb exprimée à la surface bactérienne est déterminée par ELISA par mesure de l'absorbance à 492 nm. La quantité de bactéries ayant adhéré au support est déterminée après coloration au cristal violet par mesure de l'absorbance à 590 nm. Le ratio A492/A590 indique la quantité de Lmb exprimée par bactérie. Les histogrammes sont les moyennes et les barres sont les écarts-types des moyennes des ratios A492/A590 de chaque groupe de souches. ** La quantité de Lmb est significativement plus élevée dans le groupe des souches avec IS*1548* que dans les deux autres groupes de souches (P <0,001).

trois souches sans EGM, et 2,17 ± 0,34 pour les deux souches ayant IS*1548*.

Dans les groupes de souches avec GBSi1 et sans EGM, les niveaux de transcription des gènes *scpB* et *lmb* sont similaires (Figure 13). En revanche, dans le groupe de souches portant IS*1548*, le niveau de transcription du gène *lmb* est significativement plus élevé que celui du gène *scpB* (P = 0,001).

### 6.2 Liaison de souches de *S. agalactiae* à la fibronectine et la laminine humaines immobilisées

Nous avons testé la capacité de liaison à la fibronectine humaine et à la laminine humaine des 26 souches en fonction de la structure intergénique *scpB-lmb* (Figure 14).

Aucune différence entre la capacité de liaison à la fibronectine des trois groupes de souches n'a été observée (P = 0,86). En revanche, les souches avec IS*1548* se lient beaucoup plus fortement à la laminine (14,13% ± 10,55%) que les souches qui ont GBSi1 (2,14% ± 1,13%) et les souches sans EGM (3,70% ± 1,78%) dans la région intergénique *scpB-lmb* (P ≤ 0,001). La capacité moyenne des souches avec IS*1548* de se lier à la laminine est donc respectivement de 3,8 à 6,6 fois plus élevée que celles des souches sans EGM et avec GBSi1 (Figure 14).

La capacité de liaison à la laminine n'est pas liée aux lignées phylogénétiques des souches, mais bien à la structure de la région intergénique *scpB-lmb*. En effet, comme indiqué dans le tableau X, pour les neuf souches de CC19 étudiées, la capacité moyenne de se lier à la laminine est de 2,60% ± 1,06% pour les cinq souches ayant GBSi1, et 9,36% ± 2,25% pour les quatre souches ayant IS*1548*. De même, pour les cinq souches de CC10 étudiées, la capacité moyenne de se lier à la laminine est de 2,52% ± 1,10% pour les trois souches sans EGM, et 12,84 ± 6,74% pour les deux souches ayant IS*1548*.

### 6.3 Quantification de la protéine Lmb à la surface de la cellule bactérienne.

Afin de déterminer si le haut niveau de transcription du gène *lmb* et la forte capacité de liaison à la laminine des souches avec IS*1548* corrèlaient avec une forte

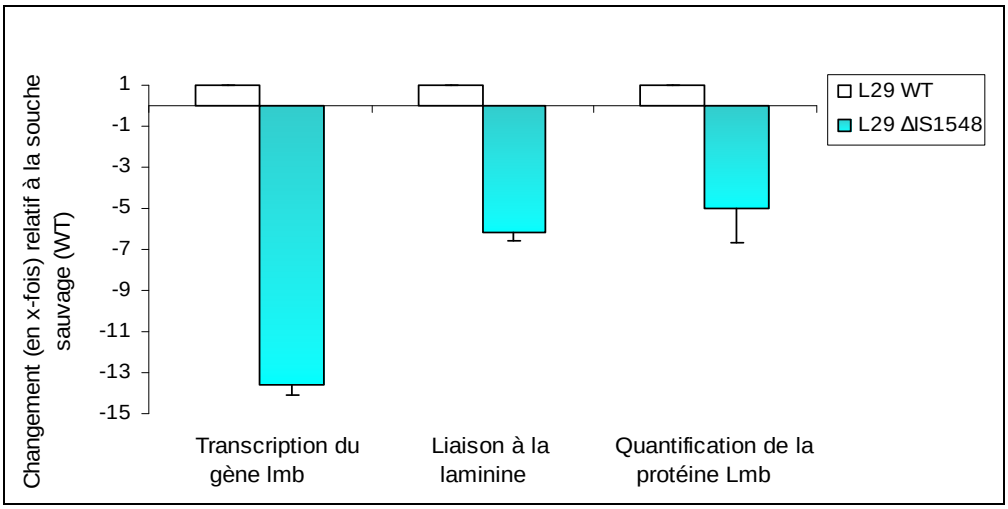



**Figure 16. Propriétés du mutant isogénique L29 *ΔIS1548* par rapport à la souche sauvage L29 WT.**

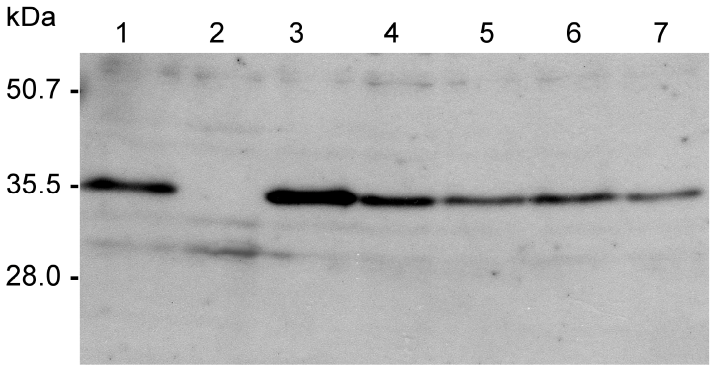



**Figure 17. Détection de la protéine Lmb de la souche L29 et de mutants isogéniques L29*ΔIS1548* par Western blot.**

10 µg d'extraits protéiques de : 1, NEM316 (sans EGM) 2, mutant NEM316 ΔscpB-lmb, 3, L29 WT (avec IS1548), 4 à 7, quatre mutants indépendants L29ΔIS1548, sont séparés par SDS-PAGE et transférés sur une membrane Immobilon P difluorure de polyvinylidène. La membrane est révelée avec un sérum de lapin immunisé par la protéine Lmb puis incubée avec des anticorps anti-lapin couplés à la péroxydase (HRP). Les signaux sont ensuite révélés par le système ECL (Amersham Biosciences). Les tailles moléculaires en kDa sont illustrées à gauche.

expression de la protéine Lmb, nous avons quantifié par ELISA la protéine Lmb exprimée à la surface bactérienne des 26 souches en utilisant un sérum de lapin immunisé par la protéine Lmb. Un sérum de lapin préimmun utilisé comme témoin n'a pas réagi avec les 26 souches de *S. agalactiae*. Comme indiqué dans la figure 15, la quantité de Lmb est respectivement 2,4 à 2,7 fois plus élevée chez les souches avec IS*1548* que chez les souches avec GBSi1 ou sans EGM dans la région intergénique *scpB-lmb* ($P < 0,001$). Ces résultats confirment donc nos résultats de transcription élevée du gène *lmb* et de la forte capacité de liaison à la laminine des souches avec IS*1548* dans la région intergénique *scpB-lmb.*

## 7. Propriétés de mutants délétés d'IS*1548* dans la région intergénique *scpB-lmb*

Afin de déterminer si la surexpression du gène *lmb* observée chez les souches avec IS*1548* dans la région intergénique *scpB-lmb* était directement due à la présence de l'IS en amont du gène *lmb*, nous avons délété cette séquence dans le génome de la souche L29 appartenant au ST-19 et de sérotype III. Cette délétion a été confirmée par séquençage du produit de PCR de 1,2 kb obtenu avec les amorces *scpB2987/rlmb497* qui encadrent le site de la délétion.

Les propriétés (niveau de transcription du gène *lmb*, capacité de la liaison des bactéries à la laminine et quantité de Lmb exprimée à la surface bactérienne) de la souche L29 et de son mutant isogénique *ΔIS1548* ont été ensuite comparées (Figure 16). Le mutant isogénique L29*ΔIS1548* a montré un niveau de transcription du gène *lmb* 13,5 fois plus faible, une capacité de se lier à la laminine 6,2 fois plus faible, et une quantité de Lmb 5,0 fois plus faible que la souche sauvage. De même, la surexpression de la protéine Lmb chez la souche L29 par rapport à son mutant L29*ΔIS1548* a été confirmée par Western blot (Figure 17).

## 8. Mécanisme d'activation du gène *lmb* par IS*1548*

### 8.1 Identification de boîtes promotrices potentielles

Afin de déterminer le mécanisme d'activation du gène *lmb* par IS*1548*, nous avons séquencé la région intergénique *scpB-lmb* située en amont du codon

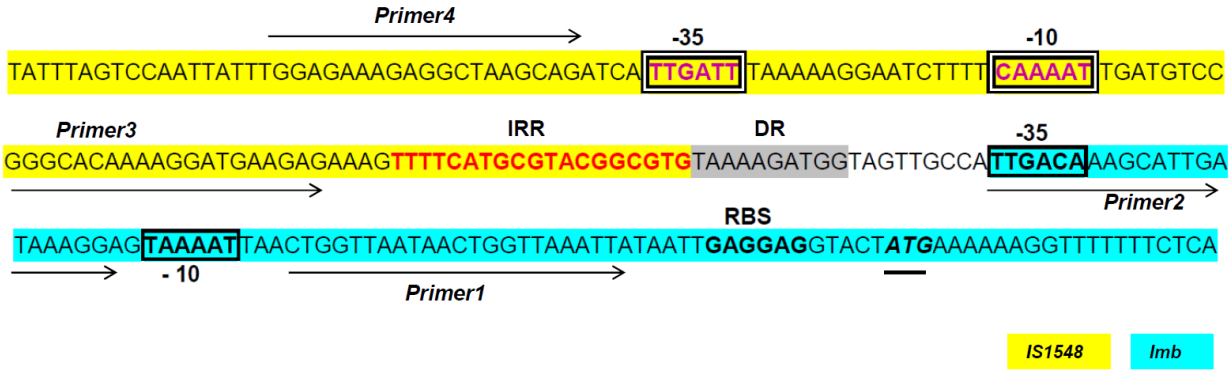



**Figure 18. Séquence nucléotidique de 236 nt de la région intergénique *scpB-lmb* chez les souches avec IS*1548*.**

Le gène *lmb* est représenté dans un fond bleu. RBS indique le site de fixation des ribosomes. Les deux régions promotrices -35 et -10 du gène *lmb* sont encadrées. Le codon d'initiation de la traduction (ATG) du gène *lmb* est souligné. L'IS*1548* est représentée dans un fond jaune. Les deux régions promotrices, -35 et -10, portées par IS*1548* sont encadrées en double. IRR, inverted repeat right, est représentée en rouge. DR, direct repeat, est représentée dans un fond gris. Les amorces sens utilisées pour les PCR sur les ADNc sont indiquées.

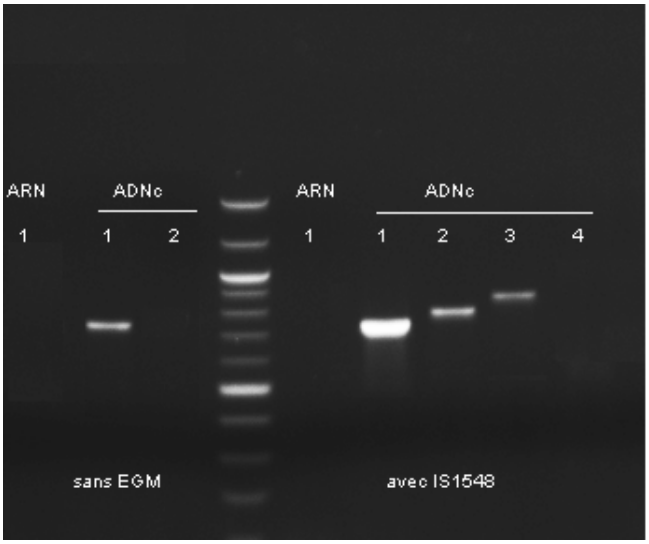



**Figure 19. Détermination de la taille approximative de la région transcrite non traduite (UTR) en 5' du gène *lmb* en fonction de la présence ou non d'IS*1548* dans la région intergénique *scpB-lmb*.**

1, PCR avec *Primer1/rlmb715*, 2, PCR avec *Primer2/rlmb715.* 3, PCR avec *Primer3/rlmb715*, 4, PCR avec *Primer4/rlmb715* avec l'ADNc de la souche V27 (sans EGM) et l'ADNc de la souche L29 (avec IS*1548*). La position des différentes amorces sens est indiquée dans la figure 18. L'amorce antisens *rlmb715* s'hybride dans le gène *lmb*. Des PCR avec *Primer1/rlmb715* utilisant comme matrice l'ARN non transcrit des 2 souches montrent l'absence de contamination de l'ARN par de l'ADN génomique.

d'initiation de la traduction ATG du gène *lmb* et qui inclut par conséquence les régions promotrices du gène *lmb*, chez 20 souches : neuf souches avec IS*1548*, six souches avec GBSi1 et cinq souches sans EGM dans la région intergénique *scpB-lmb*. Les séquences d'ADN sont strictement identiques dans chaque groupe. Pour toutes les souches, le promoteur du gène *lmb* est intact. L'intron GBSi1 et IS*1548* sont insérés respectivement 97 pb et 9 pb en amont du promoteur du gène *lmb*, comme décrit par Granlund *et al*. (Granlund *et al*., 2001).

L'analyse *in silico* de l'extrémité 3' de l'IS*1548* a montré l'existence d'un promoteur potentiel situé 70 pb en amont de la boîte -35 originelle du gène *lmb* (Figure 18). Ce promoteur potentiel est constitué d'une séquence -35 (TTGATT) séparée par 16 pb d'une séquence -10 (CAAAAT) (Figure 18). Ces deux séquences possèdent quatre bases identiques sur les 6 bases constituant les séquences consensus (-35 et -10) des promoteurs de facteur $\sigma^{70}$ d'*E. coli* [-10 (TATAAT) et -35 (TTGACA)]. Ces deux séquences identifiées peuvent correspondre également aux séquences consensus des promoteurs des streptocoques, qui sont similaires à celles d'*E. coli* sauf que la séquence -10 des promoteurs des streptocoques est étendue en 5' pour inclure un motif TGN (Chaffin *et al*., 2000, Voskuil et Chambliss, 1998).

Ce promoteur potentiel additionnel est donc susceptible de coopérer avec le promoteur originel du gène *lmb* pour l'activation du gène *lmb* et sa surexpression par rapport aux souches qui ne possèdent pas IS*1548* dans la région intergénique *scpB-lmb*.

### 8.2 Détermination de la taille approximative de la région transcrite non traduite (UTR) en 5' du gène *lmb*

Si le promoteur potentiel porté par l'extrémité 3' de l'IS*1548*, est fonctionnel, la transcription du gène *lmb* peut donc être initiée à partir de deux promoteurs, le promoteur originel du gène *lmb* et le promoteur porté par IS*1548*, ce qui conduirait à la synthèse de deux types d'ARNm : le premier commun à toutes les souches, le second présent uniquement chez les souches avec IS*1548* et caractérisé par une région 5'UTR (untranslated region, délimitée par le site d'initiation de la transcription d'un côté et le site de démarrage de la traduction de l'autre) plus longue.

Afin de mettre en évidence l'UTR en 5' du gène *lmb*, une PCR en point final a été effectuée en utilisant comme matrice les ADNc de 11 souches : six souches avec IS*1548*, et cinq souches sans EGM dans la région intergénique *scpB-lmb*. La figure 19 montre les résultats d'une souche de chaque groupe. Une amorce antisens (*rlmb715*) s'hybridant dans le gène *lmb* a été couplée tout d'abord avec deux amorces sens s'hybridant dans la région intergénique *scpB-lmb* : l'amorce *Primer1* (Figure 18) située en aval du promoteur originel du gène *lmb* et l'amorce *Primer2* (Figure 18) située en amont de la boîte -10 du gène *lmb*. Comme attendu, ces PCR avec l'amorce *Primer1* étaient positives avec les deux ADNc (Figure 19) et les PCR avec l'amorce *Primer*2 étaient négatives avec les souches sans IS*1548*. En revanche, les PCR avec l'amorce *Primer*2 étaient positives avec les souches possédant IS*1548*, montrant qu'il existe bien une région UTR en 5' plus longue pour l'ADNc du gène *lmb* chez les souches avec IS*1548* (Figure 19) et que le promoteur putatif identifié in *silico* est fonctionnel.

Afin de déterminer la taille approximative de cette UTR 5', deux amorces s'hybridant dans la séquence de l'IS*1548* ont été couplées avec l'amorce antisens *rlmb715* : l'amorce *Primer3* située en aval du promoteur potentiel et l'amorce *Primer4* située en amont du promoteur potentiel de l'IS*1548* (Figure 18) : les PCR avec l'amorce 3 étaient positives avec l'ADNc des souches possédant IS*1548* (Figure 19) alors qu'elles étaient négatives avec l'amorce *Primer4* (Figure 19). L'ensemble de ces résultats montre que le promoteur porté par l'extrémité 3' de l'IS*1548* est actif. Enfin, des expériences additionnelles seront indispensables pour localiser précisément le (+1) de transcription apporté par le nouveau promoteur.

**Partie 1.** Activation du gène *lmb* par la séquence d'insertion IS*1548* située dans la région intergénique *scpB-lmb*

# D-Discussion

Dans notre travail, la recherche des gènes *scpB* et *lmb* dans une collection de 111 isolats cliniques humains de *S. agalactiae* a montré que toutes les souches étudiées sauf deux possèdent ces deux gènes. Cette observation est déjà rapportée par plusieurs auteurs qui ont montré que presque toutes les souches de *S. agalactiae* d'origine humaine possèdent les deux gènes *scpB* et *lmb* alors qu'ils sont absents chez la plupart des souches d'origine bovine. Nos résultats vont donc dans le sens de l'hypothèse que le transposon *scpB-lmb* est essentiel pour la colonisation voire l'infection de l'homme (Broker et Spellerberg, 2004, Franken *et al*., 2001).

La recherche des EGM dans la région intergénique *scpB-lmb* a permis de mettre en évidence, comme décrit précédemment, une distribution mutuellement exclusive de l'intron de groupe II, GBSi1, et de la séquence d'insertion IS*1548* entre les gènes *scpB* et *lmb* (Bohnsack *et al*., 2008, Granlund *et al*., 2001, Hery-Arnaud *et al*, 2005) et une concordance entre la structure intergénique *scpB-lmb* et les principales lignées phylogénétiques. De fait, le CC17 est caractérisé par la présence de l'intron GBSi1, le CC19 par IS*1548* alors que le CC23 ne possède aucun EGM entre les deux gènes *scpB* et *lmb*. Néanmoins, les souches appartenant au CC19 peuvent être divisées en deux groupes : toutes les souches de sérotype III possèdent IS*1548* alors que les souches de sérotype II possèdent l'intron GBSi1. Ces deux groupes qui semblent former deux lignées distinctes et homogènes (Bohnsack *et al*., 2008, Takahashi *et al*., 2002) pourraient avoir des différences en terme d'expression de gènes de virulence.

Nos différentes approches expérimentales ont montré que la présence de GBSi1 ou d'IS*1548* en aval du gène *scpB* ne modifient pas l'expression de ce gène. En revanche, IS*1548* est associée à une surexpression significative du gène *lmb*. En effet, les souches avec IS*1548* transcrivent 5,0 à 9,6 fois plus le gène *lmb*, se lient 3,8 à 6,6 fois plus à la laminine, et expriment 2,4 à 2,7 fois plus la protéine Lmb à leur surface, par rapport aux souches avec GBSi1 ou sans EGM. Ces variations sont indépendantes de l'origine phylogénétique des souches montrant que l'activation du gène *lmb* semble être directement liée à la présence de l'IS*1548* en amont du gène *lmb* plutôt qu'à d'autres événements génétiques spécifiques d'une lignée phylogénétique particulière. Cette hypothèse a été ensuite démontrée par la construction d'un mutant de délétion de l'IS*1548* qui a montré une réduction significative de la transcription et de l'expression du gène *lmb*.

Chez les bactéries, l'activation des gènes suite à l'intégration des éléments IS est un phénomène bien connu, décrit notamment pour les gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques, le métabolisme et la virulence (Depardieu *et al*., 2007, Lopez de Felipe *et al*., 1996, Olliver *et al*., 2005, Rogers *et al*., 1994, Rubens *et al*., 1989). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'activation d'un gène par une IS. Elle peut résulter d'un déplacement ou d'une rupture d'une région régulatrice négative, site de fixation d'un répresseur, suite à l'insertion de l'IS en amont du gène entrainant ainsi une augmentation de l'expression du gène. Ce mécanisme a été proposé pour expliquer l'activation du gène de la céphalosporinase, *cepA,* par IS*1224* chez *Bacteroides fragilis* (Rogers *et al*., 1994). L'up-régulation d'un gène peut aussi résulter de la fourniture d'un promoteur actif porté entièrement par l'IS ou d'un promoteur hybride généré après l'insertion de l'IS. En effet, chez *Lactococcus lactis*, un promoteur hybride constitué d'une séquence -35 située en 3' d une IS (IS-like), et d'une séquence -10 située dans la région adjacente à l'IS, a créé un promoteur fonctionnel induisant l'expression de l'opéron *citQRP*, impliqué dans le transport du citrate (Lopez de Felipe *et al*., 1996). En outre, chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, des nouvelles séquences promotrices ont été apportées par IS*1* insérée en amont du promoteur initial de l'opéron *acrEF*, qui code pour des pompes à efflux, offrant ainsi un promoteur alternatif qui a abouti à la surexpression de cet opéron (Olliver *et al*., 2005). Ce que nous observons chez *S. agalactiae* correspond à ce dernier cas (Figure 18 et 19). En effet, nos analyses *in silico* montrent qu'IS*1548* porte à son extrémité 3' des séquences promotrices putatives situées 70 pb en amont du promoteur initial du gène *lmb*. Des PCR sur l'ADNc de souches avec et sans IS*1548* mettent en évidence des ADNc du gène *lmb* plus longs en 5' chez les souches avec IS*1548*, indiquant que la transcription du gène *lmb* est initiée à partir d'un autre promoteur situé en amont, dans l'extrémité 3' de l'IS. Le promoteur additionnel porté par l'IS*1548* est donc actif. Des expériences additionnelles seront réalisées afin de prouver d'une autre façon sa fonctionnalité. Ainsi, d'une part la 5'RACE permettra d'identifier précisément le (+1) de transcription. D'autre part, des expériences de fusion transcriptionnelle entre le promoteur apporté par IS*1548* et un gène rapporteur (tel que *lacZ*) dépourvu de son promoteur, entre le promoteur initial du gène *lmb* et le gène rapporteur et entre les 2 promoteurs et le gène rapporteur

permettront de déterminer le degré de participation de chacun de ces promoteurs dans le niveau d'expression du gène *lmb*.

La présence de gènes codant pour des facteurs de virulence ainsi que le niveau d'expression de ces gènes permettent d'apporter des arguments pour expliquer la capacité particulière de certaines lignées phylogénétiques de *S. agalactiae* d'envahir le système nerveux central de nouveau-né. En effet, plusieurs études ont montré que les souches appartenant au clone hyper invasif ST-17 qui est responsable de méningites néonatales (Jones *et al*., 2003, Luan *et al*., 2005) portaient un ensemble de gènes de virulence qui leur sont propres et qui codent essentiellement pour des protéines de surface mais aussi pour des protéines secrétées tels que des variants alléliques des gènes *gbs2018*, *cpsA*, *fbsB et srr-2* (Brochet *et al*., 2006, Lamy *et al*., 2006, Seifert *et al*., 2006, Springman *et al*., 2009). En revanche, aucun facteur spécifique n'a jusqu'à présent pu être relié aux autres complexes clonaux à potentiel infectieux, en particulier au CC19 qui a été régulièrement décrit dans les méningites néonatales. Une étude de notre laboratoire a montré que 100% des souches de CC17, faisant partie de la collection utilisée dans cette étude, possèdent les deux gènes impliqués dans la liaison au fibrinogène, *fbsA* et *fbsB* et sont significativement plus adhérentes au fibrinogène que les souches appartenant aux autres CC (Rosenau *et al*., 2007). Presque toutes ces souches ont GBSi1 dans la région intergénique *scpB-lmb*, une configuration qui n'augmente pas l'expression du gène *lmb*. En revanche, 84% des souches de CC19 étudiées ici sont dépourvues des gènes *fbsA* et *fbsB* et possèdent ainsi une faible capacité de liaison au fibrinogène (Rosenau *et al*., 2007). Donc, contrairement aux souches de CC17, la capacité de la liaison au fibrinogène n'apparaît pas comme un facteur important pour expliquer la capacité des souches de CC19 à envahir le système nerveux central de nouveau-né. Néanmoins, 13 des 21 souches de CC19 (61,9%) portent l'IS*1548* dans la région intergénique *scpB-lmb* et ont par conséquent une forte capacité de liaison à la laminine, et 12 de ces 13 souches ont été isolées de méningites néonatales. Etant donné que les deux protéines FbsA et Lmb permettent respectivement l'adhésion et l'invasion de la barrière hémato-méningée par *S. agalactiae* (Tenenbaum *et al*., 2005, Tenenbaum *et al*., 2007), on peut donc suggérer que les deux gènes *fbsA* et *fbsB* favorisent la capacité des souches de CC17 à envahir le système nerveux central du nouveau-né alors que la

surexpression du gène *lmb* dûe à la présence de l'IS*1548* favorise celle des souches de CC19.

L'IS*1548* a été initialement identifiée insérée dans le gène de la hyaluronidase, *hylB* ce qui interrompt l'expression de ce gène de virulence*,* chez des souches de *S. agalactiae* de sérotype III associées aux endocardites (Granlund *et al*., 1998). Chez ces souches, une copie supplémentaire de l'IS*1548* est toujours retrouvée entre les gènes *scpB* et *lmb* (Granlund *et al*., 1998, Bidet *et al*., 2003, Yilirim *et al*., 2002). On peut donc supposer que la surexpression du gène *lmb* par l'IS*1548* participe à la virulence de ces souches. En effet, les streptocoques colonisent les valves cardiaques présentant des lésions endothéliales préexistantes, une situation qui mène à l'exposition des membranes basales sous-jacentes (Moreillon, 1999). Dans ce contexte, la liaison à la laminine, composant de la membrane basale peut être critique pour la colonisation par *S. agalactiae* de l'endothélium endommagé*.*

En conclusion, l'ensemble de nos résultats montre l'importance de certains éléments transposables dans la virulence *de S. agalactiae*. Nous avons rapporté une forte activation du gène *lmb* par l'IS*1548* ce qui pourrait contribuer à la virulence particulière de certaines souches de CC19 et de sérotype capsulaire III responsables de méningites néonatales et d'endocardites.

# Partie 2.
# Liaison au fibrinogène des souches de CC17.

# **Partie 2.** Liaison au fibrinogène des souches de CC17

## A-Introduction

La pathogenèse des infections à *S. agalactiae* reflète la capacité des bactéries à coloniser différents épithéliums (intestinal, vaginal, respiratoire), à pénétrer à travers les barrières épithéliales, à résister au système immunitaire, à envahir le système sanguin et plus spécifiquement pour les souches responsables de méningite à traverser la barrière hémato-encéphalique. Seules des populations restreintes de souches semblent être impliquées dans les infections invasives du nouveau-né (Bohnsack *et al*., 2008, Jones *et al*., 2006, Manning *et al*., 2009, Martins *et al*., 2007, Musser *et al*., 1989, Poyart *et al*., 2008, Quentin *et al*., 1995). Parmi elles, les souches de CC17 forment un clone à haut risque infectieux pour le système nerveux central du nouveau-né et possèdent une communauté de propriétés qui leur est propre (Brochet *et al*., 2006, Springman *et al*., 2009, Tazi *et al*., 2010). Toutefois, peu d'études ont été menées pour comparer les facteurs de pathogénicité des différentes lignées phylogénétiques de *S. agalactiae*.

*S. agalactiae* exprime un large panel de facteurs qui sont impliqués dans la pathogénicité de la bactérie (Brochet *et al*., 2006, Maisey *et al*., 2008a, Rajagopal, 2009, Rosenau *et al*., 2007, Tazi *et al*., 2010). Parmi ces facteurs, les protéines FbsA et FbsB, qui ne présentent aucune homologie, interagissent avec le fibrinogène humain. Cette interaction favorise l'adhésion et/ou l'invasion des épithéliums, le passage de la barrière hemato-meningée et l'évasion au système immunitaire (Gutekunst *et al*., 2004, Schubert *et al*., 2002, Schubert *et al*., 2004, Tenenbaum *et al*., 2005). La délétion du gène *fbsB* décrite pour une souche unique appartenant au CC23 ne diminue pas sa capacité de liaison au fibrinogène ; à l'inverse, la délétion du gène *fbsA* de cette souche entraîne la perte de cette capacité, suggérant ainsi que la protéine FbsA est la protéine principale permettant la liaison de *S. agalactiae* au fibrinogène humain (Gutekunst *et al*., 2004, Schubert *et al*., 2004). Il n'est néanmoins pas certain que les résultats obtenus pour cette souche soient extrapolables à l'ensemble des souches de l'espèce mais soient limités aux souches du même complexe clonal (CC23) voire à cette seule souche. Ainsi, l'étude d'une collection de 111 souches montre que la présence du gène *fbsA* seul n'est pas suffisante pour entraîner une forte capacité de liaison au fibrinogène. En effet, les souches les plus adhérentes au fibrinogène possèdent à la fois les gènes *fbsA* et *fbsB* et appartiennent à la lignée CC17 (Rosenau *et al*., 2007). Ainsi le rôle des

gènes *fbs* et en particulier du gène *fbsB* dans la capacité de liaison au fibrinogène des souches de CC17 reste à élucider.

Deux régulateurs de transcription du gène *fbsA*, RogB et RovS, ont été décrits chez une souche appartenant au CC23. RogB stimule la transcription du gène *fbsA* (Gutekunst *et al*., 2003) et RovS l'inhibe (Samen *et al*., 2006). En outre, Spellerberg *et al*. ont identifié un système à deux composants (TCS), *rgfBDAC* (*rgf*, regulator of fibrinogen binding), qui code pour le régulateur de réponse RgfA et pour le senseur histidine kinase RgfC (Spellerberg *et al*., 2002). La délétion du gène *rgfC* réduit la liaison des bactéries au fibrinogène. Bien que l'effet de ce système sur la transcription des gènes de liaison au fibrinogène*, fbsA* et *fbsB*, n'ait pas été étudié, on peut supposer que ces gènes sont sous le contrôle du TCS RgfA/RgfC.

L'objectif de cette deuxième partie est d'étudier les mécanismes responsables de la forte capacité de liaison au fibrinogène des souches de CC17. Dans cette perspective, nous avons déterminé dans un premier temps la prévalence des gènes *fbsA* et *fbsB* ainsi que de leur gènes régulateurs chez 38 souches appartenant au CC17 par comparaison à 96 souches appartenant aux principales autres lignées phylogénétiques de l'espèce *S. agalactiae*. Dans un second temps, nous avons construit des mutants de délétion des gènes *rgfAC* de trois souches de CC17 pour déterminer l'effet de RgfA/RgfC sur la transcription des deux gènes *fbsA* et *fbsB*. Enfin, nous avons construit des mutants de délétion des gènes *fbsA* et *fbsB* de ces trois souches afin de déterminer la contribution relative de chacun des gènes dans la capacité de liaison au fibrinogène des souches de CC17.

## **Partie 2.** Liaison au fibrinogène des souches de CC17

# B-Matériel et Méthodes

**Tableau XI. Propriétés des 134 souches de *S. agalactiae* étudiées.**

Pour chaque souche sont indiqués le sérotype capsulaire, le complexe clonal (CC) et le pourcentage de liaison au fibrinogène humain. Pour chaque CC sont indiqués la moyenne et l'écartype du pourcentage de liaison au fibrinogène.

| souches | Sérotype | CC | % de liaison au fibrinogène | Moyenne (Ecartype) du % de liaison |
|---|---|---|---|---|
| G64 | II | 1 | 2.76 | |
| G51 | V | 1 | 2.23 | |
| G61 | V | 1 | 4.21 | |
| L15 | IV | 1 | 10.54 | |
| L25 | IV | 1 | 1.64 | |
| O377 | Ia | 1 | 5.27 | |
| O115 | V | 1 | 2.96 | |
| O382 | V | 1 | 10.77 | |
| O385 | V | 1 | 7.69 | |
| O221 | V | 1 | 5.31 | |
| O239 | V | 1 | 1.57 | |
| O310 | V | 1 | 4.97 | 4.71 |
| S252 | II | 1 | 2.05 | (4.76) |
| S11 | V | 1 | 0.39 | |
| S117 | V | 1 | 1.00 | |
| S182 | V | 1 | 9.02 | |
| S247 | V | 1 | 2.60 | |
| S257 | V | 1 | 2.35 | |
| S268 | V | 1 | 2.96 | |
| S272 | V | 1 | 3.24 | |
| S277 | V | 1 | 0.70 | |
| S279 | V | 1 | 1.12 | |
| S280 | V | 1 | 7.54 | |
| S292 | V | 1 | 3.98 | |
| S294 | V | 1 | 0.13 | |
| S299 | V | 1 | 7.20 | |
| S326 | V | 1 | 3.80 | |
| V91 | II | 1 | 4.34 | |
| V89 | NT | 1 | 24.25 | |
| C158 | Ib | 10 | 5.3 | |
| C411 | Ib | 10 | 4.2 | |
| G5 | Ib | 10 | 1.42 | |
| G12 | Ib | 10 | 7 | |
| G17 | Ib | 10 | 5.63 | |
| G40 | Ib | 10 | 4.17 | |
| G41 | II | 10 | 7.12 | |
| G42 | II | 10 | 2.35 | |
| G81 | Ib | 10 | 2.48 | |
| L18 | Ib | 10 | 4.29 | |
| O384 | V | 10 | 4.3 | |
| S145 | Ib | 10 | 4.9 | |
| S180 | Ib | 10 | 4.4 | |
| S224 | II | 10 | 5.1 | 4.91 % |
| S262 | Ib | 10 | 6 | (1.76) |
| S265 | Ib | 10 | 7.28 | |
| S271 | Ib | 10 | 3.8 | |
| S281 | Ib | 10 | 4.9 | |
| S110 | Ib | 10 | 5.2 | |
| V7 | Ib | 10 | 7.57 | |
| V29 | II | 10 | 3.64 | |
| V71 | Ib | 10 | 4.14 | |
| V80 | II | 10 | 7.75 | |
| V88 | II | 10 | 2.12 | |
| V99 | II | 10 | 5.03 | |
| V114 | Ib | 10 | 7.66 | |
| G32 | II | 19 | 0.70 | |
| G35 | III | 19 | 2.69 | |
| L6 | II | 19 | 3.58 | |
| L12 | II | 19 | 0.94 | |
| L49 | II | 19 | 1.63 | |
| L48 | II | 19 | 0.85 | |
| L9 | III | 19 | 1.63 | |
| L10 | III | 19 | 1.08 | |
| L14 | III | 19 | 0.99 | |
| L22 | III | 19 | 3.57 | 3.68 |
| L29 | III | 19 | 3.00 | (3.08) |
| L31 | III | 19 | 7.16 | |
| L34 | III | 19 | 3.92 | |
| L35 | III | 19 | 1.67 | |
| L36 | III | 19 | 3.09 | |
| L38 | III | 19 | 7.28 | |
| L43 | III | 19 | 7.55 | |
| L55 | III | 19 | 6.51 | |
| V21 | II | 19 | 2.03 | |
| V104 | II | 19 | 12.94 | |
| V25 | NT | 19 | 4.48 | |
| G49 | III | 17 | 19.5 | |
| G69 | III | 17 | 9.6 | |
| G77 | III | 17 | 6.3 | |
| L44 | Ia | 17 | 6.59 | |
| L1 | III | 17 | 22.5 | |
| L2 | III | 17 | 25.3 | |
| L3 | III | 17 | 9.5 | |
| L5 | III | 17 | 10.9 | |
| L7 | III | 17 | 9.9 | |
| L8 | III | 17 | 10.3 | |
| L13 | III | 17 | 10.8 | |
| L20 | III | 17 | 9.67 | 14.0 |
| L27 | III | 17 | 18.3 | (6.84) |
| L21 | III | 17 | 12.4 | |
| L23 | III | 17 | 23.0 | |
| L24 | III | 17 | 3.9 | |
| L30 | III | 17 | 22.9 | |
| L32 | III | 17 | 17.5 | |
| L33 | III | 17 | 14.2 | |
| L37 | III | 17 | 8.42 | |
| L39 | III | 17 | 27.0 | |
| L40 | III | 17 | 12.4 | |
| L41 | III | 17 | 3.4 | |
| L45 | III | 17 | 22.8 | |
| L46 | III | 17 | 18.5 | |
| L47 | III | 17 | 13.4 | |
| L50 | III | 17 | 23.2 | |
| L51 | III | 17 | 18.7 | |
| L52 | III | 17 | 9.4 | |
| L53 | III | 17 | 10.0 | |
| L54 | III | 17 | 14.9 | |
| V57 | III | 17 | 17.4 | |
| V82 | III | 17 | 15.0 | |
| V64 | III | 17 | 12.0 | |
| V18 | III | 17 | 21.7 | |
| V20 | III | 17 | 13.6 | |
| V23 | NT | 17 | 5.3 | |
| V93 | NT | 17 | 0.41 | |
| C106 | Ia | 23 | 4.90 | |
| C185 | Ia | 23 | 3.80 | |
| C10 | III | 23 | 3.80 | |
| G30 | Ia | 23 | 3.70 | |
| L19 | Ia | 23 | 6.40 | |
| L26 | Ia | 23 | 2.75 | |
| L28 | Ia | 23 | 4.10 | |
| L42 | Ia | 23 | 6.15 | |
| L16 | III | 23 | 6.34 | |
| O383 | Ia | 23 | 4.90 | 4.35 |
| O380 | III | 23 | 5.03 | (1.22) |
| S264 | Ia | 23 | 4.90 | |
| S267 | Ia | 23 | 4.05 | |
| V17 | Ia | 23 | 3.96 | |
| V19 | Ia | 23 | 5.61 | |
| V27 | Ia | 23 | 2.85 | |
| V31 | Ia | 23 | 2.73 | |
| V37 | Ia | 23 | 3.08 | |
| V38 | Ia | 23 | 2.69 | |
| V113 | Ia | 23 | 5.17 | |

*C, souches isolées d'infections cutanées de l'adulte, G, souches gastriques de nouveau-nés colonisés ; L, souches isolées de LCR de nouveau-nés infectés ; O, souches isolées d'infections ostéo-articulaires de l'adulte, S, souches isolées du sang de l'adulte ; V, souches vaginales de portage ; NT, non typable.

## 1. Souches bactériennes

A partir du souchier initial composé de 111 souches humaines utilisé dans la précédente étape de notre travail (voir Partie 1, §1), nous avons sélectionné 94 souches représentatives des principales lignées phylogénétiques de l'espèce *S. agalactiae* : nous avons secondairement complété ce souchier avec 40 nouvelles souches responsables d'infections chez l'adulte.

Ainsi, nous disposions de 134 souches épidémiologiquement non reliées isolées en France entre 1986 et 2008, représentatives des cinq principales lignées phylogénétiques de l'espèce *S. agalactiae*. (Tableau XI). Les souches provenaient de prélèvements réalisés à visée diagnostique ou de dépistage, selon la répartition suivante : 52 souches isolées de méningites néonatales, 16 de liquide gastrique de nouveau-nés asymptomatiques, 26 de colonisation vaginale et 40 d'infections de l'adulte (sang, infections cutanées et ostéo-articulaires) (Tableau XI).

Le sérotype de ces souches avait été préalablement déterminé par double diffusion en gel d'agarose et/ou agglutination de particules de latex selon le protocole décrit par Quentin *et al*. (Quentin *et al*., 1995), ou par PCR selon le protocole décrit par Kong *et al*. (Kong *et al*., 2002). Six sérotypes ont été identifiés (Tableau XI): sérotypes Ia (19 souches), Ib (18 souches), II (17 souches), III (51 souches), IV (2 souches) et V (23 souches), et quatre souches sont non typables (NT).

Toutes les souches avaient déjà été analysées par MLST selon la méthodologie précédemment décrite dans la première partie et les complexes clonaux regroupant les souches partageant au moins cinq allèles identiques sur sept ont été définis. Toutes nos souches appartiennent à l'un des cinq principaux complexes clonaux : CC1 (29 souches), CC10 (26 souches), CC17 (38 souches), CC19 (21 souches) et CC23 (20 souches) (Tableau XI).

La souche *Escherichia coli* DH5α a été utilisée comme hôte pour l'amplification et la sélection de plasmides.

## 2. Extraction de l'ADN

Les ADN des 134 souches bactériennes sont extraits, dosés et conservés comme précédemment décrit (voir Partie 1, §2)

**Tableau XII. Amorces utilisées lors de la PCR et de la PCR quantitative.**

| Amorces | Séquence (5'-3') | Taille amplicon (pb) | Gène cible | Référence |
|---|---|---|---|---|
| *lmb130* | GTTGTGAGTTTAGTAATGATAGC | 840 | *lmb* | (Spellerberg *et al*., 1999a) |
| *lmb*970 | GATATGTCTTGTTCCGCTTG | | | |
| *rogB*59 | GCTATGATTACTACCCTTCCATTACTC | 130 | *rogB* | (Gutekunst *et al*., 2003) |
| *rogB*189 | TTCGATATTCAGAGAGAGTTGACTG | | | |
| *rogB*298 | GATTCAGGCAGGTTCCCTTT | 891 | | |
| *rogB*1189 | CGGCTATTTGTATCGGAGGA | | | |
| *rogB*350 | GTGCAACTGCTTATCGCATAC | 794 | | |
| *rogB*1144 | GGTGAGCACAAAGGAGAAGAA | | | |
| *rogB*822 | TTGGTCTGAGAAGCGTATCG | 131 | | |
| *rogB*953 | GCAACTTTTACCAACTCGTCA | | | |
| *rgfB1* | TCTATGGCAAAATGCTTAACG | 1086 | *rgfBD* | (Spellerberg *et al*., 2002) |
| *rgfD155* | TCTCTAAACGTGCCTGTTGAA | | | |
| *rgfD89* | ACGAGGAGACGAAAGTGAAT | 2277 | *rgfDAC* | |
| *rgfC* | CGCAAAGTTCTATGGTTCAAAA | | | |
| *rovS114* | CAAGGTTTGAGAGAGGAGAGTCA | 631 | *rovS* | (Samen *et al*., 2006) |
| *rovS745* | TCCTGAAGAAGTATCACCAAGTTTT | | | |
| *rovS82* | AGCAGATGAGCACCTATCCA | 146 | | |
| *rovS228* | TGAGTGTGCGCCTTAGAATG | | | |
| *fbsA282* | CAACTTATAGGGAAAAATCCAC | 123 | *fbsA* | (Schubert *et al*., 2002) |
| *fbsA405* | AGTTAACATCGGTCTATTAGC | | | |
| *fbsA*86 | ATCAAGTCCTGTATCTGCTAT | 469 | | |
| *fbsA*555 | TTCATTGCGTCTCAAACCG | | | |
| *fbsB354* | GCGATTGTGAATAGAATGAGTG | 129 | *fbsB* | (Glaser *et al*., 2002, |
| *fbsB483* | ACAGAAGCGGCGATTTCATT | | | Gutekunst *et al*., 2004) |
| *fbsB*143 | TCGGTCATAAAATAGCGTATGG | 1567 | | |
| *fbsB*1710 | AAGAATTCAACGGTCGGCTTCGT | | | |
| *gyrA* | CGGGACACGTACAGGCTACT | 128 | *gyrA* | (Glaser *et al*., 2002) |
| *rgyrA* | CGATACGAGAAGCTCCCACA | | | |

## 3. Prévalence des gènes de liaison au fibrinogène et de leurs gènes régulateurs

Nous avons déterminé chez les 134 souches la prévalence des deux gènes impliqués dans la liaison au fibrinogène *fbsA* et *fbsB* ainsi que de leurs gènes régulateurs : *rogB* codant pour un activateur du gène *fbsA*, *rovS* codant pour un inhibiteur du gène *fbsA* et *rgf* codant pour un système à deux composants (TCS) dont le rôle sur les deux gènes *fbsA* et *fbsB* n'a pas encore été caractérisé. Les amorces utilisées pour l'amplification des gènes étudiés sont présentées dans le Tableau XII. Le gène *lmb* présent dans la quasi-totalité des souches de *S. agalactiae* sert de témoin, son amplification permettant de valider les réactions de PCR. Quatre couples d'amorces s'hybridant à différents endroits du gène *rogB* sont utilisés pour amplifier ce gène. Deux couples d'amorces sont utilisés pour amplifier le locus *rgfBDAC*, les gènes *rovS*, *fbsA* et *fbsB*. L'amplification est obtenue dans un volume de 20µL grâce au mélange réactionnel constitué de tampon *Taq* 1X (Roche Diagnostics), MgCl2 1,5 mM, 0,2 µM de chacune des amorces sens et antisens (Eurogentec), 0,2 mM de chacun des dNTP, 0,5 U de *Taq* polymérase et de 50 ng d'ADN génomique bactérien comme matrice. La PCR effectuée dans le thermocycleur GeneAmp PCR System 2720 commence par une étape initiale de dénaturation (5 minutes à 94°C), suivie d'une seconde étape de 30 cycles comportant 1 minute de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 55°C et 1 minute d'élongation à 72°C, suivie d'une élongation finale de 10 minutes.

La taille des amplicons obtenus est estimée après électrophorèse en gel d'agarose à 1,5% en tampon TBE 1X (Tris-base 90 mM, acide borique 89 Mm, EDTA 2 mM, pH 8) pendant 1 heure à 90V, par marquage par le bromure d'ethidium et visualisation en transillumination sous UV et comparaison avec les marqueurs de taille 100 pb (Amersham Biosciences) et 1 kb (Biolabs).

## 4. Construction des mutants de délétion

Les trois souches L1, L2 et L50 de sérotype III, appartenant au CC17 et isolées de méningites néonatales, ainsi que la souche L1*ΔfbsA* sont rendues compétentes comme décrit dans la partie 1 (voir partie 1, § 4.1)

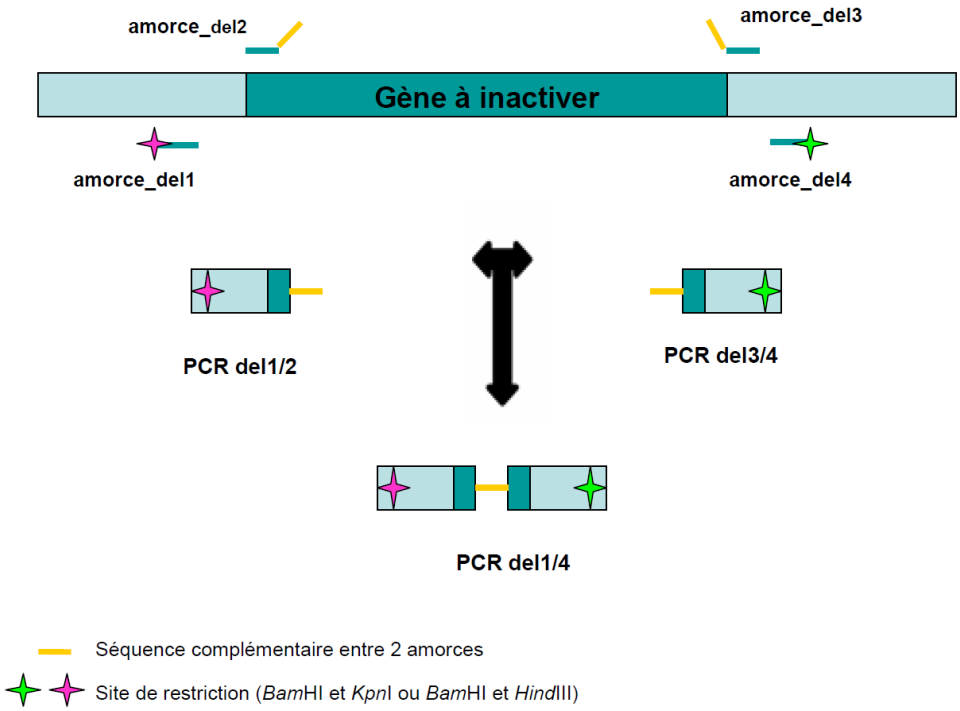



**Figure 20. Construction des cassettes de recombinaison.**

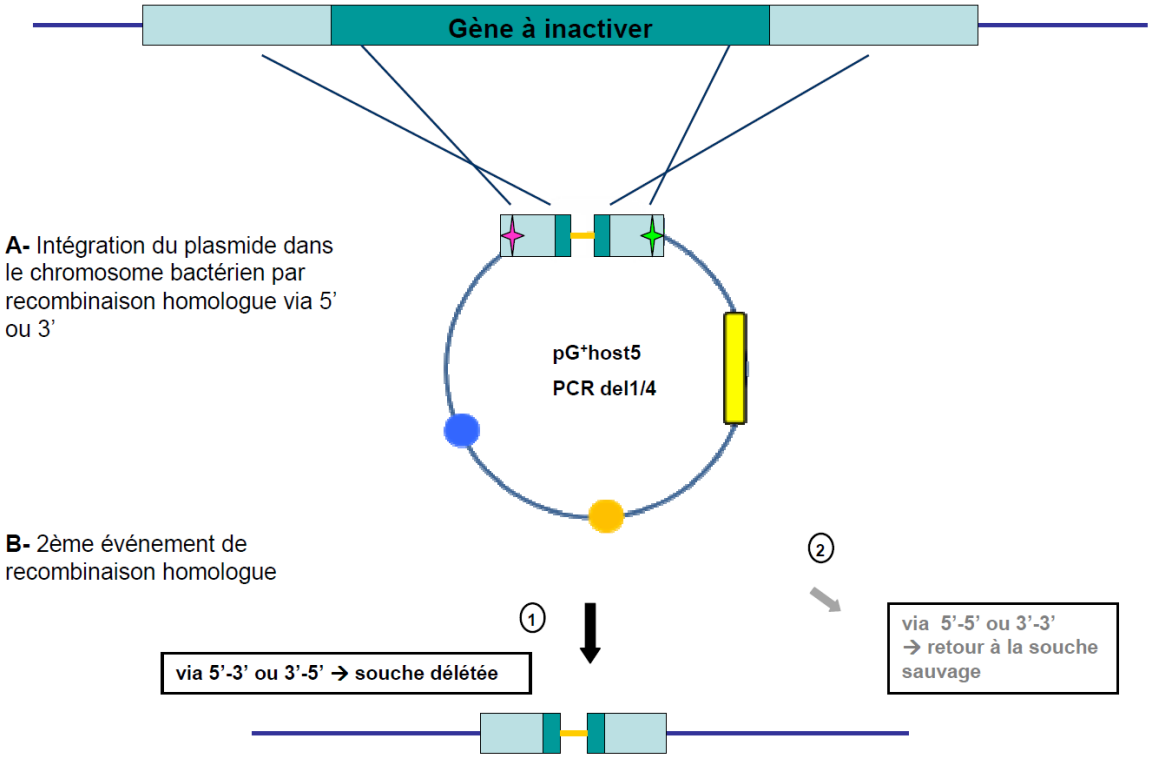



**Figure 21. Délétion des gènes cibles par double recombinaison homologue.**

### 4.1 Clonage dans le vecteur pG$^+$host5

L'inactivation des différents gènes, *fbsA*, *fbsB* et *rgfAC*, des souches L1, L2 et L50 est effectuée par insertion/délétion en utilisant le plasmide pG$^+$host5. Pour cela, nous avons dans un premier temps construit une «cassette de recombinaison» par la technique de PCR overlap, comme expliqué dans la Figure 20. Les amorces utilisées pour la construction des cassettes des trois gènes à déleter sont indiquées dans le Tableau XIII.

**Tableau XIII. Amorces utilisées pour la construction des cassettes de recombinaison.**

| Amorces | Séquence (5'-3') | Gène(s) à inactiver |
|---|---|---|
| fbsA_del1 | CCGCGGATCCGAATATGCTACCATCAC | *fbsA* |
| fbsA_del2 | *CCCATCCACTAAACTTAAACA* TTCCTGATTTCCAAGTTC | |
| fbsA_del3 | *TGTTTAAGTTTAGTGGATG GG*GCTGCGGTTTGAGACGC | |
| fbsA_del4 | TGGCACAAGCTTTACCTGCTGAGCGAC TTG | |
| fbsB_del1 | CCGCGGATCCGTCATGTTACTAATCTTATGC | *fbsB* |
| fbsB_del2 | *CCCATCCACTAAACTTA ACA*CAATCCAAAACGCAATAGG | |
| fbsB_del3 | *TGTTTAAGTTTAGTGGATGGG*GATC AAGCTTTTGTAGCTAG | |
| fbsB_del4 | GGGGGTACCCTTCATTAACAATATCTG AG | |
| rgfA_del1 | CCGCGGATCCTCAACAGGCACGTTTAGAGAGA | *rgfAC* |
| rgfA_del2 | *CCCATCCACTAAACTTAAACA*AACGTCTTCAATCCTTCTGCT | |
| rgfC_del3 | *TGTTTAA GTTTAGTGGATGGG*GATAACGCTATTGAGGCATCT | |
| rgfC_del4 | GGGGGTACC ATCACTGGTGGTGGTTGGAT | |

Deux fragments flanquant chaque gène sont amplifiés par PCR en utilisant les couples d'amorces amorce_del1/amorce_del2 d'une part et amorce_del3 /amorce_del4 d'autre part. Les amorces _del2 et _del3 comportent des séquences complémentaires (présentées en italique) et les amorces_del1 et _del4 comportent respectivement des sites de restriction enzymatiques (soulignés), *Bam*HI et *Hind*III pour la cassette de recombinaison du gène *fbsA* et *Bam*HI et *Kpn*I pour la cassette de recombinaison des gènes *fbsB* et *rgfAC*. Les deux fragments amplifiés sont ensuite purifiés grâce au kit de Montage PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore), selon les recommandations du fabricant. L'ADN de chaque fragment ainsi purifié est mélangé en quantité égale et soumis à une PCR permettant l'assemblage des deux extrémités complémentaires. L'assemblage a lieu dans un mélange réactionnel de 50 µL constitué de : tampon d'enzyme 1X, MgCl2 2,5 mM, dNTP 0,2 mM, amorce_del1 0,5 µM, amorce_del4 0,5 µM et 0,5 unité de *Taq* polymérase (Figure 20). Le produit

de PCR purifié ainsi que le plasmide pG$^+$host5 sont digérés par deux enzymes de restriction (*Bam*HI et *Hind*III pour *fbsA*, *Bam*HI et *Kpn*I pour *fbsB* et *rgfAC*) dans un mélange réactionnel de 30 µL (tampon L 1X ; enzymes 2 unités) (Roche Diagnostics) pendant 3 h à 37℃. La réaction est stoppée à 70℃ pendant 20 min puis les produits de restriction sont précipités à l'éthanol absolu avant d'être suspendus dans de l'eau. La ligation s'effectue dans un mélange réactionnel constitué de tampon ligase 1X, de T4 DNA ligase 1 unité (Biolabs) en présence de 150 ng d'insert et 150 ng de plasmide restreint (environ 5 fois plus de moles d'insert que de vecteur), pendant une nuit à 19℃. Le produit de ligation est électroporé dans les cellules électrocompétentes d'*E. coli* DH5α. Les bactéries transformées sont sélectionnées par leur croissance en présence de 300 µg/mL d'érythromycine. Pour s'assurer de la présence de l'insert dans le plasmide, une PCR est réalisée sur les colonies avec des amorces *pG+host4630/5117* spécifiques du vecteur et qui encadrent le site multiple de clonage (voir partie 1, Tableau V). Les transformants sont mis en culture en bouillon LB contenant 300 µg/mL d'érythromycine afin d'extraire le plasmide à l'aide du kit Mini Prep Qiaprep Spin (Qiagen). Une restriction enzymatique est réalisée sur l'ADN plasmidique obtenu afin de vérifier la présence de l'insert dans les plasmides pG$^+$host5/fbsA_del1/4, pG$^+$host5/fbsB_del1/4 et pG$^+$host5/rgfAC_del1/4.

### 4.2 Recombinaison homologue

La recombinaison homologue et la délétion des gènes *fbsA*, *fbsB* et *rgfAC* (Figure 21) sont conduites selon la méthodologie précédemment décrite dans la première partie (voir Partie 1, § 4.3). Pour contrôler la délétion du fragment à inactiver, une PCR de vérification est effectuée en utilisant des amorces encadrant le site de délétion (Tableau XIV). Lorsque le fragment d'amplification obtenu est de la bonne taille, la délétion est alors confirmée par séquençage de l'amplicon et les mutants *ΔfbsA*, *ΔfbsB* et *ΔrgfAC* de trois souches sont ainsi obtenus. L'inactivation du gène *fbsB* a également été réalisée chez la souche L1*ΔfbsA* de manière à obtenir le double mutant L1*ΔfbsAΔfbsB.*

**Tableau XIV. Amorces utilisées pour vérifier la délétion des gènes *fbsA*, *fbsB* et *rgfAC.***

| Amorces | Séquence (5'-3') | Taille de l'amplicon (pb) | Région cible |
|---|---|---|---|
| fbsA_del5 | CACTATTGCGCAGGGAGATT | 1000 | délétion *fbsA* |
| fbsA_del6 | CAATATCAACATCGTAAAATGATT | 1560 | souche sauvage |
| fbsB_del5 | TGACCAAGTTAATTGAATTTTCC | 1500 | délétion *fbsB* |
| fbsB_del6 | TTCTGTTTATCGCCTCCACTC | 2900 | souche sauvage |
| rgfA_del5 | ACGAGGAGACGAAAGTGAAT | 847 | délétion *rgfAC* |
| rgfC_del6 | CGCAAAGTTCTATGGTTCAAAA | 2277 | souche sauvage |

## 5. Traitement des ARN

L'extraction de l'ARN bactérien des souches L1, L2 et L50 ainsi que de leurs différents mutants, la rétrotranscription et la quantification de leur ADNc sont conduites selon la méthodologie précédemment décrite dans la première partie (voir Partie 1, § 5). Les couples d'amorces (*gyrA/rgyrA*, *fbsA282/fbsA405*, *fbsB354/fbsB483* et *rovS82/rovS228*) sont utilisés dans les réactions de PCR en temps réel pour quantifier respectivement les transcrits spécifiques des gènes *gyrA*, *fbsA*, *fbsB*, et *rovS* (Tableau XII) Le niveau de transcription de chaque gène est calculé par la formule suivante $2^{-\Delta\Delta Ct}$ où ΔCt correspond à la différence entre le Ct spécifique des gènes *fbsA*, *fbsB* ou *rovS* et le Ct spécifique du gène de référence *gyrA*. Les niveaux de transcription des différents gènes chez les souches mutantes sont exprimés en x-fois par rapport à ceux de la souche sauvage correspondante. Une différence de ± 2 fois est considérée comme significative.

## 6. Liaison des bactéries au fibrinogène

### 6.1 Immobilisation des protéines et préparation des inoculums bactériens

Le fibrinogène humain (Diagnostica Stago, Asnières, France) est dilué dans du tampon PBS stérile (150 mM NaCl, 10 mM phosphate de sodium, pH 7,2) à raison de 21 nM. Cent microlitres de cette solution sont déposés dans des plaques en

polystyrène 96 puits à fond plat (P96) et incubés à 4℃ pendant 18 heures. Après 3 lavages au PBS pour éliminer les protéines en excès, les puits sont opérationnels pour le test de liaison.

Les souches bactériennes sont ensemencées dans 10 mL de bouillon TH durant une nuit à 37℃. Après centrifugation 10 min utes à 3000 g, le culot est repris dans du tampon PBS. La concentration est ensuite ajustée selon l'inoculum désiré pour le test de liaison au fibrinogène.

### 6.2 Test de liaison au fibrinogène

Pour le test de liaison (Rosenau *et al*., 2007), 50 µL de suspension bactérienne contenant entre $5 \times 10^7$ et $1 \times 10^8$ UFC/mL sont mis en contact durant 90 min à 37℃ avec le fibrinogène préalablement immobi lisé sur les plaques P96. Après 5 lavages au PBS pour éliminer les bactéries qui n'ont pas adhéré aux protéines, 100 µL d'une solution de sérine-protéase 0,01% (Sigma) sont ajoutés dans les puits et incubés durant 15 min à 37℃ afin de détacher les b actéries ayant adhéré au fibrinogène. Le contenu des puits est prélevé par aspirations et refoulements vigoureux et la quantité de bactéries recueillies est ensuite déterminée par dénombrement des UFC sur gélose TS. Pour chaque préparation, le pourcentage de liaison au fibrinogène est obtenu par le ratio entre le nombre de bactéries ayant adhéré et le nombre de bactéries présentes dans les inoculums.

## **Partie 2.** Liaison au fibrinogène des souches de CC17

# C-Résultats

## 1. Prévalence des gènes *fbs* et de leurs gènes régulateurs au sein des souches de CC17 et des souches appartenant aux principales autres lignées phylogénétiques

Les deux gènes *fbsA* et *fbsB* et leurs gènes régulateurs (*rogB, rovS* et *rgf*) sont recherchés par PCR dans une collection de 134 souches représentatives des cinq principales lignées phylogénétiques de l'espèce *S. agalactiae* : CC1 (29 souches), CC10 (26 souches), CC17 (38 souches), CC19 (21 souches) et CC23 (20 souches) (Tableau XV). Dans tous les cas, la taille des amplicons obtenus correspond à la taille attendue.

Le gène *fbsA* est trouvé chez toutes les souches de CC17 et de CC23, chez la plupart des souches de CC10 (92,3%) et de CC1 (82,8%), et seulement chez 23,8% des souches de CC19. Le gène *fbsB* est trouvé chez toutes les souches de CC17, chez 75,0% des souches de CC23, et chez une seule souche de CC19 (4,8%), tandis que les souches de CC10 et de CC1 n'ont pas le gène *fbsB*. Le gène *rovS* est trouvé chez toutes les souches quel que soit leur CC. Le gène *rogB* est trouvé chez toutes les souches de CC1, CC10, CC19 et CC23 et chez seulement 21,0% des souches de CC17. Le locus *rgf* est trouvé chez toutes les souches de CC17 et de CC10, chez la plupart des souches de CC1 (93,1%), et rarement chez les souches de CC19 (14,3%) et de CC23 (25,0%).

**Tableau XV. Prévalence des gènes *fbs* et de leurs gènes régulateurs au sein des principaux complexes clonaux (CC) de l'espèce *S. agalactiae*.**

| | Complexes Clonaux (CC) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | CC17<br>N°(%)<br>n = 38 | CC19<br>N°(%)<br>n = 21 | CC23<br>N°(%)<br>n = 20 | CC1<br>N°(%)<br>n = 29 | CC10<br>N°(%)<br>n = 26 |
| *fbsA* | 38 (100.0) | 5 (23.8) | 20 (100.0) | 24 (82.8) | 24 (92.3) |
| *fbsB* | 38 (100.0) | 1(4.8) | 15 (75.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| *rovS* | 38 (100.0) | 21 (100.0) | 20 (100.0) | 29 (100.0) | 26 (100.0) |
| *rogB* | 8 (21.0) | 21 (100.0) | 20 (100.0) | 29 (100.0) | 26 (100.0) |
| *rgf* | 38 (100.0) | 3 (14.3) | 5 (25.0) | 27 (93.1) | 26 (100.0) |

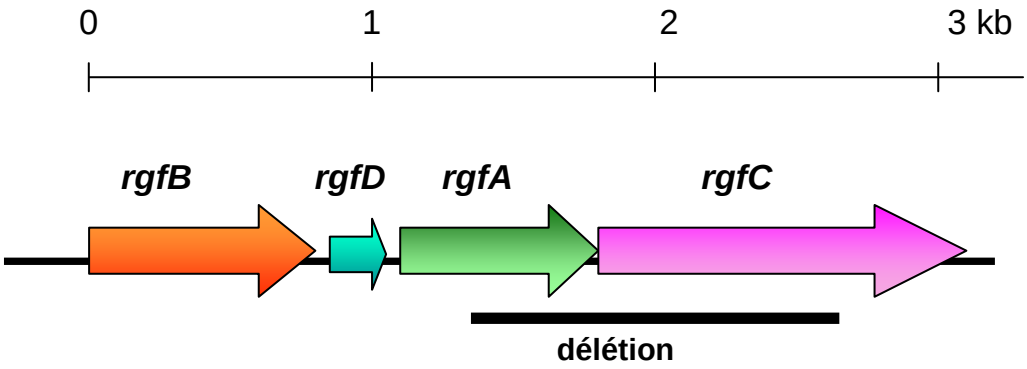



**Figure 22. Représentation schématique du locus *rgfBDAC*.**

Les cadres ouverts de lecture, le sens de la transcription et la taille approximative des différents gènes sont indiqués (Spellerberg et al., 2002). Le segment qui a été délété dans le mutant ΔrgfAC est représenté par une ligne au dessous des gènes.

Ainsi, les souches de CC1 et de CC10 partagent le même profil caractérisé par la présence des différents gènes régulateurs des gènes *fbs*, du gène *fbsA*, et par l'absence du gène *fbsB*. Leur capacité moyenne de liaison au fibrinogene est proche et respectivement 4,71% ± 4,76% et 4,91% ± 1,76% (Tableau XI). La plupart des souches de CC19 ne possèdent pas le locus *rgf* ni les gènes *fbsA* et *fbsB*. Leur capacité de liaison au fibrinogène est 3,68% ± 3,08% (Tableau XI). La présence simultanée des gènes *fbsA* et *fbsB* est restreinte aux souches de CC17 (100%) et de CC23 (75%). Toutefois, le profil des gènes régulateurs de ces deux groupes de souches est différent. En effet, le locus *rgf* est associé aux souches de CC17 qui sont carractérisées par une forte capacité de liaison au fibrinogène (14,0% ± 6,84%) alors que le gène *rogB* est associé aux souches de CC23 qui ont une capacité de liaison au fibrinogène significativement plus faible que les souches de CC17 (4,35% ± 1,22%) ($P < 0,001$) (Tableau XI). Ces données montrent que les différents profils des gènes *fbs* et de leurs gènes régulateurs sont associés aux lignées phylogénétiques, et que les souches de CC17 ont une configuration unique caractérisée par la présence des gènes *fbsA*, *fbsB*, *rovS*, et *rgf* et par l'absence du gène *rogB*. Cette configuration pourrait être responsable de leur forte capacité de liaison au fibrinogène.

### 2. Effet du locus *rgf* sur l'expression des gènes *fbsA* et *fbsB*

Nos résultats montrent que la présence des gènes *rgf*, *fbsA* et *fbsB* est strictement limitée aux souches de CC17 (Tableau XV). Le rôle du locus *rgf* codant pour le TCS RgfA/RgfC sur l'expression des gènes *fbsA* et *fbsB* n'a pas encore été décrit dans la littérature. Afin de préciser ce rôle, nous avons construit des mutants de délétion non polaire *ΔrgfAC* des souches L1, L2 et L50 isolées de LCR de nouveau-nés, de sérotype III et qui appartiennent au CC17. Chez ces mutants, les 374 derniers nucléotides du gène *rgfA* codant pour le domaine de liaison à l'ADN ainsi que les 1055 premiers nucléotides du gène *rgfC* sont délétés (Figure 22). Nous avons ensuite déterminé le niveau d'expression des gènes *fbsA* et *fbsB* ainsi que la capacité de liaison au fibrinogène de ces mutants. L'étude des mutants de trois souches nous permet ainsi d'éviter les résultats de type souche dépendants.

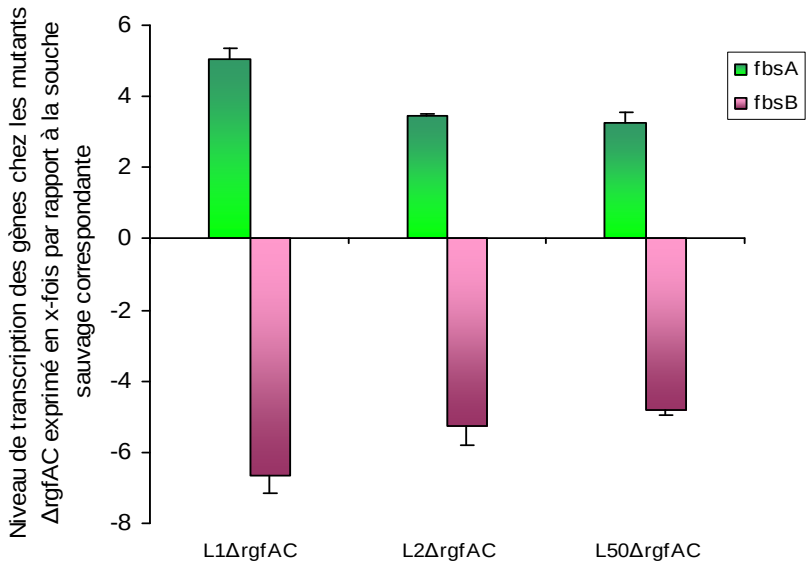



**Figure 23. Niveaux relatifs de transcription des gènes *fbsA* et *fbsB* chez les mutants *ΔrgfAC*.**

Le niveau de transcription de chaque gène est normalisé au niveau de transcription du gène *gyrA* et exprimé par rapport au niveau de transcription de la souche sauvage correspondante. Chaque expérience est réalisée au moins trois fois. Les histogrammes sont les moyennes et les barres sont les écarts-types des moyennes.

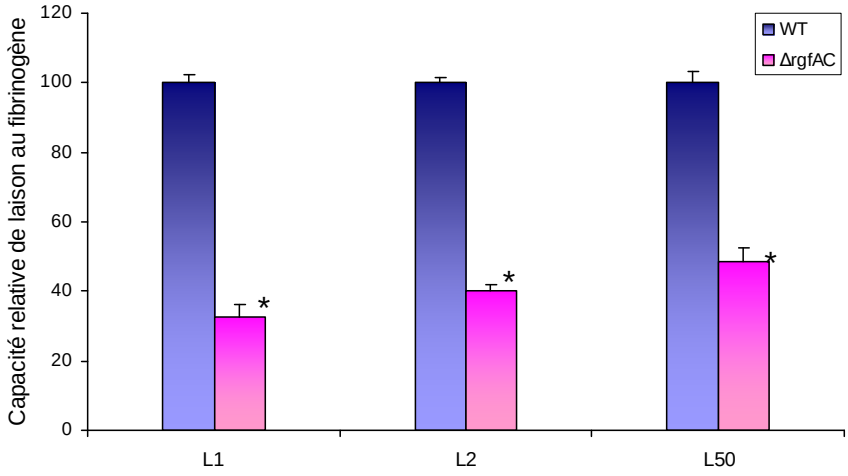



**Figure 24. Capacité relative de liaison au fibrinogène humain des mutants *ΔrgfAC* par rapport aux souches sauvages correspondantes (WT).**

Le fibrinogène humain (21 nM) est immobilisé sur une plaque P96. 5 × 107 à 1 × 108 UFC/mL sont ensuite ajoutés et incubés pendant 90 min à 37ºC. La capacité de liaison au fibrinogène est obtenue par le ratio entre le nombre de bactéries ayant adhéré et le nombre de bactéries présentes dans les inoculums. La capacité de liaison au fibrinogène des souches WT L1, L2 et L50 est arbitrairement fixée à 100 et celles des mutants isogéniques sont des valeurs relatives. Chaque expérience est réalisée trois fois. Les histogrammes sont les moyennes et les barres sont les écarts-types des moyennes des capacités de liaison au fibrinogène. * La capacité de se lier au fibrinogène est significativement plus élevée pour la souche sauvage WT que pour le mutant ($P < 0,001$).

### 2.1 Quantification des transcrits des gènes *fbsA* et *fbsB* chez les mutants *ΔrgfAC.*

Par RT-PCR en temps réel, nous avons quantifié les niveaux de transcription des gènes *fbsA* et *fbsB* chez les mutants *ΔrgfAC* et leurs souches sauvages (Figure 23). Par rapport à la souche sauvage correspondante, le gène *fbsB* est respectivement 6,67 ± 0,47, 5,28 ± 0,54 et 4,82 ± 0,14 fois moins transcrit dans les mutants L1*ΔrgfAC*, L2*ΔrgfAC* et L50*ΔrgfAC*. En revanche, le gène *fbsA* est respectivement 5,07 ± 0,30, 3,45 ± 0,05, 3,24 ± 0,32 fois plus transcrit dans ces mutants. Ces résultats montrent que RgfA/RgfC inhibe la transcription du gène *fbsA*, et active celle du gène *fbsB* chez ces trois souches de CC17.

Afin de déterminer si RgfA/RgfC régule les gènes *fbs* via le gène *rovS* qui code pour un inhibiteur de transcription du gène *fbsA*, nous avons quantifié le niveau de transcription du gène *rovS* chez les mutants *ΔrgfAC* par rapport aux souches sauvages correspondantes. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les niveaux de transcription des souches testées.

### 2.2 Capacité de liaison au fibrinogène humain des mutants *ΔrgfAC*

Nous avons comparé la capacité de liaison au fibrinogène des mutants *ΔrgfAC* avec celles des souches sauvages correspondantes. Le pourcentage de liaison au fibrinogène est de 22,5% ± 2,4% pour la souche sauvage L1 et 7,3% ± 0,8% pour son mutant *ΔrgfAC*. Il est de 25,3 % ± 1,4% pour la souche sauvage L2 et 10,2 % ± 1,6% pour son mutant isogénique *ΔrgfAC*, de 23,2% ± 3,4% pour la souche sauvage L50 et 11,2% ± 1,1% pour son mutant isogénique *ΔrgfAC*. Ainsi, comme indiqué dans la figure 24, les mutants *ΔrgfAC* montrent respectivement une diminution moyenne de 67,5%, 59,7% et 51,7% de leur capacité de liaison au fibrinogène par rapport aux souches parentales correspondantes L1, L2 et L50 ($P < 0,001$).

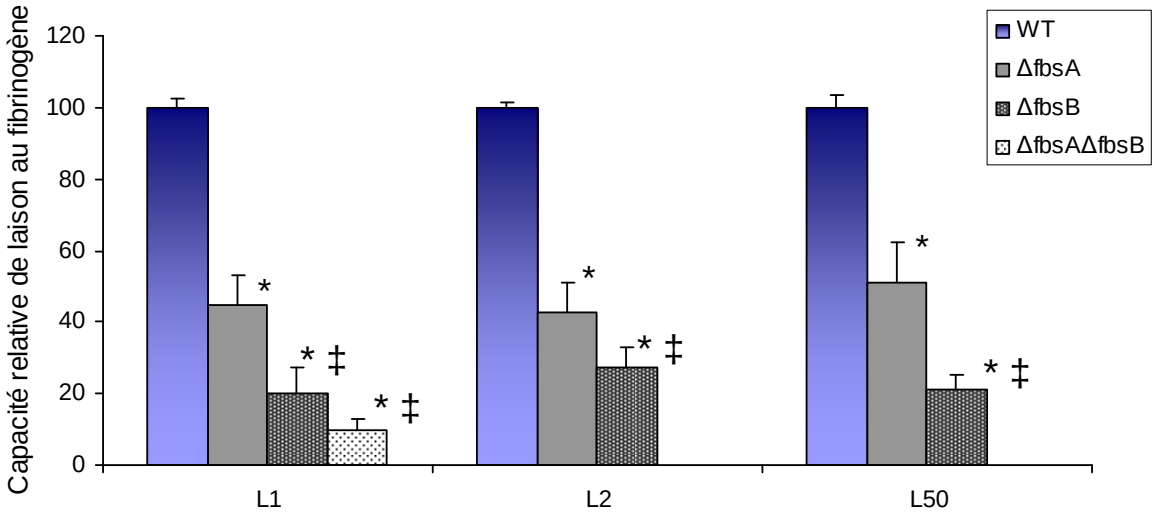



**Figure 25. Capacité relative de liaison au fibrinogène humain des souches sauvages (WT) et des mutants isogéniques correspondants *ΔfbsA*, *ΔfbsB* et *ΔfbsAΔfbsB*.**

Le fibrinogène humain (21 nM) est immobilisé sur une plaque P96. 5 × 107 à 1 × 108 UFC/mL sont ensuite ajoutés et incubés pendant 90 min à 37ºC. La capacité de liaison au fibrinogène est obtenue par le ratio entre le nombre de bactéries ayant adhéré et le nombre de bactéries présentes dans les inoculums. La capacité de liaison au fibrinogène des souches sauvages (WT) L1, L2 et L50 est arbitrairement fixée à 100 et celles des mutants isogéniques sont des valeurs relatives. Chaque expérience est réalisée trois fois. Les histogrammes sont les moyennes et les barres sont les écarts-types des moyennes des capacités de liaison au fibrinogène.

* La capacité de liaison au fibrinogène est significativement plus élevée chez la souche sauvage WT que chez les mutants ($P < 0,001$).

‡ La capacité de liaison au fibrinogène est significativement plus élevée chez les mutants *Δfbs*A que chez les mutants *ΔfbsB* et *ΔfbsAΔfbsB* ($P < 0,001$).

# 3. Contribution relative des gènes *fbsA* et *fbsB* dans la capacité de liaison au fibrinogène des souches de CC17

## 3.1 Capacité de liaison au fibrinogène des mutants *ΔfbsA*, *ΔfbsB* et *ΔfbsAΔfbsB*

Pour aborder la question du rôle respectif de chacun des gènes, *fbsA* et *fbsB*, dans la capacité de liaison au fibrinogène humain des souches de CC17, des mutants de délétion, simples (*ΔfbsA*, *ΔfbsB*) à partir des souches L1, L2 et L50 et un double mutant (*ΔfbsAΔfbsB*) à partir de la souche L1, ont été construits. La croissance des souches sauvages et des mutants a été comparée en milieu Todd-Hewitt. Aucune différence de croissance n'a pu être observée entre les différentes souches étudiées. La capacité de liaison au fibrinogène des souches parentales et de leurs mutants a été ensuite évaluée. Le pourcentage de liaison au fibrinogène est de 22,5% ± 2,4% pour la souche sauvage L1, 10,1% ± 1,7% pour son mutant *ΔfbsA*, 4,47% ± 1,55% pour son mutant *ΔfbsB*, et 2,2% ± 0,7% pour son double mutant *ΔfbsAΔfbsB*. Il est de 25,3% ± 1,4% pour la souche sauvage L2, 10,8% ± 2,1% pour son mutant *ΔfbsA* et 7% ± 1,3% pour son mutant *ΔfbsB*, de 23,2% ± 3,4% pour la souche sauvage L50, 11,8 % ± 2,1% pour son mutant *ΔfbsA* et 4,9% ± 1% pour son mutant *ΔfbsB*. Ainsi, comme décrit dans la figure 25, la délétion du gène *fbsA* réduit respectivement la capacité de liaison au fibrinogène des souches sauvages L1, L2 et L50 de 55,1%, 57,4% et 49,2% ($P < 0,001$), alors que la délétion du gène *fbsB* entraîne respectivement une diminution de 80,1%, 72,5% et 78,8% ($P < 0,001$), et la délétion des deux gènes *fbsA* et *fbsB* entraîne une diminution de 90,1% de la capacité de liaison au fibrinogène de la souche L1 ($P < 0,001$). En outre, la capacité de liaison au fibrinogène des mutants isogéniques *ΔfbsB* et du double mutant *ΔfbsAΔfbsB* est significativement plus basse que celle des mutants isogéniques *ΔfbsA* ($P < 0,001$). Ces résultats suggèrent un rôle majeur de la protéine FbsB dans la liaison au fibrinogène humain des souches de CC17.

## 3.2 Quantification des transcrits des gènes *fbsA* et *fbsB* chez les mutants

Par RT-PCR en temps réel, nous avons quantifié les niveaux de transcription des gènes *fbsA* et *fbsB* chez les souches sauvages L1, L2 L50 et chez leurs mutants

*ΔfbsA, ΔfbsB*, et *ΔfbsAΔfbsB*. Comme prévu, aucun transcrit du gène *fbsA* n'est détecté chez les mutants *ΔfbsA* et *ΔfbsAΔfbsB*; de même, aucun transcrit du gène *fbsB* n'est détecté chez les mutants *ΔfbsB* et *ΔfbsAΔfbsB*. La délétion du gène *fbsA* n'a pas d'effet significatif sur la transcription du gène *fbsB*, puisque chez les mutants *ΔfbsA*, le niveau de transcription du gène *fbsB* est de 1,4 ± 0,2 fois celui de la souche sauvage correspondante. De même, la délétion du gène *fbsB* n'a pas d'effet significatif sur la transcription du gène *fbsA* puisque le niveau de transcription du gène *fbsA* des mutants *ΔfbsB* est de 0,96 ± 0,03 fois celui de la souche sauvage correspondante. Ces données montrent que l'expression des deux gènes *fbsA* et *fbsB* est indépendante l'une de l'autre et que la délétion d'un des deux gènes n'a pas d'influence sur l'expression de l'autre.

Chez les souches parentales L1, L2 et L50, Le niveau de transcription du gène *fbsB* est respectivement 12,24 ± 2,38 fois, 12,67 ± 3,30 fois et 9,17 ± 2,59 fois plus important que celui du gène *fbsA.* Ces résultats vont donc dans le sens d'un rôle majeur du gène *fbsB* par rapport à *fbsA* dans la capacité de liaison au fibrinogène des souches de CC17.

## **Partie 2.** Liaison au fibrinogène des souches de CC17

# D-Discussion

La surreprésentation des souches de CC17 parmi les souches responsables de méningite néonatale est rapportée dans le monde entier (Bohnsack *et al*., 2008, Jones *et al*., 2006, Manning *et al*., 2009, Martins *et al*., 2007, Poyart *et al*., 2008), soulignant ainsi le fait que ce clone semble posséder des propriétés uniques et spécifiques favorisant son pouvoir invasif du système nerveux central du nouveau-né (Brochet *et al*., 2006., Seifert *et al*., 2006, Springman *et al*., 2009, Tazi *et al*., 2010). .

Nous avions précédemment rapporté que la capacité de la liaison au fibrinogène des souches de CC17 était significativement plus importante que celle des souches des autres lignées phylogénétiques (Rosenau *et al*., 2007). Dans ce travail, nous avons recherché les gènes *fbsA* et *fbsB* impliqués dans la liaison au fibrinogène ainsi que leurs gènes régulateurs, dans une collection de 134 souches représentatives des cinq principales lignées phylogénétiques de l'espèce *S. agalactiae*. Aucun gène n'est spécifique ni des souches de CC17, ni de celles des autres CCs. Toutefois, une corrélation entre les combinaisons spécifiques de ces gènes et les CCs est mise en évidence. Seules les souches de CC17 possèdent la combinaison *fbsA*, *fbsB* et *rgf*. Le gène *rogB* est rarement retrouvé chez les souches de ce CC, mais présent chez toutes les souches des autres CCs. De même, le gène *rogB* est absent du génome séquencé de la souche de *S. agalactiae* de CC17, COH1 (Tettelin *et al*., 2005) et Brochet *et al*. ont également rapporté l'absence de ce gène dans une collection de 20 souches de CC17 (Brochet *et al*., 2006). Comme chaque CC est caractérisé par une combinaison particulière de gènes *fbs* et de leurs gènes régulateurs, on peut alors envisager que ces combinaisons expliquent les différences de capacité de liaison au fibrinogène des différentes lignées phylogénétiques et ainsi leur pouvoir infectieux.

Afin d'éviter d'extrapoler à l'ensemble d'un complexe clonal les résultats obtenus avec une souche unique qui pourraient se révéler être spécifiques à cette souche, nous avons choisi d'étudier trois souches du CC17, pour lesquelles nous avons construit divers mutants. La construction des mutants de délétion Δ*rgfAC* de ces trois souches, nous a permis de déterminer le rôle du TCS RgfA/RgfC sur les gènes *fbsA* et *fbsB*. La délétion de ce régulateur entraîne chez les trois souches étudiées des conséquences importantes mais opposées sur la transcription des deux gènes permettant l'adhésion au fibrinogène. En effet, ces mutants transcrivent significativment plus le gène *fbsA* et significativment moins le gène *fbsB,* indiquant

ainsi que RgfA/RgfC inhibe la transcription du gène *fbsA* et active celle du gène *fbsB*. Spellerberg *et al*. ont montré que le régulateur de réponse RgfA et l'histidine kinase RgfC présentent respectivement 55% et 45% de similarité avec les protéines AgrA et AgrC de *Staphylococcus aureus* (Spellerberg *et al*., 2002). Le système de régulation *agr* (accessory gene regulator) est constitué de quatre gènes cotranscrits *agrBDCA*, régulant l'expression des principaux facteurs de virulence chez *S. aureus*. Les gènes codant pour des facteurs secrétés tels que des toxines sont activés par le système Agr alors que les gènes codant pour les protéines de surface telle que la protéine A et d'autres adhésines sont inhibés (Janzon et Arvidsson, 1990, Li *et al*., 1997a, Novick *et al*., 1993, Queck *et al*., 2008, Recsei *et al*., 1986). Nos résultats montrant chez les mutants *ΔrgfAC* l'activation du gène *fbsA* codant pour la protéine de surface FbsA, ainsi que l'inhibition du gène *fbsB* codant pour une protéine sécrétée, sont ainsi en accord avec le contrôle des facteurs sécrétés et des facteurs exposés à la surface par le système *agr* de *S. aureus*. De même, Spellerberg *et al*. ont montré que le système *rgf* inhibe le gène codant pour la protéine de surface ScpB ou C5a peptidase (Spellerberg *et al*., 2002). Le TCS RgfA/RgfC semble donc être un régulateur multigénique du clone CC17, et est donc digne d'études plus approfondies.

Les régulateurs de réponse modifient l'expression de leurs gènes cibles soit directement en se liant aux promoteurs de ces gènes soit indirectement par action sur d'autres régulateurs qui, à leur tour se lient aux promoteurs des gènes cibles (Jiang *et al*., 2008, Kreikemeyer *et al*., 2003, Ogura *et al*., 2010, Rajagopal 2009, Yoshida *et al*., 2006). Il a été démontré que le régulateur de transcription RovS se fixait au promoteur du gène *fbsA* et régulait ainsi négativement sa transcription (Samen *et al*., 2006). Puisque le TCS RgfA/RgfC inhibe lui aussi la transcription du gène *fbsA*, nous nous sommes demandé si ce TCS exerçait son inhibition via le gène *rovS*. Nous avons alors quantifié le niveau de la transcription du gène *rovS* chez les souches sauvages et chez les mutants *ΔrgfAC* correspondants et n'avons pas trouvé de différence entre les souches étudiées. Ces résultats suggèrent que le contrôle du gène *fbsA* par RgfA/RgfC et par RovS sont indépendants l'un de l'autre.

La comparaison du phénotype des souches sauvages L1, L2 et L50 avec leurs mutants *ΔfbsA et ΔfbsB* montre que la protéine FbsB est plus impliquée dans la liaison au fibrinogène que la protéine FbsA. En effet, l'inactivation du gène *fbsB*

réduit considérablement la capacité de liaison au fibrinogène des souches étudiées (80,1%, 72,5% et 78,8%), la délétion des deux gènes *fbs* de la souche L1 réduit cette capacité de 90%, tandis que la délétion du gène *fbsA* des trois souches ne réduit que partiellement leur capacité de liaison au fibrinogène (55,1%, 57,4% et 49,2%).

Nos résultats indiquant l'implication des deux protéines FbsB et FbsA dans la capacité de liaison au fibrinogène des souches de CC17 avec un rôle majeur de FbsB, sont ainsi en contradiction avec des études précédentes qui montrent que la protéine FbsA est la principale protéine de liaison au fibrinogène chez la souche 6313 de sérotype III et appartenant au CC23 (Gutekunst *et al*., 2004, Schubert *et al*., 2002, Schubert *et al*., 2004). Les raisons de ces différences phénotypiques entre ces souches ne sont pas complètement comprises mais on peut supposer qu'elles sont liées à des différences dans la régulation des gènes *fbs* en fonction du fond génétique des souches de *S. agalactiae*. En effet, les souches L1, L2 et L50 (de CC17) et la souche 6313 (de CC23) possèdent les deux gènes *fbsA* et *fbsB*, mais leur profil de gènes régulateurs est différent : contrairement aux souches L1, L2 et L50, la souche 6313 n'a pas de locus *rgfBDAC* fonctionnel et possède de plus le gène *rogB* (Gutekunst *et al*., 2003). Cette configuration qui conduit par deux mécanismes distincts à l'activation du gène *fbsA*, est donc en accord avec le rôle majeur de FbsA dans la capacité de liaison au fibrinogène des souches de CC23. Au contraire, la forte implication de FbsB par rapport à FbsA dans la capacité de liaison au fibrinogène des souches de CC17 peut être expliquée par le fait que l'expression du gène *fbsA* est inhibée par deux mécanismes chez ces souches : d'une part par l'effet inhibiteur de RgfA/RgfC, d'autre part par l'absence de l'activateur RogB. En effet chez les trois souches de CC17 étudiées, le niveau moyen de transcription du gène *fbsB* est significativement plus important (11,36 ± 1,91 fois) que celui du gène *fbsA,* confirmant ainsi notre hypothèse. Ainsi, selon le fond génétique des souches de *S. agalactiae*, différents circuits de régulation des gènes *fbs* peuvent être définis et peuvent expliquer les différences dans l'implication relative des gènes *fbs* dans la capacité de liaison au fibrinogène humain des souches de *S. agalactiae*.

En conclusion, nos résultats suggèrent qu'une combinaison spécifique de gènes *fbs* et de leurs gènes régulateurs est à l'origine de la forte capacité des souches de CC17 de se lier au fibrinogène humain, protéine dont la synthèse est

augmentée de façon considérable au cours de l'inflammation et lors d'exposition à un stress tel qu'une infection systémique (Rivera *et al*., 2007).

# Conclusion et Perspectives

*S. agalactiae* représente la première cause d'infections néonatales dans les pays développés. L'étude de la physiopathologie de ces infections apparaît primordiale afin de développer des stratégies ciblées de défense contre ces infections et contre le portage chez la femme enceinte.

De nombreuses études se sont intéressées aux facteurs de pathogénicité de *S. agalactiae*, notamment les protéines impliquées dans les phénomènes d'adhésion et/ou d'invasion cellulaire. Ainsi, les protéines ScpB et Lmb permettent à *S. agalactiae* de se fixer à des protéines de la matrice extra-cellulaire respectivement à la fibronectine et à la laminine (Beckmann *et al*., 2002, Spellerberg *et al*., 1999a). Les gènes codant ces deux protéines ont été retrouvés chez quasiment toutes les souches humaines et ceci quelque soit leur pouvoir pathogène (Bohnsack *et al*., 2000, Franken *et al*., 2001). Deux autres protéines, FbsA et FbsB, interviennent également dans le processus d'adhésion et/ou d'invasion en permettant la fixation de *S. agalactiae* au fibrinogène humain présent dans le plasma sanguin et dans la matrice extracellulaire (Gutekunst *et al*., 2004, Schubert *et al*., 2002, Schubert *et al*., 2004). Lors de cette étude, nous avons étudié ces quatre facteurs de pathogénicité en tenant compte des caractéristiques propres à chaque gène qui pourraient influencer leur expression.

Dans la première partie de notre travail, nous avons étudié l'influence de deux éléments génétiques mobiles, l'intron de groupe II GBSi1 et la séquence d'insertion IS*1548*, insérés entre les deux gènes *scpB* et *lmb*, sur l'expression de ces gènes. Nous avons confirmé l'existence d'une corrélation entre la structure de la région intergénique *scpB-lmb* et les divisions phylogénétiques de l'espèce *S. agalactiae* (Bohnsack *et al*., 2008, Granlund *et al*., 2001, Hery-Arnaud *et al.*, 2005). L'observation la plus significative de cette partie de travail est que la présence de la séquence d'insertion IS*1548* en amont du gène *lmb* s'accompagne d'une stimulation de la transcription et de l'expression de celui-ci, ce qui pourrait expliquer la virulence particulière des souches appartenant au CC19 et de sérotype capsulaire III régulierement décrites dans les méningites néonatales. Ces résultats nous ont conduit à élucider le mécanisme d'activation du gène *lmb* par l'IS*1548* et nous ont permis d'identifier un promoteur potentiel en 3' de l'IS*1548* situé à 70 nucléotides en amont du promoteur initial du gène *lmb*.

En perspective, nous envisageons dans un premier temps de déterminer précisément le (+1) de transcription apporté par ce promoteur potentiel d'IS*1548* par des expériences de 5'RACE (5' Rapid Amplification of cDNA Ends). Dans un second temps, nous déterminerons si l'activation du gène *lmb* est due à ce promoteur par des expériences de fusions transcriptionnelles entre un gène rapporteur (ex *lacZ*) dépourvu de son promoteur (Poyart et Trieu-Cuot, 1997) et soit le promoteur potentiel de l'IS*1548* cloné séparément, soit le promoteur initial du gène *lmb*, soit les deux promoteurs. Ceci nous permettra également de déterminer le degré de participation de chacun de ces promoteurs dans le niveau d'expression du gène *lmb*.

A la lumière de ces résultats mettant en évidence le rôle d'une séquence d'insertion dans le pouvoir pathogène, il nous apparaît intéressant d'évaluer chez *S. agalactiae* l'impact des autres copies des séquences d'insertion, en particulier d'IS*1548,* et surtout celles insérées dans des régions intergéniques, sur l'expression des gènes flanquants. En effet, une étude réalisée dans notre laboratoire a mis en évidence un site d'insertion particulièrement intéressant d'IS*1548*, car retrouvé uniquement chez les souches responsables de méningites et situé dans la région intergénique entre le gène *sag0155* codant pour un transporteur du zinc et le gène *sag0154* (ou *adcR*) codant pour un répresseur du gène *sag0155,* en amont de ce dernier. Il serait donc intéressant de débuter notre étude par ce site.

Au cours de la deuxième partie de notre travail, nous avons confronté la prévalence des gènes *fbs* et de leurs gènes régulateurs à la structure de la population. Ceci nous a permis de mettre en évidence des combinaisons variées de gènes en fonction des lignées phylogénétiques constituant l'espèce, ce qui pourrait expliquer la différence de capacité de liaison au fibrinogène des souches appartenant à ces différentes lignées. Nous avons montré que le TCS RgfA/RgfC est absent dans les deux lignées CC23 et CC19 et présent dans les trois lignées CC17, CC1 et CC10. Pour trois souches de CC17, nous avons montré que le TCS RgfA/RgfC est un régulateur multigénique qui inhibe le gène *fbsA* et active le gène *fbsB*. Nos résultats complètent et permettent d'éclairer ceux de Gutekunst *et al*. et Schubert *et al*. (Gutekunst *et al*., 2004, Schubert *et al*., 2004). Chez les souches de CC23, la liaison au fibrinogène est principalement médiée par la protéine FbsA dont l'expression est stimulée par le régulateur RogB (Gutekunst *et al*., 2003, Schubert *et*

*al*., 2004) alors que la protéine FbsB joue un rôle secondaire dans la mesure où son expression reste limitée suite à l'absence du TCS RgfA/C (Gutekunst *et al*., 2004). Au contraire, chez les souches de CC17 qui ont fait l'objet de notre étude, compte tenu de l'absence de RogB et de la présence de RgfA/C, c'est la protéine FbsB qui joue un rôle majeur pour la liaison au fibrinogène, comparativement à FbsA dont l'expression est inhibée.

En perspective, il sera intéressant dans un premier temps de déterminer par des expériences de retard sur gel, si le régulateur de réponse RgfA se fixe directement sur les régions promotrices des gènes *fbsA* et *fbsB* pour influer leur transcription. Dans un deuxième temps, le rôle de ce TCS sur l'expression d'autres gènes de virulence pourra être determiné. Pour cet objectif, le dosage par RT-PCR quantitative des transcrits de ces gènes chez les mutants *ΔrgfAC* sera la première étape qui permettra de déterminer les membres du régulon RgfA/RgfC. Dans un troisième temps, des mutants de délétion *ΔrgfAC* seront construits pour des souches de CC1 et de CC10, et les transcrits des gènes de virulence de ces mutants seront quantifiés. Ainsi, le régulon RgfA/RgfC de souches de différentes lignées phylogénétiques (CC1, CC10 et CC17) pourra être comparé. En effet, Jiang *et al*. ont montré une variabilité de régulon du TCS universel CovR/CovS chez trois souches de *S. agalactiae* dont deux appartiennent au CC23 (NEM316 et 515) et une au CC19 (2603V/R) (Jiang *et al*., 2008). Une telle variation est donc susceptible de jouer un rôle important dans l'adaptation particulière d'une souche de *S. agalactiae* aux environnements de l'hôte et donc dans son potentiel pathogène.

Au total, nos résultats montrent qu'il existe une variabilité dans la prévalence (*fbsA*, *fbsB*) et dans la régulation (*lmb via* IS*1548*, *fbsA* et *fbsB* via RgfA/C et RogB) des gènes impliqués dans la liaison à la laminine et au fibrinogène entre différentes souches de *S. agalactiae.* Cette variabilité apparait clonale, associée à des différences de capacité de liaison aux protéines cibles et liée à la pathogénicité chez le nouveau-né. Ainsi, chez les deux principaux groupes de *S. agalactiae* retrouvés dans les infections invasives du nouveau-né, on observe des propriétés de liaison significativement plus élevées d'une part au fibrinogène chez les souches du clone hyperinvasif CC17, d'autre part à la laminine chez les souches du CC19.

Enfin, la persistance de *S. agalactiae* dans les infections des nouveau-nés et la hausse de son implication dans les infections chez des adultes fragilisés soulignent la nécessité de continuer à élucider les facteurs de virulence de cette bactérie et les mécanismes par lesquels elle interagit avec les cellules de l'hôte et avec son système de défense. Une meilleure compréhension des bases moléculaires de la pathogénie de *S. agalactiae* devrait permettre d'identifier de nouvelles molécules de l'hôte ou de la bactérie qui pourront représenter de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux candidats pour des vaccins (Dramsi *et al*., 2006, Madureira *et al*., 2007, Margarit *et al*., 2009, Rosini *et al.,* 2006, Tazi *et al*., 2010).

L'une des avancées majeures de ces quinze dernières années concernant l'étude des bactéries pathogènes est sans aucun doute l'avènement du séquençage des génomes, et le développement exponentiel des techniques de génomique structurale et fonctionnelle. En effet, ces différents outils ont permis ou devraient permettre de caractériser de façon plus précise les principaux facteurs impliqués dans la pathogénicité de *S. agalactiae* et leurs conditions d'expression qui peuvent étroitement dépendre de l'environnement de la bactérie (Hughes *et al*., 2002, Johri *et al*., 2006, Johri *et al*., 2007, Mereghetti *et al*., 2008a, Mereghetti *et al*., 2008b). La plasticité du génome de *S. agalactiae* ne facilite pas cette démarche de compréhension et de caractérisation (Glaser *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2005). Il est en effet très probable que le génome d'une souche individuelle présente des caractéristiques qui lui sont propres, et directement en lien avec sa capacité de virulence. Il est donc nécessaire d'une part d'obtenir de plus amples informations sur le génome des souches de *S. agalactiae* (8 génomes sont déjà séquencés) (Glaser *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2002, Tettelin *et al*., 2005), et d'autre part de renforcer les connaissances sur la physiologie de cette bactérie qui est encore mal connue.

# Bibliographie

Amaya RA, Baker CJ, Keitel WA, Edwards MS (2004) Healthy elderly people lack neutrophil-mediated functional activity to type V group B Streptococcus. J Am Geriatr Soc **52**: 46-50.

Amin A, Abdulrazzaq YM, Uduman S (2002) Group B streptococcal serotype distribution of isolates from colonized pregnant women at the time of delivery in United Arab Emirates. J. Infect **45**: 42-46.

Angata T, Varki A (2002) Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. Chem. Rev **102**: 439-469.

Anonyme (1996) Prevention of perinatal group B streptococcal disease: apublic health perspective. Centres for Diseases Control and Prevention. MMWR Recomm Rep **45**: 1-24.

Anonyme (2001) Prévention anténatale du risque infectieux bactérien néonatal précoce. Recommandations pour la pratique clinique. Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé Paris www.anaes.fr.

Anthony BF, Okada DM, Hobel CJ (1978) Epidemiology of group B Streptococcus: longitudinal observations during pregnancy. J. Infect. Dis **137**: 524-530.

Aravind L, Anantharaman V, Balaji S, Babu MM, Iyer LM (2005) The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. FEMS Microbiol. Rev **29**: 231-262.

Badri MS, Zawaneh S, Cruz AC, Mantilla G, Baer H, et al. (1977) Rectal colonization with group B streptococcus: relation to vaginal colonization of pregnant women. J. Infect. Dis **135**: 308-312.

Baker CJ (1997) Group B streptococcal infections. Clin Perinatol **24**: 59-70.

Baker CJ, Edwards MS (2003) Group B streptococcal conjugate vaccines. Arch. Dis. Child **88**: 375-378.

Baker CJ, Kasper DL (1985) Group B streptococcal vaccines. Rev. Infect. Dis **7**: 458-467.

Baker C, Rench M, Edwards M, Carpenter R, Hays B, et al. (1988) Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of Group B Streptococcus. N Engl J Med **319**: 1180-1185.

. Baker CJ, Rench MA, Kasper DL (1990) Response to type III polysaccharide in women whose infants have had invasive Group B streptococcal infection. N. Engl. J. Med **322**: 1857-1860.

Beckert S, Kreikemeyer B, Podbielski A (2001) Group A streptococcal *rofA* gene is involved in the control of several virulence genes and eukaryotic cell

attachment and internalization. Infect. Immun **69**: 534-537.

Beckmann C, Waggoner JD, Harris TO, Tamura GS, Rubens CE (2002) Identification of novel adhesins from Group B Streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. Infect. Immun **70**: 2869-2876.

Bergseng H, Afset JE, Radtke A, Loeseth K, Lyng RV, et al. (2009) Molecular and phenotypic characterization of invasive Group B Streptococcus strains from infants in Norway 2006-2007. Clin. Microbiol. Infect **15**: 1182-1185.

Bidet P, Brahimi N, Chalas C, Aujard Y, Bingen E (2003) Molecular characterization of serotype III Group B Streptococcus isolates causing neonatal meningitis. J. Infect. Dis **188**: 1132-1137.

Bisharat N, Crook DW, Leigh J, Harding RM, Ward PN, et al. (2004) Hyperinvasive neonatal group B Streptococcus has arisen from a bovine ancestor. J. Clin. Microbiol **42**: 2161-2167.

Biswas I, Gruss A, Ehrlich SD, Maguin E (1993) High-efficiency gene inactivation and replacement system for Gram-positive bacteria. J. Bacteriol **175**: 3628-3635.

Bliss SJ, Manning SD, Tallman P, Baker CJ, Pearlman MD, et al. (2002) Group B Streptococcus colonization in male and nonpregnant female university students: a cross-sectional prevalence study. Clin. Infect. Dis **34**: 184-190.

Bohnsack JF, Mollison KW, Buko AM, Ashworth JC, Hill HR (1991) Group B Streptococci inactivate complement component C5a by enzymic cleavage at the C-terminus. Biochem. J **273** ( Pt 3): 635-640.

Bohnsack JF, Takahashi S, Hammitt L, Miller DV, Aly AA, et al. (2000) Genetic polymorphisms of Group B Streptococcus *scpB* alter functional activity of a cell-associated peptidase that inactivates C5a. Infect. Immun **68**: 5018-5025.

Bohnsack JF, Whiting AA, Bradford RD, Van Frank BK, Takahashi S, et al. (2002) Long-range mapping of the *Streptococcus agalactiae* phylogenetic lineage restriction digest pattern type III-3 reveals clustering of virulence genes. Infect. Immun **70**: 134-139.

Bohnsack JF, Whiting A, Gottschalk M, Dunn DM, Weiss R, et al. (2008) Population structure of invasive and colonizing strains of *Streptococcus agalactiae* from neonates of six U.S. Academic Centers from 1995 to 1999. J. Clin. Microbiol **46**: 1285-1291.

Bolduc GR, Madoff LC (2007) The Group B streptococcal alpha C protein binds alpha1beta1-integrin through a novel KTD motif that promotes internalization of GBS within human epithelial cells. Microbiology **153**: 4039-4049.

Bolduc GR, Baron MJ, Gravekamp C, Lachenauer CS, Madoff LC (2002) The

alpha C protein mediates internalization of Group B Streptococcus within human cervical epithelial cells. Cell. Microbiol **4**: 751-758.

Borchardt SM, DeBusscher JH, Tallman PA, Manning SD, Marrs CF, et al. (2006) Frequency of antimicrobial resistance among invasive and colonizing Group B streptococcal isolates. BMC Infect. Dis **6**: 57.

Boyer KM, Gotoff SP (1986) Prevention of early-onset neonatal Group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. N. Engl. J. Med **314**: 1665-1669.

Brimil N, Barthell E, Heindrichs U, Kuhn M, Lütticken R, et al. (2006) Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany. Int. J. Med. Microbiol **296**: 39-44.

Brochet M, Couvé E, Zouine M, Vallaeys T, Rusniok C, et al. (2006) Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. Microbes Infect **8**: 1227-1243.

Brochet M, Couvé E, Glaser P, Guédon G, Payot S (2008a) Integrative conjugative elements and related elements are major contributors to the genome diversity of *Streptococcus agalactiae*. J. Bacteriol **190**: 6913-6917.

Brochet M, Rusniok C, Couvé E, Dramsi S, Poyart C, et al. (2008b) Shaping a bacterial genome by large chromosomal replacements, the evolutionary history of *Streptococcus agalactiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **105**: 15961-15966.

Brochet M, Couvé E, Bercion R, Sire J, Glaser P (2009) Population structure of human isolates of *Streptococcus agalactiae* from Dakar and Bangui. J. Clin. Microbiol **47**: 800-803.

Bröker G, Spellerberg B (2004) Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and horizontal gene transfer. Int. J. Med. Microbiol **294**: 169-175.

Brosch R, Pym AS, Gordon SV, Cole ST (2001) The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. Trends Microbiol **9**: 452-458.

Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guédon G (2002) Conjugative transposons: the tip of the iceberg. Mol. Microbiol **46**: 601-610.

Carlin AF, Lewis AL, Varki A, Nizet V (2007) Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. J. Bacteriol **189**: 1231-1237.

Castle SC (2000) Clinical relevance of age-related immune dysfunction. Clin. Infect. Dis **31**: 578-585.

Chaffin DO, Beres SB, Yim HH, Rubens CE (2000) The serotype of type Ia and III Group B streptococci is determined by the polymerase gene within the

polycistronic capsule operon. J. Bacteriol **182**: 4466-4477.

Chatellier S, Huet H, Kenzi S, Rosenau A, Geslin P, et al. (1996) Genetic diversity of rRNA operons of unrelated *Streptococcus agalactiae* strains isolated from cerebrospinal fluid of neonates suffering from meningitis. J. Clin. Microbiol **34**: 2741-2747.

Chatellier S, Ramanantsoa C, Harriau P, Rolland K, Rosenau A, et al. (1997) Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. J. Clin. Microbiol **35**: 2573-2579.

Chaudhuri K, Gonzales J, Jesurun CA, Ambat MT, Mandal-Chaudhuri S (2008) Anaphylactic shock in pregnancy: a case study and review of the literature. Int J Obstet Anesth **17**: 350-357.

Chaussee MS, Somerville GA, Reitzer L, Musser JM (2003) Rgg coordinates virulence factor synthesis and metabolism in *Streptococcus pyogenes*. J. Bacteriol **185**: 6016-6024.

Chaussee MA, Callegari EA, Chaussee MS (2004) Rgg regulates growth phase-dependent expression of proteins associated with secondary metabolism and stress in *Streptococcus pyogenes*. J. Bacteriol **186**: 7091-7099.

Cheng Q, Stafslien D, Purushothaman SS, Cleary P (2001a)The Group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin. Infect. Immun **70**: 2408-2413.

Cheng Q, Carlson B, Pillai S, Eby R, Edwards L, et al. (2001b) Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of Group B Streptococci. Infect. Immun **69**: 2302-2308.

Cheng Q, Debol S, Lam H, Eby R, Edwards L, et al. (2002) Immunization with C5a peptidase or peptidase-type III polysaccharide conjugate vaccines enhances clearance of Group B Streptococci from lungs of infected mice. Infect. Immun **70**: 6409-6415.

Christensen KK, Christensen P (1988) IgG subclasses and neonatal infections with Group B Streptococci. Monogr Allergy **23**: 138-147.

Christensen KK, Dahlander K, Eskström A, Svenningsen N, Christensen P (1981) Colonization of newborns with Group B Streptococci: relation to maternal urogenital carriage. Scand. J. Infect. Dis **13**: 23-27.

Cieslewicz MJ, Kasper DL, Wang Y, Wessels MR (2001) Functional analysis in type Ia group B Streptococcus of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci. J. Biol. Chem **276**: 139-146.

Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, et al. (2005)

Structural and genetic diversity of Group B Streptococcus capsular polysaccharides. Infect. Immun **73**: 3096-3103.

Cleary PP, Handley J, Suvorov AN, Podbielski A, Ferrieri P (1992) Similarity between the Group B and A streptococcal C5a peptidase genes. Infect. Immun **60**: 4239-4244.

Cleary PP, Prahbu U, Dale JB, Wexler DE, Handley J (1992) Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase. Infect. Immun **60**: 5219-5223.

Cole ST, Supply P, Honoré N (2001) Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity. Lepr Rev **72**: 449-461.

Culebras E, Rodríguez-Avial I, Betriu C, Picazo JJ (2005) Differences in the DNA sequence of the translational attenuator of several constitutively expressed *erm(A)* genes from clinical isolates of *Streptococcus agalactiae*. J. Antimicrob. Chemother **56**: 836-840.

Davies HD, Jones N, Whittam TS, Elsayed S, Bisharat N, et al. (2004) Multilocus sequence typing of serotype III Group B Streptococcus and correlation with pathogenic potential. J. Infect. Dis **189**: 1097-1102.

Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P (2007) Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin. Microbiol. Rev **20**: 79-114.

Devi AS, Ponnuraj K (2010) Cloning, expression, purification and ligand binding studies of novel fibrinogen-binding protein FbsB of *Streptococcus agalactiae*. Protein Expr. Purif **74**: 148-155.

Djabri B, Bareille N, Beaudeau F, Seegers H (2002) Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. Vet. Res **33**: 335-357.

Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA (2002) Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol **68**: 2950-2958.

Dmitriev A, Shen A, Shen X, Yang Y (2004) IS*Sa4*-based differentiation of *Streptococcus agalactiae* strains and identification of multiple target sites for IS*Sa4* insertions. J. Bacteriol **186**: 1106-1109.

Domelier A, van der Mee-Marquet N, Arnault L, Mereghetti L, Lanotte P, et al. (2008) Molecular characterization of erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* strains. J. Antimicrob. Chemother **62**: 1227-1233.

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

Dramsi S, Caliot E, Bonne I, Guadagnini S, Prévost M, et al. (2006) Assembly and role of pili in Group B streptococci. Mol. Microbiol **60**: 1401-1413.

D'Souza SE, Ginsberg MH, Plow EF (1991) Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. Trends Biochem. Sci **16**: 246-250.

Duarte RS, Miranda OP, Bellei BC, Brito MAVP, Teixeira LM (2004) Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. J. Clin. Microbiol **42**: 4214-4222.

Duarte RS, Bellei BC, Miranda OP, Brito MAVP, Teixeira LM (2005) Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian Group B streptococci recovered from bovine and human sources. Antimicrob. Agents Chemother **49**: 97-103.

Edwards MS, Baker CJ (2005) Group B streptococcal infections in elderly adults. Clin. Infect. Dis **41**: 839-847.

Edwards MS, Rench MA, Palazzi DL, Baker CJ (2005) Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in healthy elderly persons. Clin. Infect. Dis **40**: 352-357.

Eickhoff TC, Klein JO, Daly AK, Ingall D, Finland M (1964) Neonatal sepsis and other infections due to group B beta-hemolytic streptococci. N. Engl. J. Med **271**: 1221-1228.

Elliott JA, Facklam RR, Richter CB (1990) Whole-cell protein patterns of nonhemolytic Group B, type Ib, streptococci isolated from humans, mice, cattle, frogs, and fish. J. Clin. Microbiol **28**: 628-630.

Elliott JA, Farmer KD, Facklam RR (1998) Sudden increase in isolation of Group B streptococci, serotype V, is not due to emergence of a new pulsed-field gel electrophoresis type. J. Clin. Microbiol **36**: 2115-2116.

Elsner A, Kreikemeyer B, Braun-Kiewnick A, Spellerberg B, Buttaro BA, et al. (2002) Involvement of Lsp, a member of the LraI-lipoprotein family in *Streptococcus pyogenes*, in eukaryotic cell adhesion and internalization. Infect. Immun **70**: 4859-4869.

Evans JJ, Pasnik DJ, Klesius PH, Al-Ablani S (2006) First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (Tursiops truncatus). J. Wildl. Dis **42**: 561-569.

Evans JJ, Klesius PH, Pasnik DJ, Bohnsack JF (2009) Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Emerging Infect. Dis **15**: 774-776.

Farley MM (2001) Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. Clin. Infect. Dis **33**: 556-561.

Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG (2004) eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J. Bacteriol **186**: 1518-1530.

Ferrieri P, Blair LL (1977) Pharyngeal carriage of Group B streptococci: detection by three methods. J. Clin. Microbiol **6**: 136-139.

Finlay BB, Falkow S (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev **61**: 136-169.

Fitoussi F, Loukil C, Gros I, Clermont O, Mariani P, et al. (2001) Mechanisms of macrolide resistance in clinical Group B streptococci isolated in France. Antimicrob. Agents Chemother **45**: 1889-1891.

Fleer A, Gerards LJ, Verhoef J (1988) Host defence to bacterial infection in the neonate. J. Hosp. Infect **11**: 320-327.

Florindo C, Viegas S, Paulino A, Rodrigues E, Gomes JP, et al. (2009) Molecular characterization and antimicrobial susceptibility profiles in *Streptococcus agalactiae* colonizing strains: association of erythromycin resistance with subtype III-1 genetic clone family. Clin. Microbiol. Infect (Accepted doi:1111/j.1469-06911.2009.03106x).

Forquin M, Tazi A, Rosa-Fraile M, Poyart C, Trieu-Cuot P, et al. (2007) The putative glycosyltransferase-encoding gene *cylJ* and the Group B Streptococcus (GBS)-specific gene *cylK* modulate hemolysin production and virulence of GBS. Infect. Immun **75**: 2063-2066.

Foxman B, Gillespie B, Manning SD, Howard LJ, Tallman P, et al. (2006) Incidence and duration of Group B Streptococcus by serotype among male and female college students living in a single dormitory. Am. J. Epidemiol **163**: 544-551.

Framson PE, Nittayajarn A, Merry J, Youngman P, Rubens CE (1997) New genetic techniques for Group B streptococci: high-efficiency transformation, maintenance of temperature-sensitive pWV01 plasmids, and mutagenesis with Tn*917*. Appl. Environ. Microbiol **63**: 3539-3547.

Franken C, Haase G, Brandt C, Weber-Heynemann J, Martin S, et al. (2001) Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*. Mol. Microbiol **41**: 925-935.

Franken C, Brandt C, Bröker G, Spellerberg B (2004) IS*Sag1* in streptococcal strains of human and animal origin. Int. J. Med. Microbiol **294**: 247-254.

Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. Nat. Rev. Microbiol **3**: 722-732.

Gagneur A, Héry-Arnaud G, Croly-Labourdette S, Gremmo-Feger G, Vallet S, et al. (2009) Infected breast milk associated with late-onset and recurrent Group B streptococcal infection in neonatal twins: a genetic analysis. Eur. J. Pediatr **168**: 1155-1158.

Garcia MI, Labigne A, Le Bouguenec C (1994) Nucleotide sequence of the afimbrial-adhesin-encoding *afa-3* gene cluster and its translocation via flanking IS*1* insertion sequences. J. Bacteriol **176**: 7601-7613.

Gibson RL, Nizet V, Rubens CE (1999) Group B streptococcal beta-hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. Pediatr. Res **45**: 626-634.

Glaser P, Rusniok C, Buchrieser C, Chevalier F, Frangeul L, et al. (2002) Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. Mol. Microbiol **45**: 1499-1513.

Gleich-Theurer U, Aymanns S, Haas G, Mauerer S, Vogt J, et al. (2009) Human serum induces streptococcal C5a peptidase expression. Infect. Immun **77**: 3817-3825.

Gottschalk B, Bröker G, Kuhn M, Aymanns S, Gleich-Theurer U, et al. (2006) Transport of multidrug resistance substrates by the *Streptococcus agalactiae* hemolysin transporter. J. Bacteriol **188**: 5984-5992.

Graham MR, Smoot LM, Migliaccio CAL, Virtaneva K, Sturdevant DE, et al. (2002) Virulence control in Group A Streptococcus by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and in vivo infection modeling. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **99**: 13855-13860.

Granlund M, Oberg L, Sellin M, Norgren M (1998) Identification of a novel insertion element, IS*1548*, in Group B streptococci, predominantly in strains causing endocarditis. J. Infect. Dis **177**: 967-976.

Granlund M, Michel F, Norgren M (2001) Mutually exclusive distribution of IS*1548* and GBSi1, an active group II intron identified in human isolates of Group B streptococci. J. Bacteriol **183**: 2560-2569.

Gutekunst H, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ (2003) Analysis of RogB-controlled virulence mechanisms and gene repression in *Streptococcus agalactiae*. Infect. Immun **71**: 5056-5064.

Gutekunst H, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ (2004) The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. Infect. Immun **72**: 3495-3504.

Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, Tschäpe H (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol.

Microbiol **23**: 1089-1097.

Hall MA, Edwards MS, Baker CJ (1992) Complement and antibody participation in opsonophagocytosis of type IV and V Group B streptococci. Infect. Immun **60**: 5030-5035.

Haug RH, Høiby EA, Lermark G (1983) Serotyping and bacteriophage typing of Group B streptococci. NIPH Ann **6**: 119-123.

Hauge M, Jespersgaard C, Poulsen K, Kilian M (1996) Population structure of *Streptococcus agalactiae* reveals an association between specific evolutionary lineages and putative virulence factors but not disease. Infect. Immun **64**: 919-925.

Helmig R, Uldbjerg N, Boris J, Kilian M (1993) Clonal analysis of Streptococcus agalactiae isolated from infants with neonatal sepsis or meningitis and their mothers and from healthy pregnant women. J. Infect. Dis **168**: 904-909.

Henneke P, Berner R (2006) Interaction of neonatal phagocytes with Group B Streptococcus: recognition and response. Infect. Immun **74**: 3085-3095.

Hensler ME, Liu GY, Sobczak S, Benirschke K, Nizet V, et al. (2005) Virulence role of Group B Streptococcus beta-hemolysin/cytolysin in a neonatal rabbit model of early-onset pulmonary infection. J. Infect. Dis **191**: 1287-1291.

Herbert MA, Beveridge CJE, McCormick D, Aten E, Jones N, et al. (2005) Genetic islands of *Streptococcus agalactiae* strains NEM316 and 2603VR and their presence in other Group B streptococcal strains. BMC Microbiol **5**: 31.

Héry-Arnaud G, Bruant G, Lanotte P, Brun S, Rosenau A, et al. (2005) Acquisition of insertion sequences and the GBSi1 intron by *Streptococcus agalactiae* isolates correlates with the evolution of the species. J. Bacteriol **187**: 6248-6252.

Héry-Arnaud G, Bruant G, Lanotte P, Brun S, Picard B, et al. (2007) Mobile genetic elements provide evidence for a bovine origin of clonal complex 17 of *Streptococcus agalactiae*. Appl. Environ. Microbiol **73**: 4668-4672.

Hillerton JE, Berry EA (2003) The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract **19**: 157-169.

Hindré T, Brüggemann H, Buchrieser C, Héchard Y (2008) Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. Microbiology **154**: 30-41.

Hood M, Janney A, Dameron G (1961) Beta hemolytic Streptococcus Group B associated with problems of the perinatal period. Am. J. Obstet. Gynecol **82**: 809-818.

Horaud T, de Céspèdes G, Trieu-Cuot P (1996) Chromosomal gentamicin resistance transposon Tn*3706* in *Streptococcus agalactiae* B128. Antimicrob. Agents Chemother **40**: 1085-1090.

Hughes MJG, Moore JC, Lane JD, Wilson R, Pribul PK, et al. (2002) Identification of major outer surface proteins of *Streptococcus agalactiae*. Infect. Immun **70**: 1254-1259.

Islam AK, Thomas E (1980) Faecal carriage of Group B streptococci. J. Clin. Pathol **33**: 1006-1008.

Jackson LA, Hilsdon R, Farley MM, Harrison LH, Reingold AL, et al. (1995) Risk factors for Group B streptococcal disease in adults. Ann. Intern. Med **123**: 415-420.

Jacobsson K (2003) A novel family of fibrinogen-binding proteins in *Streptococcus agalactiae.* Vet. Microbiol **96**: 103-113.

Jain NC (1979) Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. J. Dairy Sci **62**: 128-134.

Janzon L, Arvidson S (1990) The role of the delta-lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. EMBO J **9**: 1391-1399.

Jelínková J, Motlová J (1985) Worldwide distribution of two new serotypes of Group B streptococci: type IV and provisional type V. J. Clin. Microbiol **21**: 361-362.

Jensen NE (1979) Production and evaluation of antisera for serological type determination of Group-B streptococci by double diffusion in agarose gel. Acta Pathol Microbiol Scand B **87**: 77-83.

Jerlström PG, Chhatwal GS, Timmis KN (1991) The IgA-binding beta antigen of the C protein complex of Group B streptococci: sequence determination of its gene and detection of two binding regions. Mol. Microbiol **5**: 843-849.

Jerlström PG, Talay SR, Valentin-Weigand P, Timmis KN, Chhatwal GS (1996) Identification of an immunoglobulin A binding motif located in the beta-antigen of the C protein complex of Group B streptococci. Infect. Immun **64**: 2787-2793.

Jiang S, Ishmael N, Hotopp JD, Puliti M, Tissi L, et al. (2008) Variation in the Group B Streptococcus CsrRS regulon and effects on pathogenicity. J. Bacteriol **190**: 1956-1965.

Johri AK, Paoletti LC, Glaser P, Dua M, Sharma PK, et al. (2006) Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. Nat. Rev. Microbiol **4**: 932-942.

Johri AK, Margarit I, Broenstrup M, Brettoni C, Hua L, et al. (2007) Transcriptional and proteomic profiles of group B *Streptococcus* type V reveal potential adherence proteins associated with high-level invasion. Infect. Immun **75**: 1473-1483.

Jones N, Bohnsack JF, Takahashi S, Oliver KA, Chan M, et al. (2003) Multilocus sequence typing system for Group B streptococcus. J. Clin. Microbiol **41**: 2530-2536.

Jones N, Oliver KA, Barry J, Harding RM, Bisharat N, et al. (2006) Enhanced invasiveness of bovine-derived neonatal sequence type 17 Group B streptococcus is independent of capsular serotype. Clin. Infect. Dis **42**: 915-924.

Jonsson I, Pietrocola G, Speziale P, Verdrengh M, Tarkowski A (2005) Role of fibrinogen-binding adhesin expression in septic arthritis and septicemia caused by *Streptococcus agalactiae*. J. Infect. Dis **192**: 1456-1464.

Jourdan-da Silva N, Antona Six C, Georges S, Goulet V, Judlin P, et al. (2008) Infections néonatales à Streptocoque B en France: données d'incidence de 1997 à 2006 et pratiques de préventions en maternité. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire **14-15**: 110-114.

Jürgens D, Sterzik B, Fehrenbach FJ (1987) Unspecific binding of Group B streptococcal cocytolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. J. Exp. Med **165**: 720-732.

Källman J, Schollin J, Schalèn C, Erlandsson A, Kihlström E (1998) Impaired phagocytosis and opsonisation towards Group B streptococci in preterm neonates. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed **78**: F46-50.

Kaye D (2001) Gram-negative sepsis in neonates may be rising since start of GBS prophylaxis. Clin. Infect. Dis **32**: i-ii.

Keefe GP (1997) *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. Can. Vet. J **38**: 429-437.

Keefe GP, Dohoo IR, Spangler E (1997) Herd prevalence and incidence of *Streptococcus agalactiae* in the dairy industry of Prince Edward Island. J. Dairy Sci **80**: 464-470.

Ki M, Marrs CF, Kugeler KJ, Borchardt SM, Baker CJ, et al. (2006) The frequency of genes encoding three putative Group B streptococcal virulence factors among invasive and colonizing isolates. BMC Infect. Dis **6**: 116.

Kiss J, Szabó M, Olasz F (2003) Site-specific recombination by the DDE family member mobile element IS*30* transposase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **100**: 15000-15005.

Kling DE, Madoff LC, Michel JL (1999) Subcellular fractionation of Group B Streptococcus. BioTechniques **27**: 24-26, 28.

Konto-Ghiorghi Y, Mairey E, Mallet A, Duménil G, Caliot E, et al. (2009) Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. PLoS Pathog **5**: e1000422.

Kreikemeyer B, McIver KS, Podbielski A (2003) Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. Trends Microbiol **11**: 224-232.

Krohn MA, Hillier SL, Baker CJ (1999) Maternal peripartum complications associated with vaginal Group B streptococci colonization. J. Infect. Dis **179**: 1410-1415.

Lachenauer CS, Kasper DL, Shimada J, Ichiman Y, Ohtsuka H, et al. (1999) Serotypes VI and VIII predominate among Group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. J. Infect. Dis **179**: 1030-1033.

Lalioui L, Pellegrini E, Dramsi S, Baptista M, Bourgeois N, et al. (2005) The SrtA Sortase of *Streptococcus agalactiae* is required for cell wall anchoring of proteins containing the LPXTG motif, for adhesion to epithelial cells, and for colonization of the mouse intestine. Infect. Immun **73**: 3342-3350.

Lämmler C, Abdulmawjood A, Weiss R (1998) Properties of serological Group B streptococci of dog, cat and monkey origin. Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B **45**: 561-566.

Lamy M, Zouine M, Fert J, Vergassola M, Couve E, et al. (2004) CovS/CovR of Group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence. Mol. Microbiol **54**: 1250-1268.

Lamy M, Dramsi S, Billoët A, Réglier-Poupet H, Tazi A, et al. (2006) Rapid detection of the "highly virulent" Group B Streptococcus ST-17 clone. Microbes Infect **8**: 1714-1722.

Lancefield RC, Freimer EH (1966) Type-specific polysaccharide antigens of Group B streptococci. J Hyg (Lond) **64**: 191-203.

Lang S, Palmer M (2003) Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. J. Biol. Chem **278**: 38167-38173.

Larsson C, Stålhammar-Carlemalm M, Lindahl G (1996) Experimental vaccination against Group B Streptococcus, an encapsulated bacterium, with highly purified preparations of cell surface proteins Rib and alpha. Infect. Immun **64**: 3518-3523.

Larsson C, Stålhammar-Carlemalm M, Lindahl G (1999) Protection against experimental infection with Group B Streptococcus by immunization with a

bivalent protein vaccine. Vaccine **17**: 454-458.

Lauer P, Rinaudo CD, Soriani M, Margarit I, Maione D, et al. (2005) Genome analysis reveals pili in Group B Streptococcus. Science **309**: 105.

Lejeune C, Floch-Tudal C, Montamat S, Jaby-Sergent MP (1999) Conduite à tenir face à une colonisation materno-infantile à streptocoque du groupe B. Méd Thérapeutique Péd **2**: 47-54.

Levin JC, Wessels MR (1998) Identification of *csrR/csrS*, a genetic locus that regulates hyaluronic acid capsule synthesis in Group A Streptococcus. Mol. Microbiol **30**: 209-219.

Li S, Arvidson S, Möllby R (1997a) Variation in the *agr*-dependent expression of alpha-toxin and protein A among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from patients with septicaemia. FEMS Microbiol. Lett **152**: 155-161.

Li J, Kasper DL, Ausubel FM, Rosner B, Michel JL (1997b) Inactivation of the alpha C protein antigen gene, *bca*, by a novel shuttle/suicide vector results in attenuation of virulence and immunity in Group B Streptococcus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **94**: 13251-13256.

Lin B, Hollingshead SK, Coligan JE, Egan ML, Baker JR, et al. (1994) Cloning and expression of the gene for Group B streptococcal hyaluronate lyase. J. Biol. Chem **269**: 30113-30116.

Lin FY, Azimi PH, Weisman LE, Philips JB, Regan J, et al. (2000) Antibiotic susceptibility profiles for Group B streptococci isolated from neonates, 1995-1998. Clin. Infect. Dis **31**: 76-79.

Lin FY, Philips JB, Azimi PH, Weisman LE, Clark P, et al. (2001) Level of maternal antibody required to protect neonates against early-onset disease caused by Group B Streptococcus type Ia: a multicenter, seroepidemiology study. J. Infect. Dis **184**: 1022-1028.

Lin FC, Weisman LE, Azimi PH, Philips JB, Clark P, et al. (2004) Level of maternal IgG anti-Group B streptococcus type III antibody correlated with protection of neonates against early-onset disease caused by this pathogen. J. Infect. Dis **190**: 928-934.

Lin FC, Whiting A, Adderson E, Takahashi S, Dunn DM, et al. (2006) Phylogenetic lineages of invasive and colonizing strains of serotype III Group B Streptococci from neonates: a multicenter prospective study. J. Clin. Microbiol **44**: 1257-1261.

Lin W, Walthers D, Connelly JE, Burnside K, Jewell KA, et al. (2009) Threonine phosphorylation prevents promoter DNA binding of the Group B Streptococcus response regulator CovR. Mol. Microbiol **71**: 1477-1495.

Liu GY, Doran KS, Lawrence T, Turkson N, Puliti M, et al. (2004) Sword and shield: linked Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **101**: 14491-14496.

López de Felipe F, Magni C, de Mendoza D, López P (1996) Transcriptional activation of the citrate permease P gene of *Lactococcus lactis biovar diacetylactis* by an insertion sequence-like element present in plasmid pCIT264. Mol. Gen. Genet **250**: 428-436.

Luan S, Granlund M, Norgren M (2003) An inserted DNA fragment with plasmid features is uniquely associated with the presence of the GBSi1 group II intron in *Streptococcus agalactiae*. Gene **312**: 305-312.

Luan S, Granlund M, Sellin M, Lagergård T, Spratt BG, et al. (2005) Multilocus sequence typing of Swedish invasive Group B Streptococcus isolates indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching. J. Clin. Microbiol **43**: 3727-3733.

Madoff LC, Hori S, Michel JL, Baker CJ, Kasper DL (1991) Phenotypic diversity in the alpha C protein of Group B streptococci. Infect. Immun **59**: 2638-2644.

Madoff LC, Michel JL, Gong EW, Kling DE, Kasper DL (1996) Group B streptococci escape host immunity by deletion of tandem repeat elements of the alpha C protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **93**: 4131-4136.

Madureira P, Baptista M, Vieira M, Magalhães V, Camelo A, et al. (2007) *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein. J. Immunol **178**: 1379-1387.

Mahillon J, Chandler M (1998) Insertion sequences. Microbiol. Mol. Biol. Rev **62**: 725-774.

Mahillon J, Léonard C, Chandler M (1999) IS elements as constituents of bacterial genomes. Res. Microbiol **150**: 675-687.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, et al. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **95**: 3140-3145.

Maione D, Margarit I, Rinaudo CD, Masignani V, Mora M, et al. (2005) Identification of a universal Group B streptococcus vaccine by multiple genome screen. Science **309**: 148-150.

Maisey HC, Hensler M, Nizet V, Doran KS (2007) Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. J. Bacteriol **189**: 1464-1467.

Maisey HC, Doran KS, Nizet V (2008a) Recent advances in understanding the molecular basis of Group B Streptococcus virulence. Expert Rev Mol Med **10**: e27.

Maisey HC, Quach D, Hensler ME, Liu GY, Gallo RL, et al. (2008b) A group B streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence. FASEB J **22**: 1715-1724

Manning SD, Neighbors K, Tallman PA, Gillespie B, Marrs CF, et al. (2004) Prevalence of Group B Streptococcus colonization and potential for transmission by casual contact in healthy young men and women. Clin. Infect. Dis **39**: 380-388.

Manning SD, Ki M, Marrs CF, Kugeler KJ, Borchardt SM, et al. (2006) The frequency of genes encoding three putative Group B streptococcal virulence factors among invasive and colonizing isolates. BMC Infect. Dis **6**: 116.

Manning SD, Lewis MA, Springman AC, Lehotzky E, Whittam TS, et al. (2008) Genotypic diversity and serotype distribution of group B streptococcus isolated from women before and after delivery. Clin. Infect. Dis **46**: 1829-1837.

Manning SD, Springman AC, Lehotzky E, Lewis MA, Whittam TS, et al. (2009) Multilocus sequence types associated with neonatal Group B streptococcal sepsis and meningitis in Canada. J. Clin. Microbiol **47**: 1143-1148.

Marchaim D, Efrati S, Melamed R, Gortzak-Uzan L, Riesenberg K, et al. (2006) Clonal variability of Group B Streptococcus among different groups of carriers in southern Israel. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis **25**: 443-448.

Margarit I, Rinaudo CD, Galeotti CL, Maione D, Ghezzo C, et al. (2009) Preventing bacterial infections with pilus-based vaccines: the Group B Streptococcus paradigm. J. Infect. Dis **199**: 108-115.

Maródi L, Leijh PC, van Furth R (1984) Characteristics and functional capacities of human cord blood granulocytes and monocytes. Pediatr. Res **18**: 1127-1131.

Marques MB, Kasper DL, Pangburn MK, Wessels MR (1992) Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III Group B streptococci. Infect. Immun **60**: 3986-3993.

Martin TR, Ruzinski JT, Rubens CE, Chi EY, Wilson CB (1992) The effect of type-specific polysaccharide capsule on the clearance of Group B streptococci from the lungs of infant and adult rats. J. Infect. Dis **165**: 306-314.

Martins ER, Pessanha MA, Ramirez M, Melo-Cristino J (2007) Analysis of Group B streptococcal isolates from infants and pregnant women in Portugal revealing two lineages with enhanced invasiveness. J. Clin. Microbiol **45**: 3224-3229.

McIver KS, Myles RL (2002) Two DNA-binding domains of Mga are required for

virulence gene activation in the Group A Streptococcus. Mol. Microbiol **43**: 1591-1601.

Mello LV, De Groot BL, Li S, Jedrzejas MJ (2002) Structure and flexibility of *Streptococcus agalactiae* hyaluronate lyase complex with its substrate. Insights into the mechanism of processive degradation of hyaluronan. J. Biol. Chem **277**: 36678-36688.

Mereghetti L, Sitkiewicz I, Green NM, Musser JM (2008a) Extensive adaptive changes occur in the transcriptome of *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus) in response to incubation with human blood. PLoS ONE **3**: e3143.

Mereghetti L, Sitkiewicz I, Green NM, Musser JM (2008b) Remodeling of the *Streptococcus agalactiae* transcriptome in response to growth temperature. PLoS ONE **3**: e2785.

Meyn LA, Krohn MA, Hillier SL (2009) Rectal colonization by Group B Streptococcus as a predictor of vaginal colonization. Am. J. Obstet. Gynecol **201**: 76-77.

Michel F, Ferat JL (1995) Structure and activities of group II introns. Annu. Rev. Biochem **64**: 435-461.

Michel JL, Madoff LC, Kling DE, Kasper DL, Ausubel FM (1991) Cloned alpha and beta C-protein antigens of Group B streptococci elicit protective immunity. Infect. Immun **59**: 2023-2028.

Michel JL, Madoff LC, Olson K, Kling DE, Kasper DL, et al. (1992) Large, identical, tandem repeating units in the C protein alpha antigen gene, *bca*, of Group B streptococci. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **89**: 10060-10064.

Mistou M, Dramsi S, Brega S, Poyart C, Trieu-Cuot P (2009) Molecular dissection of the *secA2* locus of Group B Streptococcus reveals that glycosylation of the Srr1 LPXTG protein is required for full virulence. J. Bacteriol **191**: 4195-4206.

Moreillon P (1999) Endocarditis and endarteritis. In: Armstrong D, Cohen J, editors. Infectious Diseases Mosby. London : Harcourt Publishers Ltd. pp 501-5010.

Morfeldt E, Tegmark K, Arvidson S (1996) Transcriptional control of the *agr*-dependent virulence gene regulator, RNAIII, in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol **21**: 1227-1237.

Motlová J, Wagner M, Jelínková J (1986) A search for new Group-B streptococcal serotypes. J. Med. Microbiol **22**: 101-105.

Moyo SR, Maeland JA, Bergh K (2002) Typing of human isolates of

*Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus, GBS) strains from Zimbabwe. J. Med. Microbiol **51**: 595-600.

Murayama SY, Seki C, Sakata H, Sunaoshi K, Nakayama E, et al. (2009) Capsular type and antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* isolates from patients, ranging from newborns to the elderly, with invasive infections. Antimicrob. Agents Chemother **53**: 2650-2653.

Musser JM, Mattingly SJ, Quentin R, Goudeau A, Selander RK (1989) Identification of a high-virulence clone of type III *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus) causing invasive neonatal disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **86**: 4731-4735.

Naeye RL, Peters EC (1978) Amniotic fluid infections with intact membranes leading to perinatal death: a prospective study. Pediatrics **61**: 171-177.

Nagano Y, Nagano N, Takahashi S, Murono K, Fujita K, et al. (1991) Restriction endonuclease digest patterns of chromosomal DNA from Group B beta-haemolytic streptococci. J. Med. Microbiol **35**: 297-303.

Nagano N, Nagano Y, Nakano R, Okamoto R, Inoue M (2006) Genetic diversity of the C protein beta-antigen gene and its upstream regions within clonally related groups of type Ia and Ib Group B streptococci. Microbiology .**152**: 771-778.

Nicoloff H, Bringel F (2003) IS*Lpl1* is a functional IS*30*-related insertion element in *Lactobacillus plantarum* that is also found in other lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol **69**: 6032-6040.

Nizet V, Gallo RL (2003) Cathelicidins and innate defense against invasive bacterial infection. Scand. J. Infect. Dis **35**: 670-676.

Nizet V, Gibson RL, Chi EY, Framson PE, Hulse M, et al. (1996) Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. Infect. Immun **64**: 3818-3826.

Nizet V, Gibson RL, Rubens CE (1997) The role of Group B streptococci beta-hemolysin expression in newborn lung injury. Adv. Exp. Med. Biol **418**: 627-630.

Nobbs AH, Rosini R, Rinaudo CD, Maione D, Grandi G, et al. (2008) Sortase A utilizes an ancillary protein anchor for efficient cell wall anchoring of pili in *Streptococcus agalactiae*. Infect. Immun **76**: 3550-3560.

Nocard E, Mollereau R (1887) Sur une mammite contagieuse des vaches laitières. Ann Inst Pasteur **1**: 109-126.

Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, et al. (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. EMBO J **12**: 3967-3975.

Ochman H, Selander RK (1984) Evidence for clonal population structure in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **81**: 198-201.

Ogura M, Tsukahara K, Tanaka T (2010) Identification of the sequences recognized by the *Bacillus subtilis* response regulator YclJ. Arch. Microbiol **192**: 569-580.

Oliveira ICM, de Mattos MC, Pinto TA, Ferreira-Carvalho BT, Benchetrit LC, et al. (2006) Genetic relatedness between Group B streptococci originating from bovine mastitis and a human Group B Streptococcus type V cluster displaying an identical pulsed-field gel electrophoresis pattern. Clin. Microbiol. Infect **12**: 887-893.

Olliver A, Vallé M, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A (2005) Overexpression of the multidrug efflux operon *acrEF* by insertional activation with IS*1* or IS*10* elements in *Salmonella enterica serovar typhimurium* DT204 *acrB* mutants selected with fluoroquinolones. Antimicrob. Agents Chemother **49**: 289-301.

Paoletti LC, Kasper DL (2002) Conjugate vaccines against Group B Streptococcus types IV and VII. J. Infect. Dis **186**: 123-126.

Paoletti LC, Wessels MR, Rodewald AK, Shroff AA, Jennings HJ, et al. (1994) Neonatal mouse protection against infection with multiple Group B streptococcal (GBS) serotypes by maternal immunization with a tetravalent GBS polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. Infect. Immun **62**: 3236-3243.

Paterson GK, Blue CE, Mitchell TJ (2006) Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. J. Med. Microbiol **55**: 355-363.

Pavlovic G, Burrus V, Gintz B, Decaris B, Guédon G (2004) Evolution of genomic islands by deletion and tandem accretion by site-specific recombination: ICESt1-related elements from *Streptococcus thermophilus*. Microbiology **150**: 759-774.

Pelkonen T, Roine I, Monteiro L, Correia M, Pitkäranta A, et al. (2009) Risk factors for death and severe neurological sequelae in childhood bacterial meningitis in sub-Saharan Africa. Clin. Infect. Dis **48**: 1107-1110.

Pereira UP, Mian GF, Oliveira ICM, Benchetrit LC, Costa GM, et al. (2010) Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in *Nile tilapia*. Vet. Microbiol **140**: 186-192.

Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, et al. (2008) Epidemiology of invasive Group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. JAMA **299**: 2056-2065.

Pierno M, Maravigna L, Piazza R, Visai L, Speziale P (2006) FbsA-driven fibrinogen polymerization: a bacterial "deceiving strategy". Phys. Rev. Lett **96**:

028108.

Pietrocola G, Schubert A, Visai L, Torti M, Fitzgerald JR, et al. (2005) FbsA, a fibrinogen-binding protein from *Streptococcus agalactiae*, mediates platelet aggregation. Blood **105**: 1052-1059.

Poyart C, Trieu-Cuot P (1997) A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to beta-galactosidase in Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Lett **156**: 193-198

Poyart C, Trieu-Cuot P (1999) Physiopathologie des infections néonatales à *Streptococcus agalactiae*. Médecine thérapeutique/Pédiatrie **2**: 27-31.

Poyart C, Pellegrini E, Gaillot O, Boumaila C, Baptista M, et al. (2001a) Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. Infect. Immun **69**: 5098-5106.

Poyart C, Lamy MC, Boumaila C, Fiedler F, Trieu-Cuot P (2001b) Regulation of D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis in *Streptococcus agalactiae* involves a novel two-component regulatory system. J. Bacteriol **183**: 6324-6334.

Poyart C, Jardy L, Quesne G, Berche P, Trieu-Cuot P (2003a) Genetic basis of antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* strains isolated in a French hospital. Antimicrob. Agents Chemother **47**: 794-797.

Poyart C, Pellegrini E, Marceau M, Baptista M, Jaubert F, et al. (2003b) Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. Mol. Microbiol **49**: 1615-1625.

Poyart C, Réglier-Poupet H, Tazi A, Billoët A, Dmytruk N, et al. (2008) Invasive Group B streptococcal infections in infants, France. Emerging Infect. Dis **14**: 1647-1649.

Pritzlaff CA, Chang JC, Kuo SP, Tamura GS, Rubens CE, et al. (2001) Genetic basis for the beta-haemolytic/cytolytic activity of Group B Streptococcus. Mol. Microbiol **39**: 236-247.

Puliti M, Nizet V, von Hunolstein C, Bistoni F, Mosci P, et al. (2000) Severity of Group B streptococcal arthritis is correlated with beta-hemolysin expression. J. Infect. Dis **182**: 824-832.

Puopolo KM, Madoff LC, Eichenwald EC (2005) Early-onset Group B streptococcal disease in the era of maternal screening. Pediatrics **115**: 1240-1246.

Puopolo KM, Klinzing DC, Lin MP, Yesucevitz DL, Cieslewicz MJ (2007) A composite transposon associated with erythromycin and clindamycin resistance in Group B Streptococcus. J. Med. Microbiol **56**: 947-955.

Quach D, van Sorge NM, Kristian SA, Bryan JD, Shelver DW, et al. (2009) The CiaR response regulator in Group B Streptococcus promotes intracellular survival and resistance to innate immune defenses. J. Bacteriol **191**: 2023-2032.

Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach TL, Khan BA, et al. (2008) RNAIII-independent target gene control by the *agr* quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in Staphylococcus aureus. Mol. Cell **32**: 150-158.

Quentin R, Huet H, Wang FS, Geslin P, Goudeau A, et al. (1995) Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by multilocus enzyme genotype and serotype: identification of multiple virulent clone families that cause invasive neonatal disease. J. Clin. Microbiol **33**: 2576-2581.

Quentin R, Morange-Saussier V, Watt S (2002) Obstetrical management of *Streptococcus agalactiae*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **31**: 4S65-64S73.

Rajagopal L, Clancy A, Rubens CE (2003) A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. J. Biol. Chem **278**: 14429-14441.

Rajagopal L, Vo A, Silvestroni A, Rubens CE (2005) Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic-type kinase in *Streptococcus agalactiae*. Mol. Microbiol **56**: 1329-1346.

Rajagopal L, Vo A, Silvestroni A, Rubens CE (2006) Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signalling mechanisms in *Streptococcus agalactiae*. Mol. Microbiol **62**: 941-957.

Rajagopal L (2009) Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. Future Microbiol **4**: 201-221.

Ramaswamy SV, Ferrieri P, Flores AE, Paoletti LC (2006) Molecular characterization of nontypeable Group B Streptococcus. J. Clin. Microbiol **44**: 2398-2403.

Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A, et al. (1986) Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. Mol. Gen. Genet **202**: 58-61.

Reimmann C, Haas D (1990) The *istA* gene of insertion sequence IS*21* is essential for cleavage at the inner 3' ends of tandemly repeated IS*21* elements in *vitro*. EMBO J **9**: 4055-4063.

Rinaudo CD, Rosini R, Galeotti CL, Berti F, Necchi F, et al. (2010) Specific

involvement of pilus type 2a in biofilm formation in Group B Streptococcus. PLoS ONE **5**: e9216.

Rivera J, Vannakambadi G, Höök M, Speziale P (2007) Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. Thromb. Haemost **98**: 503-511.

Roberts AP, Chandler M, Courvalin P, Guédon G, Mullany P, et al. (2008) Revised nomenclature for transposable genetic elements. Plasmid **60**: 167-173.

Rogers MB, Bennett TK, Payne CM, Smith CJ (1994) Insertional activation of *cepA* leads to high-level beta-lactamase expression in *Bacteroides fragilis* clinical isolates. J. Bacteriol **176**: 4376-4384.

Rolland K, Marois C, Siquier V, Cattier B, Quentin R (1999) Genetic features of *Streptococcus agalactiae* strains causing severe neonatal infections, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis and *hylB* gene analysis. J. Clin. Microbiol **37**: 1892-1898.

Rosenau A, Martins K, Amor S, Gannier F, Lanotte P, et al. (2007) Evaluation of the ability of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from genital and neonatal specimens to bind to human fibrinogen and correlation with characteristics of the *fbsA* and *fbsB* genes. Infect. Immun **75**: 1310-1317.

Rosini R, Rinaudo CD, Soriani M, Lauer P, Mora M, et al. (2006) Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae*. Mol. Microbiol **61**: 126-141.

Rubens CE, Heggen LM, Kuypers JM (1989) IS*861*, a Group B streptococcal insertion sequence related to IS*150* and IS*3* of *Escherichia coli*. J. Bacteriol **171**: 5531-5535.

Rýc M, Jelínková J, Motlová J, Wagner M (1988) Immuno-electronmicroscopic demonstration of capsules on Group-B streptococci of new serotypes and type candidates. J. Med. Microbiol **25**: 147-149.

Salloum M, van der Mee-Marquet N, Domelier A, Arnault L, Quentin R (2010) Molecular characterization and prophage DNA contents of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from adult skin and osteoarticular infections. J. Clin. Microbiol **48**: 1261-1269.

Salyers AA, Shoemaker NB, Li LY (1995a) In the driver's seat: the Bacteroides conjugative transposons and the elements they mobilize. J. Bacteriol **177**: 5727-5731.

Salyers AA, Shoemaker NB, Stevens AM, Li LY (1995b) Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. Microbiol. Rev **59**: 579-590.

Samen UM, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ (2006) The transcriptional regulator

RovS controls the attachment of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells and the expression of virulence genes. Infect. Immun **74**: 5625-5635.

Samen U, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ, Borges F (2007) The surface protein Srr-1 of *Streptococcus agalactiae* binds human keratin 4 and promotes adherence to epithelial HEp-2 cells. Infect. Immun **75**: 5405-5414.

Santi I, Scarselli M, Mariani M, Pezzicoli A, Masignani V, et al. (2007) BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to Group B Streptococcus survival in human blood. Mol. Microbiol **63**: 754-767.

Santi I, Maione D, Galeotti CL, Grandi G, Telford JL, et al. (2009) BibA induces opsonizing antibodies conferring in vivo protection against group B Streptococcus. J. Infect. Dis **200**: 564-570.

Schell MA (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. Annu. Rev. Microbiol **47**: 597-626.

Schmidt H, Hensel M (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev **17**: 14-56.

Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A (2002) Prevention of perinatal Group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. MMWR Recomm Rep **51**: 1-22.

Schubert A, Zakikhany K, Schreiner M, Frank R, Spellerberg B, et al. (2002) A fibrinogen receptor from Group B Streptococcus interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. Mol. Microbiol **46**: 557-569.

Schubert A, Zakikhany K, Pietrocola G, Meinke A, Speziale P, et al. (2004) The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. Infect. Immun **72**: 6197-6205.

Schuchat A (1995) Group B streptococcal disease in newborns: a global perspective on prevention. Biomed. Pharmacother **49**: 19-25.

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

Schuchat A (2001) Group B streptococcal disease: from trials and tribulations to triumph and trepidation. Clin. Infect. Dis **33**: 751-756.

Schwartz DC, Cantor CR (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell **37**: 67-75.

Seepersaud R, Hanniffy SB, Mayne P, Sizer P, Le Page R, et al. (2005) Characterization of a novel leucine-rich repeat protein antigen from Group B streptococci that elicits protective immunity. Infect. Immun **73**: 1671-1683.

Seifert KN, Adderson EE, Whiting AA, Bohnsack JF, Crowley PJ, et al. (2006) A unique serine-rich repeat protein (Srr-2) and novel surface antigen (epsilon) associated with a virulent lineage of serotype III *Streptococcus agalactiae*. Microbiology **152**: 1029-1040.

Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, et al. (1986) Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl. Environ. Microbiol **51**: 873-884.

Sellin M, Olofsson C, Håkansson S, Norgren M (2000) Genotyping of the capsule gene cluster (*cps*) in nontypeable Group B streptococci reveals two major cps allelic variants of serotypes III and VII. J. Clin. Microbiol **38**: 3420-3428.

Severi E, Hood DW, Thomas GH (2007) Sialic acid utilization by bacterial pathogens. Microbiology **153**: 2817-2822.

Shelver D, Rajagopal L, Harris TO, Rubens CE (2003) MtaR, a regulator of methionine transport, is critical for survival of Group B Streptococcus in vivo. J. Bacteriol **185**: 6592-6599.

Shet A, Ferrieri P (2004) Neonatal & maternal Group B streptococcal infections: a comprehensive review. Indian J. Med. Res **120**: 141-150.

Skalka B, Smola J (1981) Lethal effect of CAMP-factor and UBERIS-factor--a new finding about diffusible exosubstances of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis*. Zentralbl Bakteriol A **249**: 190-194.

Skoff TH, Farley MM, Petit S, Craig AS, Schaffner W, et al. (2009) Increasing burden of invasive Group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. Clin. Infect. Dis **49**: 85-92.

Slotved H, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL (2007) Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. J. Clin. Microbiol **45**: 2929-2936.

Spellerberg B, Rozdzinski E, Martin S, Weber-Heynemann J, Schnitzler N, et al. (1999a) Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. Infect. Immun **67**: 871-878.

Spellerberg B, Pohl B, Haase G, Martin S, Weber-Heynemann J, et al. (1999b) Identification of genetic determinants for the hemolytic activity of *Streptococcus agalactiae* by IS*S1* transposition. J. Bacteriol **181**: 3212-3219.

Spellerberg B, Martin S, Franken C, Berner R, Lütticken R (2000) Identification of a novel insertion sequence element in *Streptococcus agalactiae*. Gene **241**: 51-56.

Spellerberg B, Rozdzinski E, Martin S, Weber-Heynemann J, Lütticken R (2002) *rgf* encodes a novel two-component signal transduction system of *Streptococcus agalactiae*. Infect. Immun **70**: 2434-2440.

Springman AC, Lacher DW, Wu G, Milton N, Whittam TS, et al. (2009) Selection, recombination, and virulence gene diversity among Group B streptococcal genotypes. J. Bacteriol **191**: 5419-5427.

Stålhammar-Carlemalm M, Stenberg L, Lindahl G (1993) Protein rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. J. Exp. Med **177**: 1593-1603.

Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, et al. (2002) Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. N. Engl. J. Med **347**: 240-247.

Stringer J (1980) The development of a phage-typing system for Group-B streptococci. J. Med. Microbiol **13**: 133-143.

Takahashi S, Adderson EE, Nagano Y, Nagano N, Briesacher MR, et al. (1998) Identification of a highly encapsulated, genetically related group of invasive type III Group B streptococci. J. Infect. Dis **177**: 1116-1119.

Takahashi S, Detrick S, Whiting AA, Blaschke-Bonkowksy AJ, Aoyagi Y, et al. (2002) Correlation of phylogenetic lineages of Group B Streptococci, identified by analysis of restriction-digestion patterns of genomic DNA, with *infB* alleles and mobile genetic elements. J. Infect. Dis **186**: 1034-1038.

Tamura GS, Herndon M, Przekwas J, Rubens CE, Ferrieri P, et al. (2000) Analysis of restriction fragment length polymorphisms of the insertion sequence IS*1381* in Group B Streptococci. J. Infect. Dis **181**: 364-368.

Tamura GS, Hull JR, Oberg MD, Castner DG (2006) High-affinity interaction between fibronectin and the Group B streptococcal C5a peptidase is unaffected by a naturally occurring four-amino-acid deletion that eliminates peptidase activity. Infect. Immun **74**: 5739-5746.

Tazi A, Disson O, Bellais S, Bouaboud A, Dmytruk N, et al. (2010) The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates. J Exp Med DOI: 10.1084/jem.20092594

Tenenbaum T, Bloier C, Adam R, Reinscheid DJ, Schroten H (2005) Adherence to and invasion of human brain microvascular endothelial cells are promoted by fibrinogen-binding protein FbsA of *Streptococcus agalactiae*. Infect. Immun **73**: 4404-4409.

Tenenbaum T, Spellerberg B, Adam R, Vogel M, Kim KS, et al. (2007) *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial

cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. Microbes Infect **9**: 714-720.

Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, et al. (1994) Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol **32**: 407-415.

Terao Y, Kawabata S, Kunitomo E, Nakagawa I, Hamada S (2001) Novel laminin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* Lbp is involved in adhesion to epithelial cells. Infect Immun **70**: 993-997.

Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Eisen JA, Peterson S, et al. (2002) Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **99**: 12391-12396.

Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, et al. (2005) Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **102**: 13950-13955.

Thong K, Ling GY, Kong LW, Theam LC, Ngeow YF (2004) Macrorestriction analysis of *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus) isolates from Malaysia. J. Med. Microbiol **53**: 991-997.

Treviño J, Perez N, Ramirez-Peña E, Liu Z, Shelburne SA, et al. (2009) CovS simultaneously activates and inhibits the CovR-mediated repression of distinct subsets of Group A Streptococcus virulence factor-encoding genes. Infect. Immun **77**: 3141-3149.

Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, Ghigo J, Amorena B, et al. (2003) SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol **48**: 1075-1087.

Vallejo JG, Baker CJ, Edwards MS (1994) Demonstration of circulating Group B streptococcal immune complexes in neonates with meningitis. J. Clin. Microbiol **32**: 2041-2045.

van Belkum A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M (2001) Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. Clin. Microbiol. Rev **14**: 547-560.

van der Mee-Marquet N, Fourny L, Arnault L, Domelier A, Salloum M, et al. (2008) Molecular characterization of human-colonizing *Streptococcus agalactiae* strains isolated from throat, skin, anal margin, and genital body sites. J. Clin. Microbiol **46**: 2906-2911.

van der Mee-Marquet N, Jouannet C, Domelier A, Arnault L, Lartigue M, et al. (2009) Genetic diversity of *Streptococcus agalactiae* strains and density of

vaginal carriage. J. Med. Microbiol **58**: 169-173.

van Sorge NM, Quach D, Gurney MA, Sullam PM, Nizet V, et al. (2009) The group B streptococcal serine-rich repeat 1 glycoprotein mediates penetration of the blood-brain barrier. J. Infect. Dis **199**: 1479-1487.

Voskuil MI, Chambliss GH (1998) The -16 region of *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacterial promoters. Nucleic Acids Res **26**: 3584-3590.

Wästfelt M, Stâlhammar-Carlemalm M, Delisse AM, Cabezon T, Lindahl G (1996) Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure. J. Biol. Chem **271**: 18892-18897.

Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res **18**: 7213-7218.

Wessels MR, Kasper DL (1993) The changing spectrum of Group B streptococcal disease. N. Engl. J. Med **328**: 1843-1844.

Wessels MR, Butko P, Ma M, Warren HB, Lage AL, et al. (1995) Studies of group B streptococcal infection in mice deficient in complement component C3 or C4 demonstrate an essential role for complement in both innate and acquired immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **92**: 11490-11494.

Winn HN (2007) Group B Streptococcus infection in pregnancy. Clin Perinatol **34**: 387-392.

Yilirim AO, Fink K, Lämmler C (2002) Distribution of the hyaluronate lyase encoding gene *hylB* and the insertion element IS*1548* in streptococci of serological group B isolated from animals and humans. Res Vet Sci **2**: 131-135.

Yoshida T, Qin L, Egger LA, Inouye M (2006) Transcription regulation of *ompF* and *ompC* by a single transcription factor, OmpR. J. Biol. Chem **281**: 17114-17123.

Yow MD, Leeds LJ, Thompson PK, Mason EO, Clark DJ, et al. (1980) The natural history of Group B streptococcal colonization in the pregnant woman and her offspring. I. Colonization studies. Am. J. Obstet. Gynecol **137**: 34-38.

# Publications et Communications scientifiques

## Publications

**Rim Al Safadi**, Souheila Amor, Geneviève Hery-Arnaud, Barbara Spellerberg, Philippe Lanotte, Laurent Mereghetti, François Gannier, Roland Quentin, Agnès Rosenau (2010) "Enhanced Expression of *lmb* Gene Encoding Laminin-Binding Protein in *Streptococcus agalactiae* Strains Harboring IS*1548* in *scpB-lmb* Intergenic Region'' **PLoS ONE** 5: e10794

**Rim Al Safadi**, Laurent Mereghetti, Mazen Salloum, Marie-Frédérique Lartigue, Roland Quentin, Agnès Rosenau (2010) "*fbsB* is the Major Fibrinogen-Binding Gene in the Highly Virulent Group B Streptococcus CC17 Clone, and is Activated by the Two-Component System RgfA/C''. Article soumis à **PLoS ONE** et fait l'objet d'une révision (Manuscript ID:10-PONE-RA-21557).

## Communications Affichées

**Al Safadi R**, Amor S, Hery-Arnaud G, Spellerberg B, Lanotte P, Mereghetti L,Quentin R, and Rosenau A "The insertion element IS*1548* activates the *lmb* gene transcription and expression in *Streptococcus agalactiae*". **3rd Congress of European Microbiologists, Gothenburg, Sweden June 28 - July 2, 2009.**

Rosenau A, Amor S, **AL Safadi R**, Gannier F, Lanotte P, Lartigue M.F, van der Mee-Marquet N, Mereghetti L, and Quentin R "Relationship between the binding properties to human fibrinogen of *Streptococcus agalactiae* strains and the level of transcription of *fbsA* and *fbsB* genes and *fbsA* transcriptional regulators". **XVII Lancefield International Symposium for Streptococci and Streptococcal Diseases, Porto Heli, Greece 22-26 June, 2008.**

## Communication Orale

**Al Safadi R, 2009.** "Effect of different mobile genetic elements on the expression of 2 virulence genes, *scpB* and *lmb*, in *Streptococcus agalactiae*". Présentation dans le cadre du doctorat, **au forum de l'école doctorale "Santé, Sciences, Technologies", Universite François Rabelais, Tours**.

## Publications au dehors de la thèse

**Al Safadi R**, Weiss-Gayet M, Briolay J, Aigle M (2010). "A polyploid population of *Saccharomyces cerevisiae* with separate sexes (dioecy)" **FEMS Yeast Res**. **6**:757-768.

**Al Safadi R,** Talarek N, Jacques N, Aigle M (2010) "Yeast Yeast prions: Could they be exaptations? The *URE2/[URE3]* system in *Kluyveromyces lactis*" Article accépté par **FEMS Yeast Res** (Manuscript ID: FEMSYR-10-07-0114).

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

# Enhanced Expression of *lmb* Gene Encoding Laminin-Binding Protein in *Streptococcus agalactiae* Strains Harboring IS*1548* in *scpB-lmb* Intergenic Region

**Rim Al Safadi[1], Souheila Amor[1¤], Geneviève Hery-Arnaud[1], Barbara Spellerberg[2], Philippe Lanotte[1], Laurent Mereghetti[1], François Gannier[3], Roland Quentin[1,4], Agnès Rosenau[1]***

**1** Equipe d'Accueil 3854 Bactéries et Risque Materno-Fœtal, Institut Fédératif de Recherche 136 Agents Transmissibles et Infectiologie, UFR Médecine, Université François Rabelais de Tours, Tours, France, **2** Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Ulm, Ulm, Germany, **3** Unité Mixte de Recherche CNRS FRE 3092 Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires, UFR Sciences, Université François Rabelais de Tours, Tours, France, **4** Service de Bactériologie et Hygiène Hospitalière, Hôpital Trousseau, CHRU de Tours, Tours, France

## Abstract

Group B streptococcus (GBS) is the main cause of neonatal sepsis and meningitis. Bacterial surface proteins play a major role in GBS binding to and invasion of different host surfaces. The *scpB* and *lmb* genes, coding for fibronectin-binding and laminin-binding surface proteins, are present in almost all human GBS isolates. The *scpB-lmb* intergenic region is a hot spot for integration of two mobile genetic elements (MGEs): the insertion element IS*1548* or the group II intron GBSi1. We studied the structure of *scpB-lmb* intergenic region in 111 GBS isolates belonging to the intraspecies major clonal complexes (CCs). IS*1548* was mostly found (72.2%) in CC19 serotype III strains recovered more specifically (92.3%) from neonatal meningitis. GBSi1 was principally found (70.6%) in CC17 strains, mostly (94.4%) of serotype III, but also (15.7%) in CC19 strains, mostly (87.5%) of serotype II. No MGE was found in most strains of the other CCs (76.0%), notably CC23, CC10 and CC1. Twenty-six strains representing these three genetic configurations were selected to investigate the transcription and expression levels of *scpB* and *lmb* genes. Quantitative RT-PCR showed that *lmb* transcripts were 5.0- to 9.6-fold higher in the group of strains with IS*1548* than in the other two groups of strains ($P<0.001$). Accordingly, the binding ability to laminin was 3.8- to 6.6-fold higher in these strains ($P\leq0.001$). Moreover, Lmb amount expressed on the cell surface was 2.4- to 2.7-fold greater in these strains ($P<0.001$). By contrast, *scpB* transcript levels and fibronectin binding ability were similar in the three groups of strains. Deletion of the IS*1548* sequence between *scpB* and *lmb* genes in a CC19 serotype III GBS strain substantially reduced the transcription of *lmb* gene (13.5-fold), the binding ability to laminin (6.2-fold), and the expression of Lmb protein (5.0-fold). These data highlight the importance of MGEs in bacterial virulence and demonstrate the up-regulation of *lmb* gene by IS*1548*; the increased *lmb* gene expression observed in CC19 serotype III strains with IS*1548* may play a role in their ability to cause neonatal meningitis and endocarditis.

**Citation:** Al Safadi R, Amor S, Hery-Arnaud G, Spellerberg B, Lanotte P, et al. (2010) Enhanced Expression of *lmb* Gene Encoding Laminin-Binding Protein in *Streptococcus agalactiae* Strains Harboring IS*1548* in *scpB-lmb* Intergenic Region. PLoS ONE 5(5): e10794. doi:10.1371/journal.pone.0010794

**Editor:** Frank R. DeLeo, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, United States of America

**Received** November 16, 2009; **Accepted** May 1, 2010; **Published** May 24, 2010

**Copyright:** © 2010 Al Safadi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grant no. 200700025461 from the Region Centre, France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rosenau@univ-tours.fr

¤ Current address: Equipe Télomérase, Lymphome Viro-Induit, UFR Sciences, Université François-Rabelais de Tours, Tours, France

## Introduction

*Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus [GBS]) is an important human and bovine pathogen. It is the most common agent of invasive infections in neonates, causing pneumonia, septicemia and meningitis, and is an increasingly common pathogen in adults [1,2]. GBS species has been divided into phylogenetic lineages by a variety of techniques among which multilocus sequence typing (MLST) has become the standard method [3,4,5]. The presence in GBS genome of mobile genetic elements (MGEs) suggests that horizontal genetic transfer may play an important role in genome diversification and in the emergence of virulent clones [6,7,8]. It has been demonstrated that GBS diseases are mostly caused by a limited set of clonal lineages [3,9,10,11] and that several MGEs are genetic markers for particular genetic lineages. Indeed, clonal complex (CC) 17 appears to be strongly able to invade the central nervous system (CNS) of neonates and is marked by the group II intron GBSi1, whereas CC19 causes infections among both neonates and adults and is marked by the insertion sequence IS*1548* [12,13]. This might reflect differences in a number of fitness or virulence factors including the expression of adhesins that have not been studied yet.

Genes encoding the surface proteins ScpB and Lmb are located on a composite transposon [14]. Three different structures of the *scpB-lmb* intergenic region are described (Fig. 1) since this region appears to be a hot spot for integration that may contain the two types of MGEs above-mentioned, GBSi1 or IS*1548* [13,15,16,17,18]. GBSi1 and IS*1548* are located 97-bp upstream and 9-bp upstream of the putative promoter of the *lmb* gene, respectively [17]. In addition to cleavage of the chemotactic complement component C5a, ScpB mediates GBS binding to

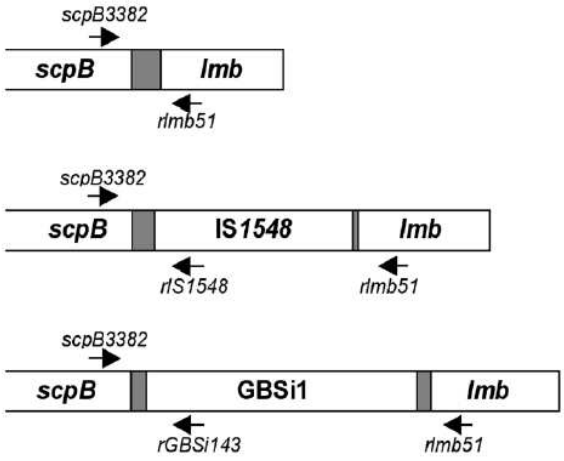



**Figure 1. Genomic organization of the *scpB-lmb* intergenic region.** Dark grey box represents the noncoding spacer region. Primer set *scpB3382/rlmb51* was used to determine the structure of the *scpB-lmb* intergenic region. The presence of the insertion sequence IS*1548* and of the group II intron GBSi1 in the spacer was then confirmed using primer sets *scpB3382/r1S1548*, and *scpB3382/rGBSi143*.
doi:10.1371/journal.pone.0010794.g001

human immobilized fibronectin, a large dimeric glycoprotein present in the extracellular matrix in a fibrillar form [19]; ScpB also plays a role in the invasion of GBS into epithelial cells [20], and an induced transcription of *scpB* by components of human serum has recently been reported [21]. Binding of GBS to human laminin, a major glycoprotein of the basement membrane [22], is mediated by the surface-associated lipoprotein Lmb (laminin-binding protein) [23]. Lmb shows homology to members of the LraI family that includes Lsp/Lbp of *Streptococcus pyogenes* [23,24,25] and it promotes GBS invasion into human brain microvascular endothelial cells [26]. It has not been explored yet if the presence of MGEs in *scpB-lmb* intergenic region correlates with particular levels of transcription and expression of *lmb* and *scpB* genes.

In this study, we analyzed the genetic diversity of the *scpB-lmb* intergenic region in a collection of 111 GBS isolates belonging to the major phylogenetic lineages. Strains representing the three genetic configurations found were selected to determine the level of transcription of *lmb* and *scpB* genes, the ability of strains to bind to human laminin and fibronectin, and the Lmb expression on the bacterial cell surface. We found that i) the structural diversity of the *scpB-lmb* intergenic region was related to particular GBS lineages ii) MGE presence had no influence on *scpB* gene expression and iii) *lmb* gene transcription and expression were significantly higher in strains possessing IS*1548* between *scpB* and *lmb* genes. We then constructed an IS*1548* deleted mutant, and by comparing its properties to those of the wild type parent strain, we demonstrated the role of IS*1548* on the up-regulation of *lmb* gene.

## Results

### Distribution of GBSi1 and IS*1548* in GBS isolates

PCR was performed to characterize the region between *scpB* and *lmb* genes in the 111 GBS clinical isolates, using a forward primer at the 3′end of *scpB* gene (*scpB3382*) and a reverse primer at the 5′end of *lmb* gene (*rlmb51*) (Fig. 1). A 400-bp product indicated the lack of any insert in the spacer region. A 2,200-bp and a 1,600-bp product were obtained in the presence of GBSi1 and of IS*1548*, respectively. The presence of GBSi1 and IS*1548* were then confirmed using primer sets *scpB3382/rGBSi143* and *scpB3382/rIS1548*, respectively (Fig. 1). GBSi1 was found in 51 (45.9%) strains, IS*1548* was found in 18 (16.2%) strains, and none of the two MGEs was observed in 40 (36.0%) isolates and in NEM316 strain. For two strains (V4 and G8) and for *ΔscpB-lmb* NEM316 mutant [14], no amplicons were obtained, and the absence of amplification with primer sets *scpB99/rscpB238* and *lmb76/rlmb193* indicated that these strains lacked *scpB* and *lmb* genes.

### Relationship between MLST genetic lineage, clinical origin, distribution of MGEs, and capsular serotype

The 111 isolates were resolved into 40 sequence types (STs), and clonal complexes (CCs) including isolates sharing six or seven identical alleles were defined. The major CCs were CC17 (34.2%), CC19 (18.9%), CC10 (13.6%), and CC23 (10.8%). A relationship between clonal complexes and isolates clinical origin was observed: 28/38 (73.7%) of the CC17 strains and 16/21 (76.2%) of the CC19 strains were recovered from invasive infections of neonates, whereas 7/12 (58.3%) of the CC23 strains and 36/40 (90.0%) of the strains of other CCs were recovered from gastric fluid of colonized asymptomatic neonates and from vaginal swabs of pregnant asymptomatic women. The structure of *scpB-lmb* intergenic region was related to the distribution of strains in clonal complexes (Table 1): 36/38 (94.7%) of the CC17 strains had GBSi1 and 11/12 (91.7%) of the CC23 strains had no MGE; in CC19, 13/21 strains (61.9%) had IS*1548* and the other 8 strains (38.1%) had GBSi1. Of the 13 CC19 strains carrying IS*1548*, 12 (92.3%) originated from invasive infections (Table 2). Finally, 70.6% of the strains that had GBSi1 belonged to CC17 and 72.2% of the strains that had IS*1548* belonged to CC19 (Table 1); all

**Table 1.** Distribution of 109 GBS strains according to the structure of *scpB-lmb* intergenic region and according to clonal complexes as determined by MLST.

| | | Clonal complexes (CC) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N° of strains | CC17 | CC19 | CC23 | CC10 | CC7 | CC1 | Other CC |
| | | N° (%) | N° (%) | N° (%) | N° (%) | N° (%) | N° (%) | N° (%) |
| | n = 109 | n = 38 | n = 21 | n = 12 | n = 15 | n = 6 | n = 7 | n = 10 |
| Without MGE | 40 | 2 (5.0) | 0 (0.0) | 11 (27.5) | 11 (27.5) | 6 (15.0) | 5 (12.5) | 5 (12.5) |
| GBSi1 | 51 | 36 (70.6) | 8 (15.7) | 1 (2.0) | 2 (3.9) | 0 (0.0) | 2 (3.9) | 2 (3.9) |
| IS*1548* | 18 | 0 (0.0) | 13 (72.2) | 0 (0.0) | 2 (11.1) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 3 (16.7) |

doi:10.1371/journal.pone.0010794.t001

**Table 2.** Mobile genetic elements (MGEs) in *scpB-lmb* intergenic region of CC17, CC19, CC23, and CC10 GBS strains from infected and colonized. patients.

| CC | Serotype | N° of isolates | MGE | N° of invasive isolates | N° of colonizing isolates |
|---|---|---|---|---|---|
| 17 | Ia | 1 | GBSi1 | 1 | 0 |
| | III | 34 | GBSi1 | 27 | 7 |
| | III | 1 | no MGE | 0 | 1 |
| | NT[a] | 1 | GBSi1 | 0 | 1 |
| | NT | 1 | no MGE | 0 | 1 |
| 19 | II | 7 | GBSi1 | 4 | 3 |
| | III | 13 | IS*1548* | 12 | 1 |
| | NT | 1 | GBSi1 | 0 | 1 |
| 23 | Ia | 10 | no MGE | 4 | 6 |
| | Ia | 1 | GBSi1 | 0 | 1 |
| | III | 1 | no MGE | 1 | 0 |
| 10 | Ib | 8 | no MGE | 1 | 7 |
| | Ib | 1 | GBSi1 | 0 | 1 |
| | II | 3 | no MGE | 0 | 3 |
| | II | 1 | GBSi1 | 0 | 1 |
| | II | 2 | IS*1548* | 0 | 2 |

[a]NT: not typeable.

doi:10.1371/journal.pone.0010794.t002

these CC17 strains except 2 and all these CC19 strains were of capsular serotype III (Table 2). On the contrary, seven of the eight strains (87.5%) from CC19 that had GBSi1 were of capsular serotype II (Table 2). The distribution of the 40 strains that had no MGE in the *scpB-lmb* intergenic region was various with 27.5% from CC23, 27.5% from CC10, 15.0% from CC7, 12.5% from CC1, only 5.0% from CC17 and none of them from CC19. A great diversity of capsular serotypes was observed among the strains lacking MGEs with notably 32.5% serotype Ia, mostly from CC23, 25% serotype Ib, mostly from CC10, 12.5% serotype III, and 12.5% serotype II strains.

## Quantification of *scpB* and *lmb* transcripts

In order to investigate if the presence of GBSi1 and IS*1548* in *scpB-lmb* intergenic region affected the transcription of *scpB* and *lmb* genes, 26 strains representing the three genetic configurations of the various phylogenetic lineages were selected among the 111 isolates: nine strains had GBSi1 and were from CC17 (3 strains), CC19 (5 strains) and CC1 (1 strain); nine strains had IS*1548* and were from CC19 (4 strains), CC10 (2 strains) and three singleton STs (3 strains); eight strains had no MGE and were from CC23 (3 strains), CC10 (3 strains) and CC1 (2 strains). Transcription levels were determined by real time PCR as detailed in Material and Methods. In NEM316 deleted mutant (*ΔscpB-lmb*) and in V4 strain that both lack the *scpB* and *lmb* genes, no transcripts were detected. Figure 2A shows the mean levels of specific gene transcripts in relation to the structure of the *scpB-lmb* intergenic region. The three groups of strains revealed similar transcript levels of *scpB* gene ($P=0.96$), indicating that the *scpB* gene transcription was not dependant on the intergenic region pattern. On the contrary, the mean transcription level of *lmb* gene in the group of strains with IS*1548* was 5.0- to 9.6-fold higher than that of the groups of strains with GBSi1 and without MGE in *scpB-lmb* intergenic region, respectively, ($P<0.001$ as determined with Kruskal-Wallis test and Dunn's Method for pairwise multiple comparison). The transcription level of *lmb* gene was not related to the phylogeny of strains but to the structure of *scpB-lmb* intergenic region. Indeed, as shown in Table 3, for the nine CC19 strains studied, the mean transcription level of *lmb* gene was $0.86\pm0.69$ for the five strains having GBSi1, and $2.69\pm1.34$ for the four strains having IS*1548*. Similarly, for the five CC10 strains studied, the mean transcription level of *lmb* gene was $0.19\pm0.16$ for the three strains without MGE, and $2.17\pm0.34$ for the two strains having IS*1548*. In the groups of strains with GBSi1 and without MGE, the transcription levels of *scpB* and *lmb* genes were similar (Fig. 2A). By contrast, in strains harbouring IS*1548*, the transcription level of *lmb* gene was significantly higher than that of *scpB* gene ($P=0.001$).

## Binding of GBS strains to immobilized human fibronectin and laminin

In order to analyze if the expression of *scpB* and *lmb* genes was correlated with the level of transcription, we tested the ability of the 26 GBS strains to bind to human fibronectin and to human laminin (Fig. 2B). No difference between the fibronectin binding ability of the three groups of strains was observed ($P=0.86$). By contrast, strains with IS*1548* bound significantly more strongly to laminin ($14.13\%\pm10.55\%$) than strains that had GBSi1 ($2.14\%\pm1.13\%$) and strains without MGE in the *scpB-lmb* intergenic region ($3.70\%\pm1.78\%$) ($P\leq0.001$ as determined with Kruskal-Wallis test and Dunn's Method for pairwise multiple comparison). The mean binding ability to human laminin of strains with IS*1548* was thus 3.8- to 6.6-fold increased as compared with strains without MGE and with GBSi1, respectively. As observed for the transcription level of *lmb* gene, the binding ability to laminin was not related to the phylogenetic lineages of strains, but to the structure of *scpB-lmb* intergenic region. Indeed, as shown in Table 3, for the nine CC19 strains studied, the mean binding ability to laminin was $2.60\%\pm1.06\%$ for the five strains having GBSi1, and $9.36\%\pm2.25\%$ for the four strains having IS*1548*. Similarly, for the five CC10 strains studied, the mean binding ability to laminin was $2.52\%\pm1.10\%$ for the three strains without MGE, and $12.84\pm6.74\%$ for the two strains having IS*1548*.

## Quantification of Lmb on bacterial cell surface

To further analyze if the stronger binding ability to laminin of strains with IS*1548* was in relation with a stronger expression of the laminin binding protein Lmb, quantification of Lmb on the bacterial surfaces of the 26 GBS strains was performed in an ELISA-type assay using polyclonal rabbit antibodies raised against Lmb. Preimmune rabbit serum did not react with GBS strains. As depicted in Fig. 3, the amount of Lmb was 2.4- to 2.7-fold increased in GBS isolates with IS*1548* as compared with the GBS strains with GBSi1 or without MGE in *scpB-lmb* region, respectively ($P<0.001$ as determined by ANOVA with Fisher's post-hoc test). These findings support our results of *lmb* transcripts quantification and of binding ability of strains to laminin and point out the association of IS*1548* with the induction of *lmb* gene expression.

## Properties of the isogenic IS*1548* deleted strain

In order to determine whether the up-regulation of the *lmb* gene is caused by the upstream copy of IS*1548*, we deleted the IS*1548* sequence between *scpB* and *lmb* genes in the genome of ST-19 serotype III L29 strain. The successful deletion was confirmed by DNA sequencing of a 1.2 kb-PCR product obtained with

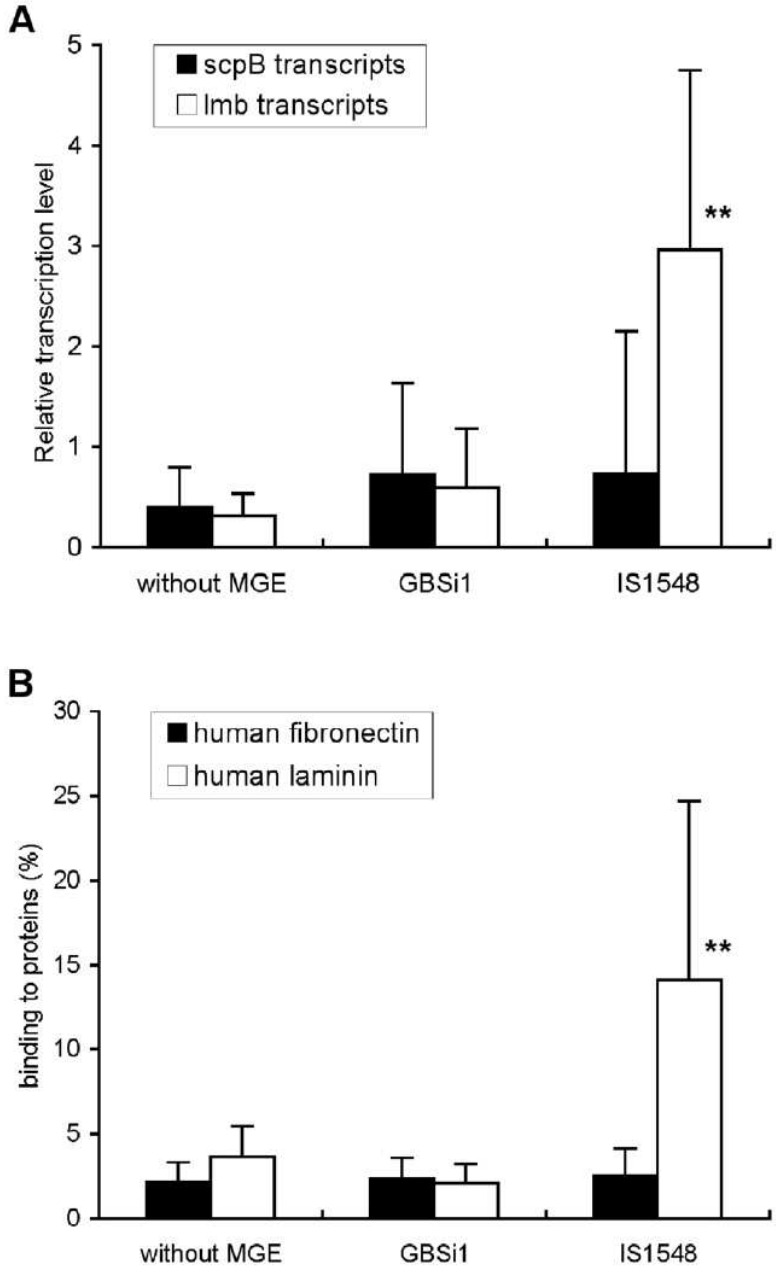



**Figure 2. Properties of 26 GBS isolates in relation to the *scpB-lmb* intergenic region structure (8 strains without MGE, 9 strains with GBSi1 and 9 strains with IS*1548*).** (A) Relative transcription levels of *scpB* (filled boxes) and *lmb* (open boxes) genes. The amount of transcripts of each gene was normalized to the amount of *gyrA* transcripts and expressed relative to the level of transcription in L19 GBS isolate that has no MGE. Boxes are means and bars are standard deviation of the means of the relative level of transcription in each group of strains. ** The mean transcription level of *lmb* gene was significantly higher in the group of strains with IS*1548* than in the other two groups of strains ($P<0.001$). (B) Binding ability of GBS isolates to immobilized human fibronectin (filled boxes) and to immobilized human laminin (open boxes). Boxes are means and bars are standard deviation of the means of the fibronectin and laminin binding percentages in each group of strains. ** The mean binding ability to laminin was significantly higher in the group of strains with IS*1548* than in the other two groups of strains ($P\leq0.001$).
doi:10.1371/journal.pone.0010794.g002

*scpB2987/rlmb497* primer set (data not shown). L29 wild type (WT) strain and the isogenic mutant (*Δ*IS*1548*) were subsequently tested for transcription of *lmb* gene by quantitative RT-PCR, expression of Lmb protein on cell surface by ELISA and Western blot, and binding ability to laminin. As depicted in Fig. 4, the isogenic mutant showed a 13.5-fold decreased level of *lmb* transcripts, a 6.2-

**Table 3.** *lmb* gene expression in 14 strains from two phylogenetic lineages in relation to the presence of the IS*1548* sequence upstream *lmb* gene.

| | CC19 | | CC10 | |
|---|---|---|---|---|
| | IS*1548*+ | IS*1548*− | IS*1548*+ | IS*1548*− |
| | n=4 | n=5 | n=2 | n=3 |
| *lmb* gene transcripts[a] | 2.69±1.34 | 0.86±0.69 | 2.17±0.34 | 0.19±0.16 |
| Laminin binding (%)[b] | 9.36±2.25 | 2.60±1.06 | 12.84±6.74 | 2.52±1.10 |
| Lmb protein expression[c] | 6.01±2.70 | 2.50±0.70 | 4.80±1.50 | 1.45±0.20 |

[a]*lmb* gene transcripts were quantified by real time RT-PCR. The amount of *lmb* transcripts was normalized to the amount of *gyrA* transcripts and expressed relative to the level of transcription in L19 GBS isolate that has no MGE.
[b]The percentage of binding to immobilized human laminin was obtained by the ratio between the number of bound bacteria and the number of bacteria present in the inoculum.
[c]Lmb protein expressed at the bacterial cell surface was quantified in an ELISA-type assay, as described in Figure 3.
doi:10.1371/journal.pone.0010794.t003

fold decreased ability to bind to laminin, and a 5.0-fold decreased Lmb protein amount as determined by ELISA, as compared to the WT strain. Similarly, detection of Lmb protein by Western blotting (Fig. 5) showed a decreased expression in L29*Δ*IS*1548* as compared to the WT strain.

## Discussion

Mobile genetic elements are an important source of genetic plasticity in prokaryotes. They drive bacterial evolution and adaptation via recombination and horizontal transfer and they influence the virulence of bacteria by modulating gene expression [27]. ScpB and Lmb are two ubiquitous proteins localized at the surface of GBS cells, and are thus good candidates for a GBS vaccine. Therefore, it is of importance to better explore their expression level, especially on account of the genetic diversity of *S. agalactiae* species that is composed of multiple major phylogenetic lineages. In line with this, we screened a large collection of strains representing the diversity of the species for the presence of two MGEs, GBSi1 and IS*1548*, between *scpB* and *lmb* genes, and studied the expression of *scpB* and *lmb* genes for each *scpB-lmb* intergenic region pattern. Moreover, we examined the effect of deleting the upstream IS*1548* copy on *lmb* gene expression in one GBS isolate.

In our collection of 111 strains, only two strains lacked the *scpB* and *lmb* genes, a result in accordance with previous data that had revealed that almost all human isolates contained the *scpB* and *lmb* genes, whereas these genes were absent in a majority of strains of bovine origin [14,15,16,28]. Therefore, our results reinforce the hypothesis that *scpB-lmb* region may be essential for the colonization or infection in humans [14,21]. As previously reported, we found a mutual exclusiveness of IS*1548* and GBSi1 [9,12,17], and a diversity of patterns of the intergenic region in relation to several major GBS lineages: CC17 was characterized by GBSi1 and CC19 was characterized by IS*1548*, while CC23 lacked GBSi1 and IS*1548* [8,12,13,29]. Nevertheless, the CC19 strains clustered into two groups: all the serotype III strains had IS*1548* and all the serotype II strains had GBSi1. Therefore, as previously suggested [9,30], these two clusters seem to form distinct and relatively homogeneous lineages that could have notable differences in virulence factors expression.

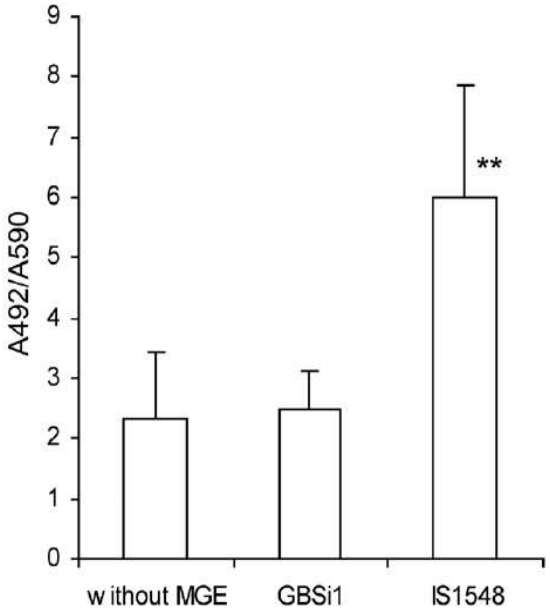



**Figure 3. Expression of Lmb protein on GBS cells in relation to the *scpB-lmb* intergenic region structure.** Lmb protein was quantified in an ELISA-type assay. GBS cells (8 strains without MGE, 9 strains with GBSi1, 9 strains with IS*1548*), were immobilized in microtiter wells and incubated with rabbit anti-Lmb antibodies. Binding of antibodies to the Lmb protein was quantified by addition of peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG, and subsequent addition of OPD peroxidase substrate. Boxes are means and bars are standard deviation of the means of the absorbance at 492 nm ($A_{492}$) per adhering bacteria in each group of strains. ** The amount of Lmb protein was significantly higher in the group of strains with IS*1548* as compared with the other two groups of strains ($P<0.001$).
doi:10.1371/journal.pone.0010794.g003

Our different experimental approaches demonstrated that the presence of GBSi1 or IS*1548*, which are located downstream of the *scpB* gene, did not modify *scpB* transcription and expression. By contrast, IS*1548* was associated with an enhanced expression of the *lmb* gene which resulted in a 5.0- to 9.6-fold increased *lmb* transcription, a 3.8- to 6.6-fold increased binding ability to human laminin, and a 2.4- to 2.7-fold increased expression of Lmb protein on the bacterial cell surface, as compared to strains without MGE or with GBSi1. These variations were independent of the phylogenetic position of strains indicating that the *lmb* gene expression was probably directly affected by the IS element acquisition rather than by other genetic events linked to the emergence of particular intraspecies clones. This hypothesis was then demonstrated by construction of an IS*1548* deleted mutant which showed a 13.5-fold decreased transcription of *lmb* gene, a 5.0-fold decreased expression of Lmb protein, and a 6.2-fold reduced binding ability to laminin, as compared to the parent strain. Gene activation following integration of IS elements is a well-known phenomenon, notably described for antibiotic resistance, bacterial metabolism and virulence [31,32,33,34,35]. Several mechanisms could explain the role of IS*1548* in the up-regulation of the *lmb* gene. First, it could result from the provision of an efficient promoter, carried either entirely by the IS element, or generated as a hybrid structure between IS and the target sequence. Indeed, in *Lactococcus lactis*, a hybrid promoter composed of a −35 sequence located at the right end of an IS-like element, and a −10 sequence located in the region adjacent to the element,

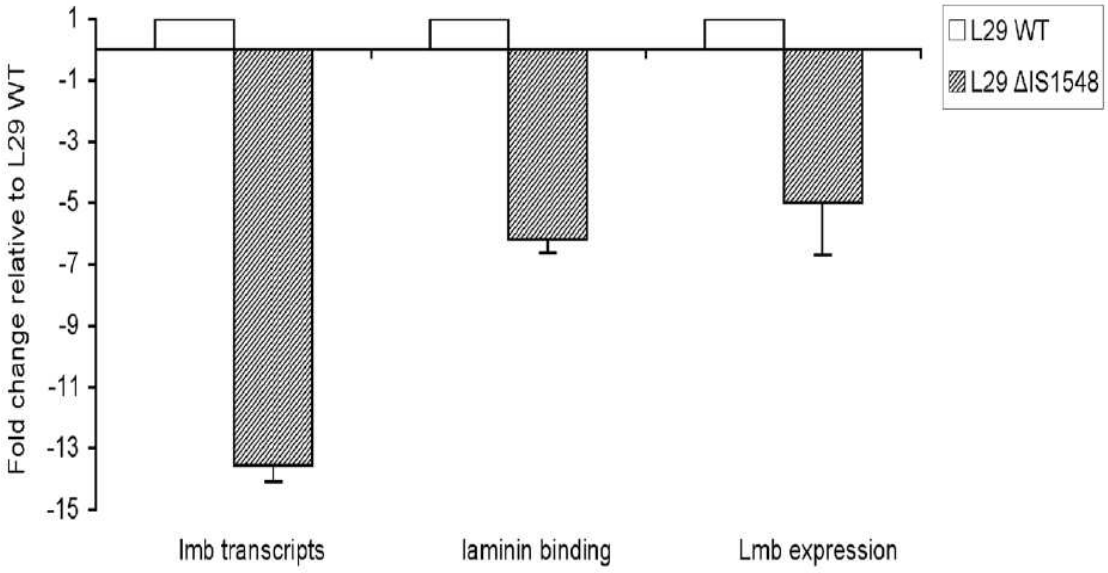



**Figure 4. Properties of L29 wild type GBS strain and isogenic IS *1548* deletion mutant.** Relative transcription levels of *lmb* gene, binding ability of GBS cells to immobilized human laminin, and expression of Lmb protein on GBS cells as determined by ELISA, in an isogenic mutant deleted for IS*1548* sequence between *scpB* and *lmb* genes (L29*Δ*IS*1548*) (striped boxes) as compared to the parent strain (L29 WT) (open boxes). Each experiment was performed at least three times. Boxes are means and bars are standard deviation of the means.
doi:10.1371/journal.pone.0010794.g004

created a new promoter which was responsible for the activation of the *citQRP* operon involved in the transport of citrate [32]. Additionally, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, new promoter sequences were created by the integration of the IS*1* element upstream of the original promoter for the multidrug efflux *acrEF* operon, therefore providing an alternative promoter which activated its expression [33]. The up-regulation of the *lmb* gene could also result from the disruption or displacement of a repressor binding site following the insertion of IS*1548* upstream of *lmb* gene, thus leading to the increase of *lmb* expression. This mechanism was suggested to explain the activation of the endogenous *Bacteroides fragilis* cephalosporinase gene, *cepA*, by IS*1224* [34]. Additional studies are needed to explore these mechanisms.

Genes encoding GBS surface and secreted proteins constitute potentially useful virulence factors to explain the ability of GBS to invade the central nervous system (CNS) of neonates. Several studies have reported that a particular allelic form of *gbs2018*, *srr-2*, and *fbsB* genes encoding peptidoglycan anchored and fibrinogen-binding proteins were specific of the highly virulent ST-17 clone [28,36,37], mostly prevalent in neonatal meningitis [5,13], but no specific factors appeared to be related to the other virulent clonal complexes, especially to CC19 that was regularly described in neonatal meningitis. We have recently reported that 100% of the CC17

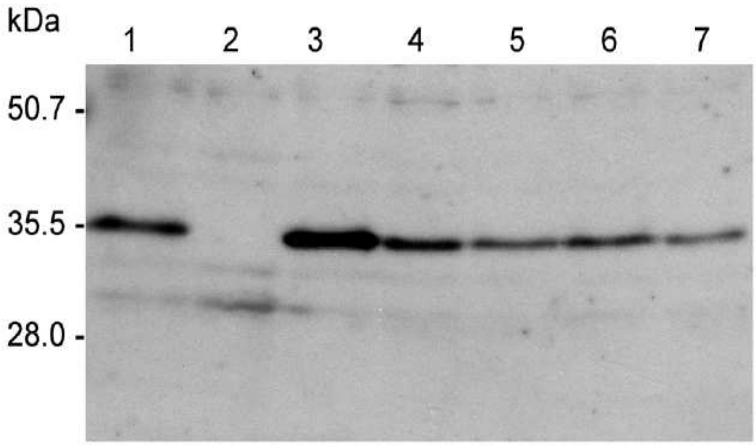



**Figure 5. Detection of Lmb protein by Western blot in L29 wild type GBS strain and isogenic IS *1548* deletion mutants.** 10 µg of total bacterial cell proteins isolated from strains 1: NEM316 (no MGE), 2: Δ*scpB-lmb* NEM316 mutant, 3: L29 wild type (IS*1548*), 4 to 7: four independent L29*Δ*IS*1548* mutant strains were separated by SDS PAGE and transferred to an Immobilon P polyvinylidene difluoride membrane. The blots were probed with rabbit anti-Lmb antibodies that were detected with a horseradish peroxidase labeled secondary anti-rabbit antibody that was then visualized by the ECL system (Amersham Biosciences). Molecular sizes in kDa are depicted at the left.
doi:10.1371/journal.pone.0010794.g005

strains of the collection used in this study belonged to the group of strains that possessed both *fbsA* and *fbsB* fibrinogen-binding genes and had the highest ability to bind to human fibrinogen [38]; nearly all these strains had GBSi1 in the *scpB-lmb* intergenic region, a configuration that does not increase *lmb* expression. By contrast, we have previously found that 84.0% of the CC19 strains studied here were devoid of the *fbsB* gene *sensu stricto* and had a truncated form of the *fbsA* gene leading to a low fibrinogen binding ability [38]. Therefore, contrarily to CC17 strains, the fibrinogen binding ability does not appear as a major factor to explain the ability of CC19 strains to invade neonatal CNS. Interestingly, 13 of the 21 CC19 strains (61.9%) had IS*1548* in the *scpB-lmb* intergenic region and had consequently an increased binding ability to laminin, and 12 of these 13 CC19 IS*1548* positive isolates were recovered from CNS. It was previously demonstrated that FbsA and Lmb proteins are important factors for GBS adherence to and invasion into the blood-brain barrier that facilitates the entry of the bacteria into the cerebrospinal fluid [26,39]. Therefore, we may hypothesize that the two fibrinogen binding genes *fbsA* and *fbsB* promote the ability of CC17 strains to invade CNS of neonates whereas the enhanced expression of *lmb* gene due to IS*1548* promotes that of CC19 isolates. Similarly, IS*1548* was identified in the hyaluronidase gene *hylB* of *S. agalactiae* endocarditis isolates [40]. In such strains, an additional copy of IS*1548* was always found downstream of the *scpB* gene [40,41,42]. As streptococci colonize cardiac valves with pre-existing endothelial lesions that lead to the exposure of underlying basement membrane structures [43], the enhancement of GBS adhesion to basement membrane laminin may be critical for the bacterial colonization of damaged epithelium and endothelium.

In summary, our results support the importance of transposable elements in bacterial virulence. We demonstrated that IS*1548* strongly activates *lmb* gene expression. This might explain the particular ability of some *S. agalactiae* strains, mostly belonging to CC19 and to capsular serotype III, to invade the CNS of neonates. Further studies are needed to clarify the mechanisms explaining the overexpression of *lmb* gene by IS*1548* in these particular strains.

## Materials and Methods

### Bacterial strains and growth conditions

A total of 111 unrelated human strains representing the genetic diversity of *Streptococcus agalactiae* species were included in the present study: 54 strains from the cerebrospinal fluid of infected neonates, 21 strains from the gastric fluid of colonized asymptomatic neonates and 36 strains from vaginal swabs of colonized asymptomatic pregnant women. Strains were isolated between 1986 and 1990 from 25 general hospitals throughout France [11]. Neonatal specimens were obtained from infected neonates suffering of meningitis and from non infected neonates with risk factor, and vaginal specimens were obtained from asymptomatic pregnant women during the process of routine clinical diagnostic procedures, as part of the usual prenatal and postnatal screening. All data were analyzed anonymously. According to the information we obtained from the Institutional Review Board (more than 20 years ago), this type of study did not require an ethics approval and the patient consent. All strains had previously been serotyped on the basis of capsular polysaccharides [11]. Six serotypes were identified i.e. serotypes Ia (16 strains), Ib (12 strains), II (17 strains), III (55 strains), IV (3 strains), and V (3 strains), and five strains were not typeable. *S. agalactiae* wild-type NEM316, and an isogenic *scpB-lmb* mutant of NEM316, which comprises a deletion of the complete *scpB-lmb* composite transposon structure (*ΔscpB-lmb*) were used as control strains. The strain was generated by insertion of a pG$^+$host5 plasmid [44] into the *lmb* gene of NEM316, and subsequent mobilization of the plasmid as described by Franken et al. [14].

GBS strains were stored at −80°C in Schaedler-vitamin $K_3$ broth (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) with 10% glycerol. The bacteria were grown for 24 h on 5% horse blood Trypticase soja (TS) agar plates (bioMérieux) at 37°C.

*Escherichia coli* DH5α was used for cloning purposes. It was grown at 37°C in Luria Broth. *E. coli* and GBS clones carrying the pG$^+$host5 plasmid were selected in the presence of 300 µg/ml and 2 µg/ml erythromycin, respectively.

### Construction of an IS1548 deletion mutant

The IS*1548* sequence was deleted in the chromosome of ST-19 serotype III L29 GBS strain by a method adapted from that described by Schubert et al. [45]. Briefly, a DNA fragment including 421 bp at the 3′ end of *scpB* gene, the whole *scpB-lmb* intergenic region, and 400 bp at the 5′ end of *lmb* gene was amplified by PCR with the primer pair *IS1548*_del1 5′-CCGCGGATCCGGCCACTCTAA-TAAGCCAGAA and *IS1548*_del2 5′-GGGGGTACCAAT-GCCTTGTGTGACTTCCA from the genome of ST-23 serotype III V27 GBS strain that harbors no MGE in this region. The *Bam*HI restriction site of *IS1548*_del1 and the *Kpn*I restriction site of *IS1548*_del2 are underlined. The resulting PCR product and the thermosensitive vector pG$^+$host5 [44] were digested with *Bam*HI and *Kpn*I, ligated, and transformed into *E. coli* DH5α. The resulting plasmid pG$^+$*IS1548neg* was electroporated into *S. agalactiae* L29 [46], and transformants were grown at 28°C with erythromycin selection. Cells in which pG$^+$*IS1548neg* had integrated into the chromosome were selected at 37°C under erythromycin pressure. Four of such clones were serially passaged for 6 days in Todd-Hewitt (TH) broth (Sigma, St Quentin Fallavier, France) at 28°C without erythromycin pressure to facilitate the excision of plasmid pG$^+$*IS1548neg*, leaving the desired IS*1548* deletion in the chromosome. Dilutions of the serially passaged cultures were plated onto TS agar plates, and single colonies were tested for erythromycin sensitivity to identify pG$^+$*IS1548neg* excisants. Successful deletion of IS*1548* sequence was confirmed by PCR using *scpB2987/rlmb497* primer set (Table 4) and by sequencing the amplified fragment.

**Table 4.** Oligonucleotide primers.

| Name of primer | Sequence (5′-3′) | Target sequence |
|---|---|---|
| *scpB3382* | TTATGACCACTTTCTTCTTGGGA | *scpB-lmb* intergenic region |
| *rlmb51* | CTATCATTACTAAACTCACAAC | |
| *scpB2987* | AATGGAAGGCGCTACTGTTC | *scpB-lmb* intergenic region |
| *rlmb497* | GGATCCAAACGTCCTAGCTC | |
| *scpB3382* | TTATGACCACTTTCTTCTTGGGA | IS*1548* in *scpB-lmb* intergenic region |
| *rIS1548* | CTTCATCCTTTTGTGCCCGGACATC | |
| *scpB3382* | TTATGACCACTTTCTTCTTGGGA | GBSi1 in *scpB-lmb* intergenic region |
| *rGBSi143* | CTCCATTTCCTCATCGTCAG | |
| *lmb76* | CCCAAACAGCCTACGCAAG | *lmb* gene |
| *rlmb193* | TGCCTGCACCTGATTGGATC | |
| *scpB99* | TGTGACAGAAGACACTCCTG | *scpB* gene |
| *rscpB238* | CGTCATCTGCTACTGTTTCTCC | |
| *gyrA* | CGGGACACGTACAGGCTACT | *gyrA* gene |
| *rgyrA* | CGATACGAGAAGCTCCCACA | |

doi:10.1371/journal.pone.0010794.t004

### PCR

All primers used (Table 4) were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium). Bacterial genomic DNA extracted and purified by conventional methods [47] was used as the template for PCR assays. PCR was carried out with 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with an initial 5 min hold at 94°C followed by 30 cycles of amplification steps of 1 min at 94°C, 0.5 min at 55°C, and 2 min at 72°C, followed by a final 10 min step at 72°C.

### Quantification of specific transcripts with real-time PCR

*S. agalactiae* strains were grown overnight in 50 ml of TH broth to stationary growth phase ($[OD_{595}] = 1.2$). Bacterial cells pelleted by centrifugation were lysed mechanically with 0.25–0.5 mm glass beads (Sigma) in Tissue Lyser (Qiagen, Hilden, Germany) for 6 min at 30 Hz. RNA was purified by using the RNeasy Mini kit (Qiagen), then treated with DNase using DNAfree kit (Ambion, Cambridgeshire, UK) and checked for DNA contamination by PCR amplification without prior reverse transcription. As no amplicons were obtained, the possibility of DNA contamination during RNA preparation could be excluded. Reverse transcription of 1 µg of RNA was performed with random hexanucleotides and the Quantiscript Reverse Transcription kit (Qiagen). Real-time quantitative PCR was performed in a 25 µl reaction volume containing cDNA (50 ng), 12.5 µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), and 0.3 µM of each gene-specific primer in an iCycler iQ detection system (BioRad). The specific primers for *gyrA*, *lmb* and *scpB* genes listed in Table 4 were used. The PCR consisted of an initial 15 min hold at 95°C followed by 40 cycles, each of 15 sec at 94°C, 30 sec at 58°C, and 30 sec with fluorescence acquisition at 72°C. The specificity of the amplified product was verified by generating a melting-curve with a final step of 50 cycles of 10 sec at an initial temperature of 70°C, increasing 0.5°C each cycle up to 95°C. The quantity of cDNA for the investigated genes was normalized to the quantity of *gyrA* cDNA in each sample. The *gyrA* gene was chosen as an internal standard since gyrase genes represent ubiquitously expressed house-keeping genes that are frequently used for the normalization of gene expression in quantitative reverse transcription-PCR experiments [48,49]. The transcription levels of *scpB* and *lmb* genes in the GBS isolate L19 which has no MGE in the *scpB-lmb* intergenic region, were treated as the basal levels. Each experiment was performed at least three times.

### Binding of GBS to immobilized human fibronectin and human laminin

All binding assays were performed in triplicate. Flat bottomed 96-well polystyrene plates (Ciblex, Ivry sur Seine, France) were coated for 18 h at room temperature with 10 µg/ml human plasma fibronectin (Sigma) or with 10 µg/ml human placenta laminin purified by immunoaffinity chromatography (Sigma) diluted in phosphate-buffered saline (PBS) (150 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2). Bacterial cells were harvested from overnight cultures in TH broth and resuspended in PBS. Laminin- and fibronectin-coated wells were washed, and then 50 µl of PBS containing $1\times10^5$ to $1\times10^6$ CFU per ml were added to each well. After incubation for 90 min at 37°C, non binding bacteria were removed by washing with PBS. Bound bacteria were subsequently unbound by the addition of a 0.01% solution of protease/serine protease mix (Sigma) to each well as previously described [38], then the viable bacteria were quantified by plating serial dilutions onto TS agar plates. The percentage of binding to human laminin and fibronectin was obtained by the ratio between the number of bound bacteria and the number of bacteria present in the inoculum.

### Quantification of Lmb protein on bacterial cells by ELISA

Quantification of Lmb was determined in an ELISA-type assay. Flat bottomed 96-well polystyrene plates were coated overnight at 4°C with GBS cells grown to stationary phase ($5\times10^5$ CFU/well). After washing with PBS, the wells were treated for 1 h at room temperature with 2% bovine serum albumin in PBS in order to block additional protein binding sites. The wells were washed with 0.05% Tween 20 in PBS and incubated 1 h at 37°C with polyclonal rabbit anti-Lmb antibodies which were raised against Lmb recombinant protein [23], or with rabbit preimmune serum at a dilution of 1:200. The absence of reactivity of preimmune serum and the specificity of anti-Lmb antibodies towards Lmb protein were previously shown [23], and the ability of anti-Lmb antibodies to inhibit bacterial binding to laminin was demonstrated [26]. After washing, wells were incubated for 1 h at 37°C with a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Camarillo, CA, USA) at a dilution of 1:10,000. The conjugated enzyme was allowed to react with *o*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma) and absorbance at 492 nm ($A_{492}$) was monitored with a microtiter plate reader (Labsystems iEMS Reader MF, Labsystems, Helsinki, Finland). ELISA results were expressed as $A_{492}$ values divided by the number of bacteria that had adhered to each well, as determined by crystal violet staining, a common method used to quantify bacteria adhering to plastics, more particularly in biofilms [50,51,52]: cells were stained with 100 µl 0.3% crystal violet at room temperature for 15 min. Excess crystal violet was then discarded and the wells were washed 3 times with water. Crystal violet was then extracted from the cells by 200 µl absolute ethanol for 45 min at room temperature and transferred to a new microtiter plate. The quantity of bacteria was estimated by measuring the $A_{590}$ of each well using a microtiter plate reader.

### Detection of Lmb protein by Western blot

Total bacterial cell protein was isolated from GBS strains as previously described [53]. For each strain, 10 µg of protein was separated on a 12% SDS polyacrylamide gel and transferred to an Immobilon P polyvinylidene difluoride membrane. Following preabsorption of the antibody with a an Lmb negative *S. agalactiae* strain, the blots were probed with polyclonal rabbit anti-Lmb antibodies [23] at a dilution of 1:200. For the detection of bound primary antibody, a horseradish peroxidase labeled secondary anti-rabbit antibody was used at a dilution of 1:8,000. Bound secondary antibody was visualized by the ECL system (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Germany) in accordance with instructions provided by the manufacturer.

### Multilocus sequence typing

The 111 strains were typed by multilocus sequence typing (MLST) by sequencing ~500-bp fragments of seven housekeeping genes (*adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdha*, *glcK*, and *tkt*) as described by Jones et al. [5]. Nucleotide sequences were compared with those available on the MLST database (http://pubmlst.org/sagalactiae/). After assigning an allele number to each locus, the sequence type (ST) which takes in account the allele combination of the seven loci was determined for each isolate. Clonal complexes including isolates sharing six or seven identical alleles were defined.

### Statistical analysis

Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's post-hoc test. When conditions of normality were not met to use parametric analysis, a non-

parametric ANOVA test (Kruskal–Wallis) with pairwise multiple comparison procedures (Dunn's Method) was used to find statistical differences between results. Statistically significant difference was determined at 95% confidence level. Parametric tests were carried out with Minitab version 10.51 (MINITAB Inc., State College, PA, USA) and non-parametric tests with SigmaStat version 2.03 (Systat Software Inc., Richmond, CA, USA).

## Acknowledgments

We thank Dr Emmanuelle Maguin for supplying pG$^+$host5 plasmid. We thank Dr Gérard Lesage for expert technical assistance and advice with the ELISA-type assay.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RAS SA BS AR. Performed the experiments: RAS SA GHA BS. Analyzed the data: RAS PL LM FG RQ AR. Contributed reagents/materials/analysis tools: FG. Wrote the paper: RAS BS RQ AR.

## References

1. Farley MM (2001) Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. Clin Infect Dis 33: 556–561.
2. Schuchat A (1998) Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: Shifting Paradigms. Clin Microbiol Rev 11: 497–513.
3. Bisharat N, Jones N, Marchaim D, Block C, Harding RM, et al. (2005) Population structure of group B streptococcus from a low-incidence region for invasive neonatal disease. Microbiology 151: 1875–1881.
4. Davies HD, Jones N, Whittam TS, Elsayedr N, Bisharat N, et al. (2005) Multilocus sequence typing of serotype III group B streptococcus and correlation with pathogenic potential. J Infect Dis 189: 1097–1102.
5. Jones N, Bohnsack JF, Takahashi S, Oliver KA, Chan MS, et al. (2003) Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. J Clin Microbiol 41: 2530–2536.
6. Domelier AS, van der Mee-Marquet N, Sizaret PY, Héry-Arnaud G, Lartigue MF, et al. (2009) Molecular characterization and lytic activities of *Streptococcus agalactiae* bacteriophages and determination of lysogenic strain features. J Bacteriol 191: 4776–85.
7. Glaser P, Rusniok C, Buchrieser C, Chevalier F, Frangeul L, et al. (2002) Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. Mol Microbiol 45: 1499–1513.
8. Héry-Arnaud G, Bruant G, Lanotte P, Brun S, Picard B, et al. (2007) Mobile genetic elements provides evidence for a bovine origin of clonal complex 17 of *Streptococcus agalactiae*. Appl Environ Microbiol 73: 4668–4672.
9. Bohnsack JF, Whiting A, Gottschalk M, Dunn DM, Weiss R, et al. (2008) Population structure of invasive and colonizing strains of *Streptococcus agalactiae* from neonates of six U S academic centers from 1995 to 1999. J Clin Microbiol 46: 1285–1291.
10. Musser JM, Mattingly SJ, Quentin R, Goudeau A, Selander RK (1989) Identification of a high-virulence clone of type III *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) causing invasive neonatal disease. Proc Natl Acad Sci USA 86: 4731–4735.
11. Quentin R, Huet H, Wang FS, Geslin P, Goudeau A, et al. (1995) Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by multilocus enzyme genotype and serotype: identification of multiple virulent clone families that cause invasive neonatal disease. J Clin Microbiol 33: 2576–2581.
12. Héry-Arnaud G, Bruant G, Lanotte P, Brun S, Rosenau A, et al. (2005) Acquisition of insertion sequences and the GBSi1 intron by *Streptococcus agalactiae* isolates correlates with the evolution of the species. J Bacteriol 187: 6248–6252.
13. Luan SL, Granlund M, Sellin M, Legegard T, Spratt BG, et al. (2005) Multilocus sequence typing of Swedish invasive group B streptococcus isolates indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching. J Clin Microbiol 43: 3727–3233.
14. Franken C, Haase G, Brandt C, Weber-Heynemann J, Martin S, et al. (2001) Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*. Mol Microbiol 41: 925–935.
15. Bröker G, Spellerberg B (2004) Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and horizontal gene transfer. Int J Med Microbiol 294: 169–175.
16. Dmitriev A, Shen AD, Tkacikova L, Mikula I, Yang YH (2004) Structure of *scpB-lmb* intergenic region as criterion for additional classification of human and bovine group B Streptococci. Acta Vet Brno 73: 215–220.
17. Granlund M, Michel F, Norgren M (2001) Mutually exclusive distribution of IS*1548* and GBSi1 an active group II intron identified in human isolates of group B streptococci. J Bacteriol 183: 2560–2569.
18. Luan SL, Granlund M, Norgren M (2003) An inserted DNA fragment with plasmid features is uniquely associated with the presence of the GBSi1 group II intron in *Streptococcus agalactiae*. Gene 312: 305–312.
19. Beckmann C, Waggoner JD, Harris TO, Tamura GS, Rubens CE (2002) Identification of novel adhesins from group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. Infect Immun 70: 2869–2876.
20. Cheng Q, Stafslien D, Puroshothaman SS, Cleary P (2002) The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin. Infect Immun 70: 2408–2413.
21. Gleich-Theurer U, Aymanns S, Haas G, Mauerer JV, Vogt J, Spellerberg B (2009) Human serum induces streptococcal C5a peptidase expression. Infect Immun 77: 3817–3825.
22. Preissner KT, Chhatwal GS (2005) Extracellular matrix and host cell surfaces: potential sites of pathogen interaction. In: Cossart P, Boquet P, Normark P, Rappuoli R, eds. Cellular Microbiology. Washington DC: 2th edition ASM Press. pp 87–104.
23. Spellerberg B, Rozdzinski E, Martin S, Weber-Heynemann J, Schnitzler N, et al. (1999) Lmb a protein with similarities to the LraI adhesin family mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. Infect Immun 67: 871–878.
24. Elsner A, Kreikemeyer B, Braum-Kiewnick A, Spellerberg B, Buttaro A, et al. (2002) Involvement of Lsp a member of the LraI-lipoprotein family in *Streptococcus pyogenes* in eucaryotic cell adhesion and internalization. Infect Immun 70: 4859–4869.
25. Terao Y, Kawabata S, Kunitomo E, Nakagawa I, Hamada S (2001) Novel laminin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* Lbp is involved in adhesion to epithelial cells. Infect Immun 70: 993–997.
26. Tenenbaum T, Spellerberg B, Adam R, Vogel M, Kim KS, et al. (2007) *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. Microbes Infect 9: 714–720.
27. Kazazian HH, Jr. (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. Science 303: 1626–1632.
28. Brochet M, Couvé E, Zouine M, Vallaeys T, Rusniok C, et al. (2006) Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. Microbes Infect 8: 1227–1243.
29. Bohnsack JF, Whiting AA, Martinez G, Jones N, Adderson S, et al. (2004) Serotype III *Streptococcus agalactiae* from bovine milk and human neonatal infections. Emerg Infect Dis 10: 1412–1419.
30. Takahashi S, Detrick S, Whiting AA, Blaschke-Bonkowsky K, Aoyagi Y, et al. (2002) Correlation of phylogenetic lineages of group B Streptococci, identified by analysis of restriction-digestion patterns of genomic DNA, with *infB* alleles and mobile genetic elements. J Infect Dis 186: 1034–1038.
31. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P (2007) Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin Microb Rev 20: 79–114.
32. López de Felipe F, Magni C, de Mendoza D, López P (1996) Transcriptional activation of the citrate permease P gene of *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* by an insertion sequence-like element present in plasmid pCIT264. Mol Gen Genet 4: 428–436.
33. Olliver A, Vallé M, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A (2005) Overexpression of the multidrug efflux operon *acrEF* by insertional activation with IS*1* or IS*10* elements in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT204 *acrB* mutants selected with fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother 49: 289–301.
34. Rogers MB, Bennett TK, Payne CM, Smith CJ (1994) Insertional activation of *cepA* leads to high-level β-lactamase expression in *Bacteroides fragilis* clinical isolates. J Bacteriol 176: 4376–4384.
35. Rubens CE, Heggen LM, Kuypers JM (1989) IS*861*, a group B streptococcal insertion sequence related to IS*150* and IS*3* of *Escherichia coli*. J Bacteriol 171: 5531–5535.
36. Lamy MC, Dramsi S, Billoët A, Réglier-Poupet H, Tazi A, et al. (2006) Rapid detection of the "highly virulent" group B Streptococcus ST-17 clone. Microbes Infect 8: 1714–1722.
37. Seifert KN, Adderson EE, Whiting AA, Bohnsack JF, Crowley PJ, et al. (2006) A unique serine-rich repeat protein (Srr-2) and novel surface antigen (epsilon) associated with a virulent lineage of serotype III *Streptococcus agalactiae*. Microbiology 152: 1029–1040.
38. Rosenau A, Martins K, Amor S, Gannier F, Lanotte P, et al. (2007) Evaluation of the ability of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from genital and neonatal specimens to bind to human fibrinogen and correlation with characteristics of the *fbsA* and *fbsB* genes. Infect Immun 75: 1310–1317.
39. Tenenbaum T, Bloier C, Adam R, Reinscheid DJ, Schroten H (2005) Adherence to and invasion of human brain microvascular endothelial cells are promoted by fibrinogen-binding protein FbsA of *Streptococcus agalactiae*. Infect Immun 73: 4404–4409.
40. Granlund M, Oberg L, Sellin M, Norgren M (1998) Identification of a novel insertion element, IS*1548*, in group B streptococci, predominantly in strains causing endocarditis. J Infect Dis 4: 967–976.

41. Bidet P, Brahimi N, Chalas C, Aujard Y, Bingen E (2003) Molecular characterization of serotype III group B-*Streptococcus* isolates causing neonatal meningitis. J Infect Dis 188: 1132–1137.
42. Yilirim AO, Fink K, Lämmler C (2002) Distribution of the hyaluronate lyase encoding gene *hylB* and the insertion element IS*1548* in streptococci of serological group B isolated from animals and humans. Res Vet Sci 2: 131–135.
43. Moreillon P (1999) Endocarditis and endarteritis. In: Armstrong D, Cohen J, eds. Infectious Diseases Mosby. London: Harcourt Publishers Ltd. pp 501–510.
44. Biswas I, Gruss A, Ehrlich SD, Maguin E (1993) High-efficiency gene inactivation and replacement system for Gram-positive bacteria. J Bacteriol 175: 3628–3635.
45. Schubert A, Zakikhany K, Schreiner M, Frank R, Spellerberg B, et al. (2002) A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. Mol Microbiol 2: 557–569.
46. Framson PE, Nittayajarn A, Merry J, Youngman P, Rubens CE (1997) New genetic techniques for group B streptococci: high-efficiency transformation, maintenance of temperature-sensitive pWV01 plasmids, and mutagenesis with Tn*917*. Appl Environ Microbiol 63: 3539–3547.
47. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis J (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1659 p.
48. Gutekunst H, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ (2003) Analysis of RogB-controlled virulence mechanisms and gene expression in *Streptococcus agalactiae*. Infect Immun 71: 5056–5064.
49. Samen UM, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ (2006) The transcriptional regulator RovS controls the attachment of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells and the expression of virulence genes. Infect Immun 74: 5625–35.
50. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA (2002) Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Appl Environ Microbiol 68: 2950–2958.
51. Hindré T, Brüggemann H, Buchrieser C, Héchard Y (2008) Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. Microbiology 154: 30–41.
52. Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, Ghigo JM, Amorena B, et al. (2003) SarA and not $\sigma^B$ is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 48: 1075–1087.
53. Kling DE, Madoff LC, Michel JL (1999) Subcellular fractionation of group B *Streptococcus*. Biotechniques 27: 24–26.

Rim AL SAFADI

# Impact d'éléments génétiques variables sur l'expression de quatre gènes de virulence chez *Streptococcus agalactiae*


## Résumé

Nous avons étudié l'impact d'éléments génétiques variables sur l'expression de quatre gènes de virulence, *lmb*, *scpB*, *fbsA* et *fbsB*, permettant respectivement l'attachement à la laminine, à la fibronectine et au fibrinogène humain, chez *Streptococcus agalactiae*, première cause d'infections néonatales. L'étude de l'impact de la séquence d'insertion IS*1548* et de l'intron de groupe II GBSi1, insérés dans la région intergénique *scpB-lmb* en amont du gène *lmb*, sur l'expression des gènes *lmb* et *scpB*, montre que i) la structure de la région intergenique *scpB-lmb* corrèle avec les lignées phylogénétiques constituant l'espèce; ii) la présence d'IS*1548* ou de GBSi1 n'a aucune influence sur l'expression du gène *scpB*; iii) l'expression du gène *lmb* est significativement plus élevée chez les souches possédant IS*1548*; et iv) IS*1548* active directement le gène *lmb*. L'étude des propriétés de liaison au fibrinogène des souches du clone invasif CC17 par rapport aux souches des autres lignées phylogénétiques montre que i) des combinaisons spécifiques de gènes *fbs* et de leur gènes régulateurs corrèlent avec les lignées; ii) le système à deux composants RgfA/C inhibe le gène *fbsA* et active le gène *fbsB*; et iii) la protéine FbsB joue un rôle majeur dans la capacité de liaison au fibrinogène des souches de CC17.


**Mots-clés** : *Streptococcus agalactiae*, virulence, *lmb*, *scpB*, *fbsA*, *fbsB*, IS*1548*, GBSi1, *rgf*, laminine, fibrinogène


## Abstract

We studied the impact of variable genetic elements on the expression of four virulence genes, *lmb*, *scpB*, *fbsA*, and *fbsB* that allow attachment to human laminin, fibronectin and fibrinogen, respectively, in *Streptococcus agalactiae*, the leading cause of neonatal infections. The study of the impact of the insertion sequence IS*1548* and of the group II intron GBSi1, integrated in the *scpB-lmb* intergenic region upstream of the *lmb* gene, on the expression of *scpB* and *lmb* genes, showed that i) the structure of the *scpB-lmb* intergenic region correlated with the phylogenetic lineages constituting the species; ii) the presence of IS*1548* or GBSi1 had no impact on the expression of the *scpB* gene; iii) the *lmb* gene expression was significantly higher in strains with IS*1548*; and iv) IS*1548* directly activates the *lmb* gene. The study of the fibrinogen binding properties of strains of the invasive clone CC17, as compared with strains of other lineages showed that i) specific combinations of *fbs* genes and *fbs* regulator genes correlated with genetic lineages ii) the two-component system RgfA/C inhibited the *fbsA* gene and activated the *fbsB* gene; and iii) FbsB plays the major role in the fibrinogen binding ability of CC17strains.


**Keywords:** *Streptococcus agalactiae*, virulence, *lmb*, *scpB*, *fbsA*, *fbsB*, IS*1548*, GBSi1 *rgf*, laminin, fibrinogen