

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe MAUPAS »

Année 2020

N° 59

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Brice LE GALLOU né le 19 janvier 1994 à QUIMPER (29)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 23/10/2020

**Colonisation et infection materno-fœtales à *Streptococcus agalactiae* : étude épidémiologique au CHRU de Tours de 2000 à 2018.**

JURY

Président : M. le Professeur Philippe Lanotte, PU-PH, Faculté de Pharmacie et CHRU de TOURS

Membres : M. le Professeur Laurent Mereghetti, PU-PH, Faculté de Médecine et CHRU de TOURS

Mme le Docteur Cécile Le Brun, Pharmacien PH, CHRU de TOURS

Mme le Professeur Delphine Mitanchez, PU-PH, Faculté de Médecine et CHRU de TOURS

Mr le Docteur Jérôme Potin, Médecin PH, CHRU de TOURS

**ANNEE : 2020 - 2021**

**Directrice : Pr Véronique MAUPOIL**

**Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS**

**Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN**

## **ENSEIGNANTS**

### **16 PROFESSEURS**

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	PHARMACOGNOSIE
GIRAUDEAU	Bruno	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

### **3 PROFESSEURS EMERITES**

AGAFONOV	Viatcheslav	CHIMIE PHYSIQUE
GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

### **38 MAITRES DE CONFERENCES**

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUDESOCQUE-DELAZE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE



## **SERMENT DE GALIEN**

*En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;*

*D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;*

*De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;*

*De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;*

*De coopérer avec les autres professionnels de santé ;*

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

Date : 23/10/2020

L'étudiant

M. LE GALLOU Brice

Le Doyen de la Faculté  
Mme Véronique Maupoil

## **Remerciements**

**A monsieur le Professeur Philippe Lanotte,**

Je vous remercie pour la qualité de vos enseignements pratiques et théoriques, pour votre bienveillance, votre confiance accordée lors de mon passage au laboratoire de Bactériologie et finalement pour avoir accepté de juger ce travail. Vous me faites également l'honneur de présider ce jury de thèse et je vous en remercie.

**A monsieur le Professeur Laurent Mereghetti,**

Je vous remercie tout d'abord de m'avoir proposé ce sujet de thèse et de m'avoir accordé votre confiance si rapidement, pour ce travail mais également lors de mon passage au laboratoire de Bactériologie. Je vous suis également très reconnaissant du temps que vous avez pu m'accorder malgré les responsabilités qui vous incombent d'autant plus en ces temps difficiles. Ce travail conforte ma volonté de travailler avec votre équipe de recherche pour le Master 2 que je réaliserai par la suite, comme nous l'avions prévu.

**A madame le Docteur Cécile Le Brun,**

Je te remercie pour ta disponibilité et la confiance que tu m'as également accordé lors de mon passage au laboratoire de Bactériologie. Merci également pour le partage de ton savoir et la transmission de tes connaissances lors de nos échanges.

**A madame le Professeur Delphine Mitanchez,**

Vous me faites l'honneur de faire partie de mon jury ; je vous remercie de votre disponibilité et de l'intérêt que vous avez porté sur ce travail.

**A monsieur le Docteur Jérôme Potin,**

Vous me faites l'honneur de faire partie de mon jury ; je vous remercie pour votre disponibilité et pour l'intérêt que vous avez porté sur ce travail.

Je remercie également l'ensemble des techniciens et biologistes du laboratoire de Bactériologie de Bretonneau mais également de Trousseau où j'ai fait mes débuts dans la discipline.

Un grand merci tout particulièrement à Catherine qui m'a guidé d'une main de maître pour la réalisation de ce travail. Profites de tout ce temps que tu as désormais, il est mérité ! A Elodie également, pour son intérêt et ses conseils avisés.

Aux différents techniciens et biologistes des autres laboratoires du CHRU de Tours, où j'ai pu m'épanouir grâce à vous. Un grand merci à l'équipe du laboratoire de microbiologie du CHR d'Orléans pour ce semestre malheureusement bien trop court.

A tous les internes que j'ai pu côtoyer au cours de ces années à Tours et Orléans, à mes amis de fac, de Rennes et d'ailleurs, merci.

Je tiens également à remercier vivement toute ma famille, en particulier ma mère et mon père qui ont toujours été là dans les bons comme dans les mauvais moments. Ils ont été un soutien à toute épreuve tout au long de ces longues études. Un grand merci à ma petite sœur, toujours présente lorsqu'il le faut, et de plus en plus, grandir te va si bien. J'ai également une grosse pensée pour mes grands-parents.

A vous mes amis de toujours, Logan, Thibault, la prochaine fois c'est l'autre pied, à Léna, Nicolas, Simon, JP, Bastien, Fab'... Vannes ne sera jamais trop loin !

A toi Coralie, parce que je n'en serais pas vraiment là sans toi ; tu illumines mes jours et rend faisable l'impossible. A nos projets futurs !

Kenavo !

## **Table des matières**

Liste des abréviations .....	- 8 -
Liste des figures .....	- 9 -
Liste des tableaux.....	- 10 -
I. Introduction.....	- 11 -
1. Généralités sur <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	- 11 -
2. Pouvoir pathogène .....	- 12 -
1.2.1 Chez la femme enceinte .....	- 12 -
1.2.2 Chez le nouveau-né .....	- 13 -
1.2.3 Chez l'enfant de plus de trois mois et l'adulte .....	- 15 -
3. Prévention des infections .....	- 16 -
4. Résistances aux antibiotiques .....	- 18 -
5. Caractéristiques phénotypiques et génotypiques .....	- 20 -
1.5.1 Description de la capsule .....	- 20 -
1.5.2 Prévalence des sérotypes capsulaires.....	- 23 -
1.5.3 Méthodes de typage épidémiologique .....	- 24 -
1.5.4 Prévalence des complexes clonaux.....	- 26 -
6. Objectif du travail.....	- 27 -
II. Matériel et méthodes.....	- 27 -
1. Souches de <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	- 27 -
2. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	- 28 -
3. Extraction de l'ADN bactérien.....	- 28 -
4. Typage capsulaire par amplification multiplex des gènes de capsule .....	- 29 -
1.4.1 Principe de la technique.....	- 29 -
1.4.2 Protocole de PCR multiplex .....	- 30 -
1.4.3 Révélation des produits de PCR .....	- 31 -
5. Détermination du complexe clonal par analyse du polymorphisme ponctuel de séquence (SNP).....	- 32 -
1.5.1 Principe de la technique.....	- 32 -
1.5.2 Protocole de PCR en temps réel.....	- 34 -
1.5.3 Analyse des résultats.....	- 34 -
III. Résultats.....	- 35 -
1. Portage et répartition des souches .....	- 35 -

2.	Répartition des types d'infections retrouvés .....	- 35 -
3.	Prévalence des sérotypes au sein de la population étudiée .....	- 36 -
3.3.1	Diversité des sérotypes.....	- 36 -
3.3.2	Prévalence globale des sérotypes .....	- 37 -
3.3.3	Prévalence des sérotypes en fonction de l'origine des souches .....	- 38 -
4.	Prévalence des complexes clonaux .....	- 40 -
3.4.1	Analyse des profils obtenus .....	- 40 -
3.4.2	Prévalence globale des complexes clonaux .....	- 42 -
3.4.3	Prévalence des complexes clonaux en fonction de l'origine des souches-	43 -
5.	Corrélation entre sérotypes et complexes clonaux.....	- 44 -
6.	Résistances aux antibiotiques .....	- 47 -
3.6.1	Profils phénotypiques de résistance .....	- 47 -
3.6.2	Évolution de la résistance au cours du temps.....	- 51 -
3.6.3	Résistance aux antibiotiques en fonction du sérotype .....	- 53 -
3.6.4	Résistance aux macrolides en fonction du sérotype .....	- 54 -
3.6.5	Résistance aux antibiotiques en fonction du complexe clonal .....	- 56 -
3.6.6	Résistance aux macrolides en fonction du complexe clonal .....	- 58 -
IV.	Discussion .....	- 61 -
V.	Références bibliographiques .....	- 68 -

## **Liste des abréviations**

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ANAES	Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation de la Santé
C3G	Céphalosporine de 3 <sup>ème</sup> Génération
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CC	Complexe Clonal
CHRU	Centre Hospitalier Régional Universitaire
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GBS	Group B Streptococcus
HgvA	Hypervirulent GBS Adhesin
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight
MLSb	Macrolides Lincosamides Streptogramine B
MLST	MultiLocus Sequence Typing
PBP	Penicillin Binding Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
RDP	Restriction Digest Pattern
SNP	Single Nucléotid Polymorphism = Polymorphisme ponctuel de séquence
SRR	Serin rich-repeat
TBE	Tris Borate EDTA
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine



## Liste des figures

Figure 1 : Aspect de <i>Streptococcus agalactiae</i> en culture (A) (laboratoire de bactériologie du CHRU de Tours) et à la coloration de Gram (B) (Equipe BRMF) .....	- 11 -
Figure 2 : Scénario physiopathologique de l'infection néonatale à streptocoque du groupe B. Tazi et al., 2011- 15 -	
Figure 3 : Incidence des infections invasives à <i>S. agalactiae</i> en France. Epibac, 2018. ....	- 16 -
Figure 4 : Incidence des infections néonatales à <i>Streptococcus agalactiae</i> aux Etats-Unis entre 1997 et 2015, Raabe et al. 2019 .....	- 18 -
Figure 5 : Description des combinaisons de polysaccharides selon le type capsulaire. Cieslewicz et al., 2015. ....	- 21 -
Figure 6 : Gènes cps exprimés en fonction du sérotype capsulaire. Cieslewicz et al. 2015 .....	- 22 -
Figure 7 : Distribution mondiale des sérotypes capsulaires de <i>Streptococcus agalactiae</i> de colonisation maternelle. Russell et al. 2017 .....	- 23 -
Figure 8 : Bandes d'amplicons obtenues suivant le sérotype capsulaire de la souche. Imperi et al. 2010.....	- 32 -
Figure 9 : Exemple schématisé de courbes obtenues pour le SNP GlcK180. ....	- 34 -
Figure 10 : Révélation des amplicons attendus pour chaque sérotype capsulaire : 1-Ia ; 2-Ib ; 3-II ; 4-III ; 5-IV ; 6-V ; 7-VI ; 8-VII ; 9-VIII ; 10-IX . Imperi et al. 2010 .....	- 37 -
Figure 11 : Répartition globale des sérotypes .....	- 38 -
Figure 12 : Répartition des sérotypes selon l'origine des souches.....	- 39 -
Figure 13 : Répartition des sérotypes des souches d'infections néonatales.....	- 40 -
Figure 14 : Exemple de courbes obtenues pour l'échantillon 110 pour le SNP GlcK180. ....	- 41 -
Figure 15 : Répartition des complexes clonaux .....	- 42 -
Figure 16 : Répartition des complexes clonaux selon l'origine des souches.....	- 43 -
Figure 17 : Répartition des complexes clonaux des souches d'infections néonatales .....	- 44 -
Figure 18 : Répartition des sérotypes au sein des complexes clonaux .....	- 45 -
Figure 19 : Répartition des sérotypes au sein des complexes clonaux pour les souches de colonisation.....	- 46 -
Figure 20 : Répartition des sérotypes au sein des complexes clonaux pour les souches invasives.....	- 47 -
Figure 21 : Résistance moyenne aux molécules testées.....	- 48 -
Figure 22 : Résistance moyenne aux molécules testées selon l'origine des souches.....	- 49 -
Figure 23 : Répartition des différents phénotypes de résistance aux molécules testées (Dans l'ordre : Tétracycline ; Erythromycine ; Lincomycine) .....	- 50 -
Figure 24 : Répartition des phénotypes de résistances aux molécules testées selon l'origine des souches (Dans l'ordre : Tétracycline ; Erythromycine ; Lincomycine).....	- 51 -
Figure 25 : Evolution de la résistance aux antibiotiques des souches invasives au cours du temps .....	- 52 -
Figure 26 : Evolution de la résistance aux antibiotiques des souches de colonisation au cours du temps.....	- 52 -
Figure 27 : Répartition de la résistance aux antibiotiques selon le sérotype capsulaire .....	- 54 -
Figure 28 : Répartition des phénotypes de résistance aux macrolides selon le sérotype capsulaire des souches ...	- 55 -
Figure 29 : Résistances aux macrolides des souches de colonisation selon le sérotype capsulaire.....	- 56 -
Figure 30 : Résistances aux macrolides des souches invasives selon le sérotype capsulaire .....	- 56 -
Figure 31 : Résistance aux antibiotiques selon le complexe clonal .....	- 58 -
Figure 32 : Résistance aux macrolides en fonction du complexe clonal.....	- 59 -
Figure 33 : Résistance aux macrolides en fonction du complexe clonal des souches de colonisation.....	- 60 -
Figure 34 : Résistances aux macrolides en fonction du complexe clonal des souches invasives.....	- 60 -

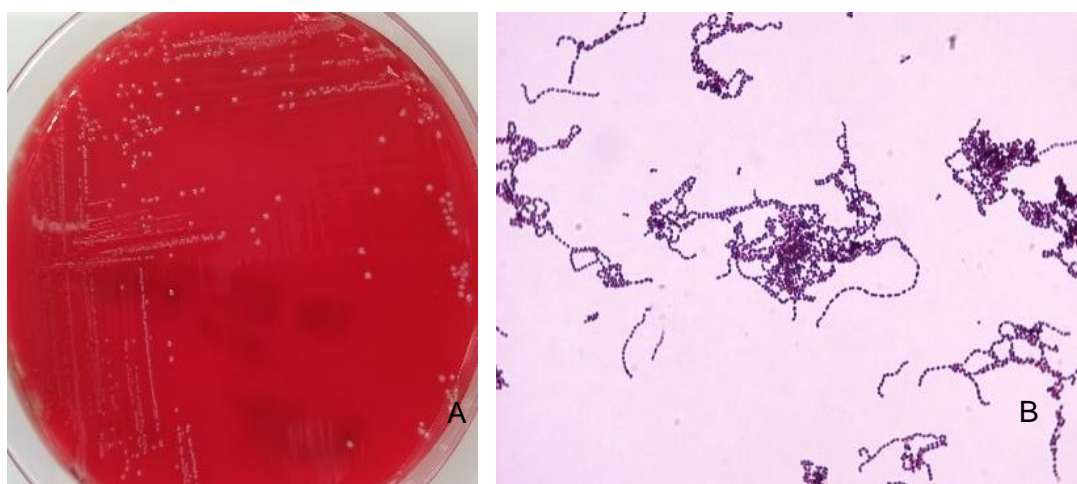
## **Liste des tableaux**

<i>Tableau 1 : Séquences nucléotidiques des amorces ciblant les gènes cps. Imperi et al. 2010 .....</i>	<i>- 30 -</i>
<i>Tableau 2 : Dessins des amorces des différents SNP. Honsa et al. 2008 .....</i>	<i>- 33 -</i>
<i>Tableau 3 : Correspondance entre les profils nucléotidiques des SNP et les complexes clonaux .....</i>	<i>- 41 -</i>

# I. Introduction

## 1. Généralités sur *Streptococcus agalactiae*

*Streptococcus agalactiae* est une bactérie de la famille des *Streptococcaceae*. La coloration de Gram montre de petits cocci Gram positif disposés en chaînettes ou en paires.<sup>1,2</sup> La classification de Lancefield (1966), qui est basée sur la nature antigénique du polyside C, composant de la structure pariétale de cette famille, permet de classer cette espèce comme streptocoque du groupe B. Leur exigence nécessite l'utilisation de géloses au sang pour leur culture. Il s'agit d'un germe anaérobie facultatif qui va donner des colonies blanches  $\beta$ -hémolytiques, bien que ce caractère soit parfois absent.



**Figure 1 : Aspect de *Streptococcus agalactiae* en culture (A) (laboratoire de bactériologie du CHRU de Tours) et à la coloration de Gram (B) (Equipe BRMF)**

*S. agalactiae* est décrit pour la première fois dans une monographie parue en 1887, par le médecin vétérinaire et microbiologiste Edmond Nocard sous le nom de « *Streptococcus de la mammite* », un nouvel agent pathogène responsable de la mammite enzootique des vaches laitières. Il est dénommé *Streptococcus agalactiae* en 1896.<sup>2</sup>

Les premiers cas rapportés en médecine humaine concernent des infections néonatales en Angleterre dans les années 1930. En effet, le docteur Lancefield rapporte d'abord des cas de colonisation vaginale, asymptomatique, par *S. agalactiae*. C'est en 1938 que des cas mettant en avant sa pathogénicité sont rapportés pour la première fois, avec trois cas d'infections mortelles du post-partum <sup>3</sup>.

Ce germe sera rarement mis en évidence avant les années 1960, période à laquelle de nombreuses infections néonatales, mais également de l'adulte, seront rapportés.<sup>4</sup> Il s'agit actuellement du premier germe responsable d'infection materno-fœtal.<sup>5</sup>

## **2. Pouvoir pathogène**

### **1.2.1 Chez la femme enceinte**

#### **- Colonisation**

*S. agalactiae* est un germe commensal occasionnel du tractus digestif et des voies génitales. Il est retrouvé de manière asymptomatique chez 5 à 30% des femmes enceintes selon les études.<sup>6-9</sup> Dans une revue récente de la littérature, incluant un peu moins de 300 000 femmes enceintes issues de 85 pays différents, un taux moyen de portage de l'ordre de 18% a été rapporté chez la femme enceinte, avec des disparités selon les régions du monde. La colonisation est moindre chez les femmes provenant des pays asiatiques (11%), comparé aux autres régions du monde telles que l'Amérique du Nord (22%), l'Europe de l'Est (20,8%), l'Afrique (18,2%). La prévalence retrouvée en Europe de l'ouest est de 15,2%.<sup>10</sup>

#### **- Infections**

Il a été montré que les femmes enceintes étaient deux fois plus à risque de développer une infection invasive à *S. agalactiae* qu'une femme non enceinte.<sup>11</sup> En effet, *S. agalactiae* peut être responsable d'infection grave chez la femme enceinte, entraînant la mort fœtale *in utero* dans 60% des cas. Il s'agit alors d'une infection de l'appareil génital haut (placenta ou cavité amniotique). Au cours de la grossesse, des bactériémies, endométrites ou chorioamniotites peuvent également survenir et dont l'issue est moins souvent fatale, mais pouvant cependant être le point de départ d'une infection néonatale suite à l'accouchement.<sup>2</sup> Ces manifestations sont le plus souvent retrouvées en péri-natal ou lors de l'accouchement, ainsi les risques d'infections du *post-partum* ne sont pas négligeables. Également, des infections du sein telles que des mastites sont régulièrement mises en évidence. Ces infections chez la femme enceinte ne reflètent pas d'état pathologique sous-jacent particulier, mais des facteurs de risque tel que l'asthme, le tabagisme, le diabète ou l'obésité ont été identifiés.<sup>12</sup>

### 1.2.2 Chez le nouveau-né

#### - Colonisation

La colonisation du nouveau-né s'effectue le plus souvent lors de l'accouchement par ingestion ou par inhalation, lorsque le bébé entre en contact avec les sécrétions vaginales de la mère colonisée. Ce contact avec *S. agalactiae* peut rester sans conséquence, avec un enfant en parfaite santé et on parle alors de colonisation. En effet, en l'absence d'antibioprophylaxie *per-partum* chez une femme enceinte colonisée, 50% à 70% des nouveau-nés seront à leur tour colonisés, et 2% d'entre eux déclareront une infection à *S. agalactiae*. Historiquement, des prélèvements de liquide gastrique étaient réalisés de manière systématique chez le nouveau-né, et certains revenaient positifs à la présence de *S. agalactiae* en culture sans qu'il n'y ait pour autant des signes d'infection. La colonisation du nouveau-né peut aussi aboutir à deux syndromes distincts : le syndrome d'infection néonatale précoce, survenant dans la première semaine de vie, et le syndrome d'infection néonatale tardive, survenant entre le 7<sup>ème</sup> jour de vie et 3 mois.

#### - Infections néonatales précoces

L'infection néonatale précoce survient dans les six premiers jours de vie, bien que la maladie se déclare le plus souvent au cours des 24 à 48 premières heures de vie dans 61% à 95 % du temps.<sup>1</sup>. L'apparition de ce syndrome a bien été corrélée avec la contamination du nouveau-né lors du contact avec les sécrétions vaginales à l'accouchement, par inhalation ou par ingestion<sup>13</sup>. Une infection ascendante *in utero* au travers des membranes placentaires est également possible. L'inhalation du liquide amniotique entraîne rapidement la colonisation de la muqueuse respiratoire du nouveau-né, puis le franchissement de l'épithélium conduit à la dissémination de la bactérie, entraînant un sepsis sévère associée à une pneumonie (*Figure 2(B)*). La symptomatologie retrouve généralement une cyanose de l'enfant, associée à une détresse respiratoire avec tachypnée ou apnée. Un ictère, une tachycardie et une hypotension peuvent y être associés, et la fièvre est en pratique toujours présente chez un enfant né à terme, mais peut être absente chez un prématuré, chez lequel une hypothermie est souvent retrouvée. Dans 80% des cas, ces signes cliniques sont le

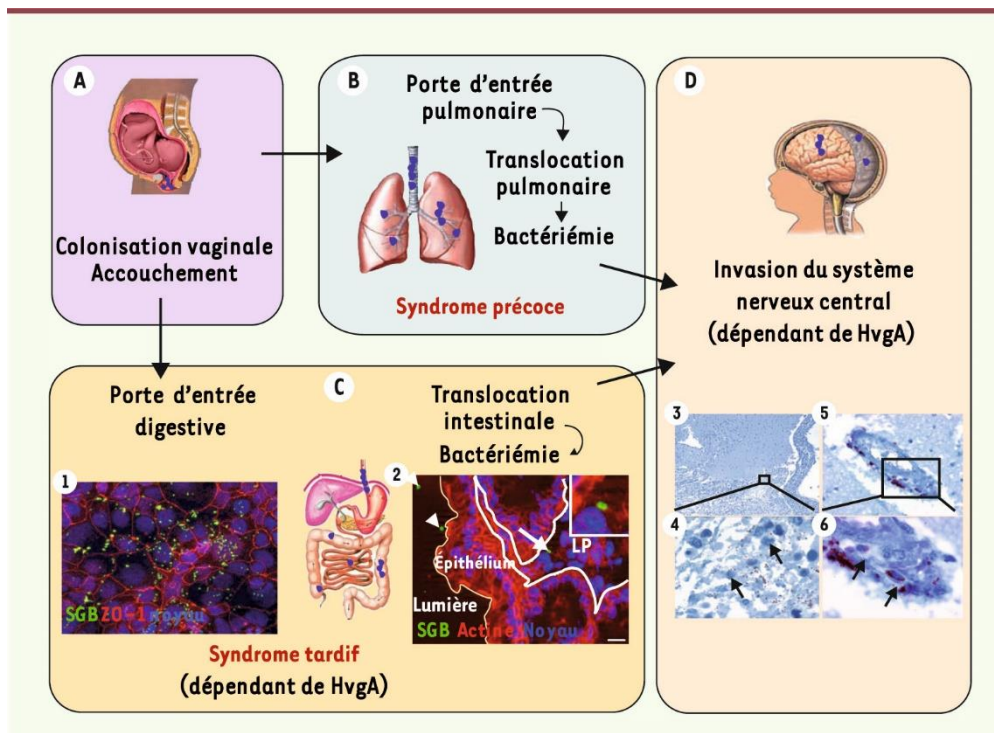
reflet d'une bactériémie, mais une pneumonie isolée (15% des cas) ou une méningite (5 à 10% des cas), associée ou non à une bactériémie, peuvent être retrouvées.

- Infections néonatales tardives

Les infections néonatales tardives surviennent à partir du 7<sup>ème</sup> jour de vie, et en général avant 3 mois, avec une présentation relativement similaire à celle d'une infection néonatale précoce. La présentation clinique la plus souvent retrouvée est également une bactériémie, cependant les cas de méningites sont beaucoup plus fréquents, jusqu'à 30% des cas.<sup>14</sup> D'autres manifestations moins communes sont retrouvées comme des ostéomyélites, le plus souvent au niveau de l'humérus proximal, des arthrites septiques de la hanche ou du genou, ou des infections des tissus mous.<sup>15</sup> Chez les prématurés ou chez les enfants immunodéprimés (VIH positif ou non), une infection à *S. agalactiae* de manifestation clinique identique peut survenir après 3 mois de vie et être considérée comme une infection néonatale tardive de par la déficience fonctionnelle de leur immunité.

La physiopathologie précise de ce syndrome reste encore méconnue, bien que la transmission materno-fœtale semble au premier plan. L'hypothèse d'une colonisation intestinale précoce du nouveau-né, suivie d'une translocation digestive plus tardive permettant l'accès à la circulation sanguine semble hautement probable.<sup>13,16,17</sup> Ce phénomène entraînerait ainsi la dissémination de la bactérie au niveau des tissus cibles tels que le système nerveux central ou les articulations, sous l'influence de divers facteurs de virulence potentiels, tel que l'adhésine HvgA. (*Figure 2 (C) & (D)*)

Les données récentes d'infections à *S. agalactiae* rapportent que le nombre d'infections néonatales précoces est en diminution, avec une incidence de 0,7 cas pour 1000 naissances en 1997, passée à 0,21 et 0,25 cas pour 1000 naissances en 2014 et 2015. L'incidence des infections néonatales tardives reste stable.



**Figure 2 : Scénario physiopathologique de l'infection néonatale à streptocoque du groupe B. Tazi et al., 2011**

Les deux encadrés (1 et 2) illustrent la localisation digestive des streptocoques du groupe B (clone ST-17) *in vitro* (1) sur des cellules intestinales Caco2 et *in vivo* (2) sur des coupes de côlon de souris infectées par voie orale avec du streptocoque du groupe B. **LP** : lamina propria. **Pointes de flèches** : bactéries intraluminales. **Flèche** : bactéries dans la lamina propria.

D. L'invasion du système nerveux central par les bactéries circulantes (quel que soit le mode de contamination initial) est favorisée par l'adhésine HvgA. Les 4 images illustrent l'analyse immuno-histopathologique du système nerveux central d'un nouveau-né décédé d'un syndrome tardif avec méningite. Les méninges (3, 4) et les micro-vaisseaux cérébraux (5, 6) sont envahis de streptocoques du groupe B révélés à l'aide d'un anticorps polyclonal spécifique de SGB (flèches).

### 1.2.3 Chez l'enfant de plus de trois mois et l'adulte

En parallèle, l'incidence des infections de l'adulte est en augmentation. Aux USA, l'incidence est passée de 3,6 cas /100 000 personnes en 1990 à 7,3 cas / 100 000 personnes en 2007.<sup>14</sup> Le même cas de figure a été mis en évidence dans plusieurs pays à travers le monde, comme au Danemark par exemple<sup>18</sup>. D'après les données de 2018 du réseau EPIBAC, les infections invasives à *S. agalactiae* concernent bien essentiellement les nouveau-nés et les adultes de plus de 65 ans (Figure 3).

Les infections retrouvées chez les adultes, hors femmes enceintes, sont principalement des bactériémies associées ou non à une endocardite, des infections urinaires ou des infections de la peau ou des tissus mous (cellulite, abcès, pied diabétique). Des infections ostéo-articulaires sont également retrouvées, comme des

ostéomyélites aiguës ou chroniques (chez le nouveau-né, l'enfant ou l'adulte), ou des monoarthrites septiques du genou, de la cheville ou de l'épaule, avec parfois infection sur bioprothèse, le plus souvent plus de 3 mois après la pose du matériel.<sup>7,19</sup>

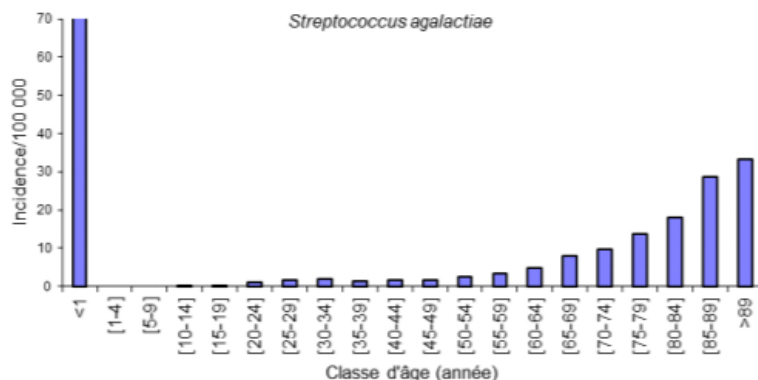


Figure 3 : Incidence des infections invasives à *S. agalactiae* en France. Epibac, 2018.

### 3. Prévention des infections

Selon les recommandations de 2001 de l'ANAES (Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation de la Santé), le dépistage systématique du portage vaginal de *S. agalactiae* est réalisé en fin de grossesse, idéalement entre la 34<sup>ème</sup> et la 38<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée. Ce dépistage se justifie par la prévalence non négligeable du portage de cette bactérie chez la femme, avec d'après leurs données de 2012 : 10% des femmes enceintes colonisées, soit 75 000 par an. D'autre part, la prévalence des infections liées à ce portage est importante et induit un problème de santé publique majeur : chorioamniotites, infections néonatales et endométrites du *post-partum*. Par ailleurs, l'efficacité de l'antibioprophylaxie guidée par ce dépistage a été démontrée, réduisant de plus de 75% les infections néonatales et les infections maternelles du *post-partum*.<sup>1,20</sup> De plus, le coût du dépistage associé ou non à l'antibioprophylaxie est bien inférieur à la prise en charge des complications, qu'il s'agisse d'un nouveau-né ou d'une mère infectée. Tous ces arguments justifient largement la mise en place de ce dépistage systématique.

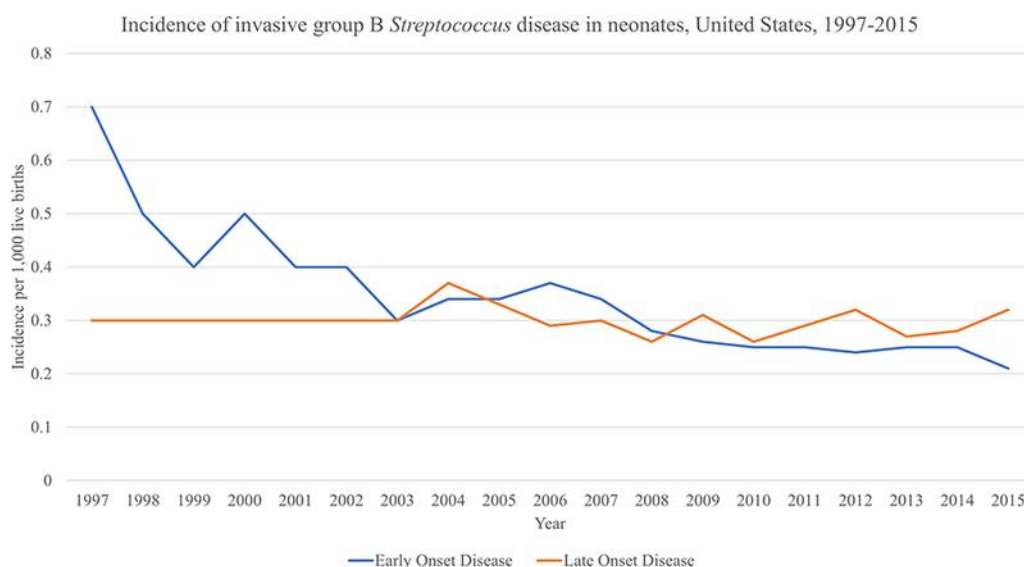
Ce dépistage est la plupart du temps réalisé par la mise en culture d'un prélèvement vaginal par écouvillonnage, bien que d'autres méthodes existent. En effet, le dépistage peut se faire par la recherche d'antigènes spécifiques de *S.*



*agalactiae* par agglutination directement entre un bouillon d'enrichissement spécifique et le réactif, ou par PCR ciblant par exemple le gène *scpB* de la C5a peptidase ou le gène *cfb* du CAMP factor.<sup>21,22</sup> Ces dernières techniques apparaissent plus sensibles dans l'étude de Rallu et al. de 2006 (21% pour la détection antigénique, 37% pour la détection par PCR vs 16% pour la culture), cependant la détection d'antigène ou d'ADN de *S. agalactiae* non viable ne peut être exclue. De plus, ces deux méthodes sont plus contraignantes et plus coûteuses pour des laboratoires n'appartenant pas à une grosse structure, justifiant le maintien de la recherche par culture en première intention.

Le dépistage par culture peut malgré tout être mis en défaut en diverses circonstances. La prise d'antibiotiques efficaces envers *S. agalactiae* ou l'utilisation de certains produits d'hygiène intime peuvent inhiber la croissance de la bactérie sur les géloses traditionnelles, rendant un résultat faussement négatif. L'inhibition de la croissance de *S. agalactiae* par la présence d'entérocoque a également été démontrée, montrant surtout la plus grande sensibilité des tests antigéniques ou de biologie moléculaire, plutôt que la mise en défaut du dépistage par culture.<sup>23</sup>

Ce dépistage, associé à l'antibioprophylaxie en cas de positivité, a grandement contribué à la réduction des infections néonatales précoces à *S. agalactiae*, qui correspondait à plus de 80% de ces infections avant leur mise en place peu avant les années 2000 (*Figure 4*). Désormais, la proportion d'infections néonatales précoces est de l'ordre de 50%, avec une incidence annuelle de 0,3 cas pour 1000 naissances vivantes. Cependant, l'antibioprophylaxie n'a pas d'impact sur la survenue du syndrome tardif, dont l'incidence reste stable à 0,4 cas pour 1000 naissances vivantes en France, malgré ces mesures de prévention.<sup>2,7</sup>



**Figure 4 : Incidence des infections néonatales à *Streptococcus agalactiae* aux Etats-Unis entre 1997 et 2015, Raabe et al. 2019**

#### 4. Résistances aux antibiotiques

En parallèle de ces méthodes préventives, la résistance de *S. agalactiae* aux divers antibiotiques utilisés évolue différemment d'une classe à l'autre. L'acquisition de résistance chez les *Streptococcaceae* est moins rapide que chez les *Enterobacteriaceae*, probablement par leur capacité moindre à la transmission horizontale de gènes. Cependant, la prévalence de certaines résistances est en augmentation. <sup>24</sup>.

La sensibilité aux  $\beta$ -lactamines et aux glycopeptides semble la plupart du temps constante, quelle que soit la souche ou l'écologie locale <sup>14,25–27</sup>. Seules des CMI élevées, notamment pour certaines molécules non utilisées en France comme le Ceftibuten (Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération utilisée par voie orale) et la ceftizoxime (retirée du marché), ont pu parfois être mises en évidence concernant de très rares souches <sup>28,29</sup>. Dans l'étude de *Campo et al.* (2019), une faible proportion de souches colombiennes (12,5%) semble résistante à la pénicilline G, mais la méthode de caractérisation est discutable car les concentrations minimales inhibitrices (CMI) n'ont pas été déterminées. Une étude japonaise de 2008 a cependant mis en évidence par des mesures de CMI, l'existence de souches de sensibilité diminuée à la pénicilline G, dont le mécanisme serait une substitution d'un ou plusieurs acides aminés au niveau de la cible de l'antibiotique : la PBP 2X. <sup>30</sup>.

La résistance aux macrolides, antibiotiques de deuxième intention, utilisés en cas d'allergie aux pénicillines, est en nette augmentation dans de nombreuses régions du monde.<sup>18,31</sup>. Des gènes exprimant des mécanismes enzymatiques sont régulièrement retrouvés, tels que les gènes *ermB*, responsable du phénotype MLSb inducible, ou plus rarement *linB* induisant une résistance isolée à la lincomycine et la clindamycine.<sup>27,32</sup>. Des mécanismes d'efflux, codé par *mefA* sont aussi retrouvé, conférant la résistance à l'érythromycine.<sup>33,34</sup>

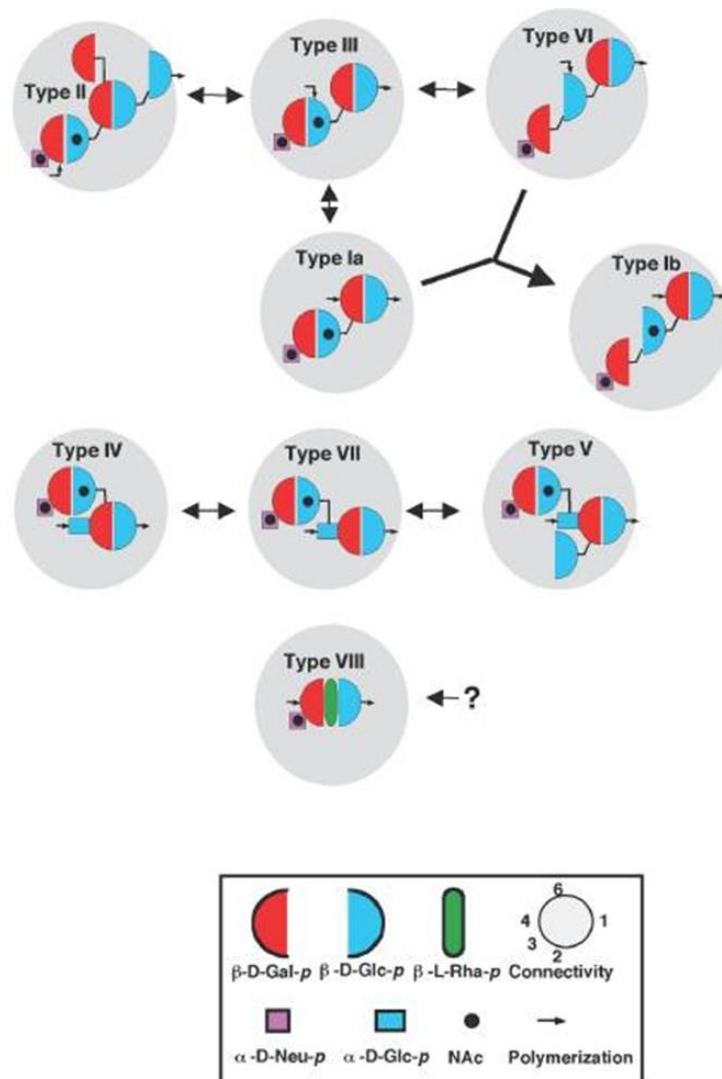
La grande majorité des souches est résistante à la tétracycline, bien que la proportion soit variable d'une étude à l'autre et en fonction des caractéristiques des souches étudiées. En effet, 80 à 95 % des souches étudiées sont résistantes à la tétracycline, généralement par un mécanisme d'efflux. Les gènes *tetO* et *tetM* codant des protéines cytoplasmiques inducible conférant une résistance par protection ribosomale sont fréquemment retrouvés.<sup>27,31</sup>.

La recherche de résistance aux fluoroquinolones est intéressante dans le cadre d'infections invasives de par leur puissante bactéricidie et leur très bonne capacité à diffuser dans les tissus profonds tels que l'os et les articulations. Cependant dans le cadre de l'antibioprophylaxie, l'intérêt est moindre car le contexte actuel justifie leur utilisation uniquement en cas de manque d'alternative. En effet, ces molécules exercent une forte pression de sélection et une apparition croissante de résistances est observée chez de nombreuses familles de bactéries, et notamment les entérobactéries comme *E. coli*, très fréquemment retrouvées en pathologie humaine<sup>35</sup>. Ainsi, la prévalence de la résistance aux fluoroquinolones retrouvée chez *S. agalactiae* est également en augmentation. Cette résistance est corrélée à l'apparition de mutations dans les gènes *gyrA* et *parC* des ADN gyrase et topoisomérase IV de la bactérie.<sup>36</sup> En Argentine, la dissémination d'un clone ST10, de sérotype Ib, a été mis en relation avec la circulation de la résistance aux fluoroquinolones, qui était de l'ordre 14,8% parmi 162 souches invasives isolées sur une année.<sup>37</sup>

## 5. Caractéristiques phénotypiques et génotypiques

### 1.5.1 Description de la capsule

La capsule de *S. agalactiae* est probablement son facteur majeur de virulence, et le seul dont l'implication a été clairement démontrée à ce jour. Il s'agit par ailleurs d'une des pistes principales à l'heure actuelle dans la recherche d'un potentiel vaccin.<sup>38</sup> Les polysaccharides capsulaires permettent à la bactérie d'échapper au système immunitaire notamment par l'inhibition de la fixation du facteur C3b du complément, nécessaire à l'activation de la voie alterne<sup>39</sup>. Ces polysaccharides sont des polymères de haut poids moléculaire composés d'unités répétées de glucose, galactose, N-acétylglucosamine et acide sialique, qui varient en composition et en nombre d'un sérotype à l'autre, leur conférant des propriétés antigéniques propres à chacun. Ces variations sont de cinq à sept répétitions d'un monosaccharide donné. Le N-acétylglucosamine, par exemple, n'est retrouvé ni chez le sérotype VIII ni chez le sérotype VI. Chez le sérotype VIII, on retrouve également du rhamnose dans la composition de la capsule.<sup>40</sup> Deux motifs de base ont été retrouvés autour desquels de petites variations confèrent la spécificité de chacun des sérotypes. Le premier correspond à un disaccharide  $\beta$ -D-Galp (1-4)  $\beta$ -D-Glcp, partagé par 8 sérotypes, et le deuxième correspond à un trisaccharide  $\alpha$ -D-NeupNAc (2-3)  $\beta$ -D-Galp (1-4) (ou 1-3)  $\beta$ -D-GlcpNAc. (Figure 5)



**Figure 5 : Description des combinaisons de polysaccharides selon le type capsulaire. Cieslewicz et al., 2015**

La présence d'acide sialique dans cette capsule, ou acide neuraminique, a été identifiée comme un facteur de virulence. Ce résidu est le saccharide terminal pour les sérotypes Ia, Ib et III. En effet, lorsqu'il est hydrolysé par des sialidases, chez des souches de sérotype III, ces dernières deviennent moins virulentes et provoquent moins d'infections néonatales chez le rat, et une augmentation de l'opsonisation et de la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles humains est observé en culture *in vitro*.<sup>41,42</sup> Ces spécificités des polysaccharides par sérotype sont très probablement liées au remplacement en bloc des différents gènes de glycosyltransférase par des séquences d'ADN qui code pour des enzymes ayant une haute spécificité de liaison à leur ligand.<sup>40</sup> Ceci suggère une transmission horizontale des gènes car ils codent des

protéines avec des fonctions similaires, tout en ayant une séquence en acides aminés très hétérogène.

Les enzymes nécessaires à la synthèse de cette capsule polysaccharidique sont codées par les gènes du locus *cps*. L'implication des gènes *cpsA* à *cpsD* a d'abord été démontrée<sup>43</sup>, dont le rôle est la stabilisation et l'attachement du polymère à la bactérie<sup>38</sup>, puis d'autres gènes conservés entre les sérotypes ont été mis en évidence comme *cpsL* et les gènes *neuBCDA*. Pour les sérotypes Ia à VII les gènes communs sont étendus aux gènes *cpsABCDEF*. Le gène *cpsG* est également un gène très conservé entre tous les sérotypes, sauf le sérotype VIII, ce qui suggère que sa fonction n'est pas séro-spécifique. La région terminale en acides aminés de *cpsG* étant très similaire à celle retrouvée chez *S. pneumoniae* type 14, on suppose qu'il s'agit d'une (1-4) galactosyltransférase permettant l'attachement du  $\beta$ -D-Galp au  $\beta$ -D-Glcp chez les sérotypes Ia à VII. En parallèle, les protéines codées par *cpsK* sont très hétérogènes d'un sérotype capsulaire à l'autre. Les protéines codées par les gènes *cpsH*, *cpsI*, *cpsJ*, *cpsM*, *cpsN* et *cpsO* sont également variable selon le sérotype. (Figure 6) Ce sont ces derniers qui servent de cible dans une PCR multiplex utilisée pour déterminer le sérotype.<sup>44</sup>. Le but de cette technique était d'obtenir une méthode plus sensible et standardisée par rapport aux méthodes usuelles d'immunodiffusion en gel ou d'agglutination en bille de latex, dépendantes de la production de la capsule par la bactérie, qui peut être faible, et très souvent issues de kit maison.

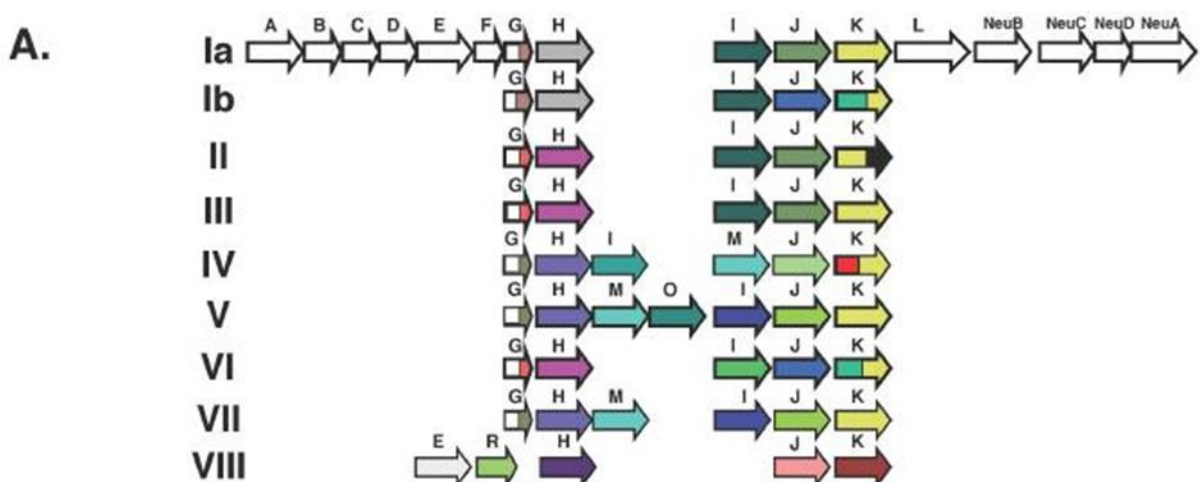


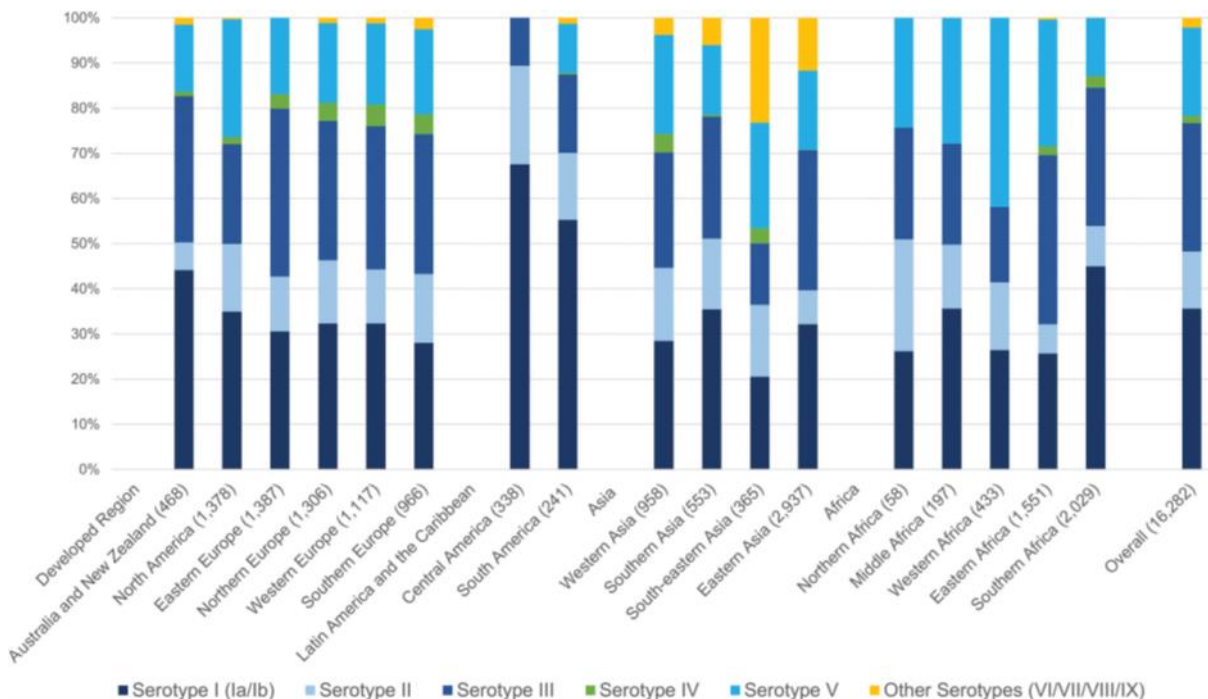
Figure 6 : Gènes *cps* exprimés en fonction du sérotype capsulaire. Cieslewicz et al. 2015

### 1.5.2 Prévalence des sérotypes capsulaires

Historiquement, *S. agalactiae* a été divisé en neuf sérotypes distincts (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII et VIII), puis un dixième (sérotipe IX) a été décrit en 2007.<sup>45</sup>

La répartition des sérotypes de *S. agalactiae* colonisant les femmes enceintes est inégale à travers le monde. En Europe et en Amérique du Nord, les sérotypes I (Ia et Ib réunis) et III sont majoritaires, suivis du sérotipe V puis du sérotipe II. Suivant les régions le sérotipe IV et les autres sont parfois retrouvés, inégalement. En parallèle, en Amérique du Sud et Centrale, les souches de sérotipe I (Ia et Ib) sont retrouvées dans plus de 50% des cas et le sérotipe II est plus fréquent. En Afrique, les souches de sérotipe V sont bien plus fréquemment retrouvées, et selon les régions au détriment du sérotipe III. En Asie, la répartition semble plus équilibrée, avec des sérotypes VI, VII, VIII, IX plus fréquents que dans les autres régions du monde.

<sup>10</sup>(Figure 7)



**Figure 7 : Distribution mondiale des sérotypes capsulaires de *Streptococcus agalactiae* de colonisation maternelle. Russell et al. 2017**

Les souches invasives appartiennent majoritairement au sérotipe III dans la plupart des études concernant les infections néonatales. Les sérotypes Ia, Ib, II et V sont également retrouvés, surtout lorsqu'il s'agit d'infections néonatales précoces.<sup>7,31</sup>

Concernant les infections chez les adultes (femmes enceintes exclues), les sérotypes invasifs prédominants sont les sérotypes V, III, Ia, II et éventuellement Ib, avec des proportions variant suivant les études.<sup>31,46,47</sup>

Une technique de sous-typage des souches de sérotypes III par l'analyse de deux Single Nucleotid Polymorphism (SNP) au niveau des régions *cps* (Entre la fin de la région 3' de *cpsE-cpsF* et la fin de la région 5' de *cpsG*) a été développée.<sup>48</sup> Ainsi la majorité des souches de sous-types III-1, provenant équitablement de souches de colonisation et de souches invasives, appartiennent au ST-19, et les souches de sous-type III-2 appartiennent au ST17, ces dernières corrélées aux infections néonatales tardives.<sup>49</sup> En effet, en Australie par exemple, les sérotypes Ia, V et III-1 sont les sérotypes les plus fréquemment retrouvés concernant les souches invasives provenant de tout type de patients. Cependant, concernant les infections néonatales tardives, et dans une moindre mesure les infections néonatales précoces également, le sous-type III-2 est retrouvé en grande majorité.<sup>50</sup>

### **1.5.3 Méthodes de typage épidémiologique**

Les techniques de typage utilisées pour étudier l'épidémiologie des souches bactériennes et en particulier celle de *S. agalactiae* ont beaucoup évolué. Le sérotypage capsulaire comme décrit précédemment a grandement contribué aux études descriptives des souches de *S. agalactiae* et est encore largement utilisé. Afin de distinguer plus précisément les variations entre les souches, au sein même des sérotypes, de nombreuses techniques alternatives et complémentaires ont été développées telles que l'utilisation de l'électrophorèse en champ pulsé ou l'utilisation d'enzymes de restriction avec l'analyse des polymorphismes des fragments. Par exemple, l'électrophorèse en champ pulsé, associée à l'analyse par PCR du gène *hylB* de la hyaluronate lysase, a notamment permis de mettre en évidence un groupe génétique homogène de souches responsables d'infections invasives, et notamment de méningites.<sup>51</sup> Cette méthode permet de rassembler les souches en groupes de clones, pouvant donner une approche du complexe clonal (CC), classiquement déterminé par MLST, de ces dernières.<sup>52</sup> Différentes techniques de typage par l'utilisation d'enzymes de restriction existent. Ces techniques mettent en œuvre la fragmentation de l'ADN bactérien par utilisation d'enzymes de restriction, puis l'analyse du polymorphisme de ces fragments par électrophorèse. Ceci permet le



typage des souches en motif de restriction, ou Restriction Digest Pattern (RDPs).<sup>53–55</sup>. Kong *et al.* en 2003 présente une nouvelle alternative : une technique de génotypage par analyse d'éléments génétiques mobiles.<sup>56</sup>

La référence actuelle pour le typage de *S. agalactiae* est la technique MLST (MultiLocus Sequence Typing). Elle est particulièrement adaptée à la réalisation d'études épidémiologiques de souches bactériennes et a été mise en place initialement pour *N. meningitidis* et *S. pneumoniae*, avant d'être adaptée à *S. agalactiae*. Il s'agit de séquencer de manière précise sept gènes de ménages codant des enzymes du métabolisme de la bactérie (*adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK* et *tkt*), sur environ 500 paires de bases. Pour chacun de ces gènes, chaque séquence obtenue est identifiée par un numéro d'allèle unique, et la combinaison des sept numéros obtenus, après comparaison aux bases de données informatiques mondiales, permet d'attribuer à une souche donnée un Sequence-Type (ST).<sup>21</sup>. Grâce à l'algorithme eBURST (<https://www.mlst.net/eburst/>), les ST peuvent être regroupés en complexes clonaux (CC) qui rassemblent l'ensemble des ST ayant au moins 6 allèles sur 7 en commun.

Plus récemment, l'analyse des séquences du locus CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat), système de défense immunitaire adaptatif de nombreuses bactéries dont *S. agalactiae* a été proposé comme alternative à ces méthodes<sup>57,58</sup>. Cette technique semble bien plus discriminante et plus rapide que les alternatives historiques, dont la technique de référence : le MLST. En effet, pour deux souches différentes par analyse du locus CRISPR, la technique MLST peut ne pas différencier ces dernières. Dans le cadre d'infection materno-fœtale, cette analyse permet également d'observer d'éventuelles différences entre la souche retrouvée chez la mère et celle retrouvée chez le nouveau-né, liées aux éventuelles rencontres avec des éléments étrangers dans l'environnement vaginal.

Le séquençage génome entier, plus long et plus coûteux, mais plus précis, peut également être utilisé pour le typage des souches de *S. agalactiae*.<sup>59</sup>. D'autres alternatives sont à l'étude, plus ciblées envers les complexes clonaux d'intérêt clinique comme l'utilisation d'une technique de routine : la spectrométrie de masse MALDI-TOF, avec laquelle la recherche de pics d'intensités spécifiques permettrait d'identifier le CC17 en particulier.<sup>69</sup>

#### 1.5.4 Prévalence des complexes clonaux

Les complexes clonaux se caractérisent par des différences de pouvoir pathogène mais également de tropisme d'hôte. D'après Jones et al., les CC1 et CC10 sont très proches phylogénétiquement, et sont composés majoritairement de souches de colonisation, de sérotypes variées, rencontrées chez l'Homme et l'animal, bien qu'elles puissent parfois être pathogènes. Le CC19 est composé de souches strictement humaines et représente la majorité des souches de colonisation de sérotype III n'appartenant pas au CC17.<sup>21,49</sup>

Les ST retrouvés parmi les souches responsables d'infections néonatales, appartiennent principalement aux CC17, CC10, CC19, CC23 et CC1.<sup>31</sup> Parmi ces derniers, les souches appartenant au ST-17 sont caractérisées par leur hypervirulence en raison de leur fréquente implication dans les infections invasives, en particulier néonatales.<sup>31</sup> Ces souches sont peu représentées dans les infections de l'adulte.

Une des caractéristiques de ce clone est l'expression d'une adhésine, une glycoprotéine « Serin rich-repeat », codée par le gène *Srr2*, lui permettant d'augmenter sa capacité d'adhésion à l'épithélium vaginal.<sup>60</sup> De plus, cette adhésine lui permettrait de se lier aux protéines plasmatiques circulantes telles que le fibrinogène et le plasminogène, induisant ainsi sa dissémination. Les bactéries formeraient ainsi des agrégats autour de ces protéines, induisant ainsi l'endocytose par les phagocytes. *Srr2* rendrait la bactérie résistante à la phagocytose, lui permettant de persister et ensuite d'envahir les tissus.<sup>61</sup> D'autres marqueurs de surface ont été mis en relation avec l'hypervirulence de cette souche, comme *hvgA* par exemple, lui permettant de coloniser de manière précoce le tube digestif du nouveau-né par adhésion aux cellules de l'épithélium intestinale. Cette protéine aurait également un tropisme pour les cellules endothéliales des capillaires cérébraux et pour les cellules épithéliales des plexus choroïdes constituant la barrière hémato-encéphalique. L'expression de cette protéine exercerait un rôle important dans l'apparition d'infection néonatale tardive par translocation à distance de l'accouchement, puis passage de la barrière hémato-encéphalique.<sup>13,31</sup>

## **6. Objectif du travail**

L'objectif de ce travail a été d'effectuer un suivi épidémiologique des souches de *S. agalactiae* responsables de colonisation vaginale chez la femme enceinte et impliquées dans les infections chez ces dernières et chez les nouveau-nés. Ce travail a été réalisé en caractérisant des souches de *S. agalactiae*, isolées de prélèvements d'intérêt au laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHRU de Tours entre 2000 et 2018, par sérotypage moléculaire, détermination de leur complexe clonal et détermination de leur phénotype de résistance aux antibiotiques.

Dans un précédent travail, une alternative au MLST basée sur l'analyse du polymorphisme ponctuel de séquence (Single Nucleotid Polymorphism ou SNP) et décrite par *Honsa et al.*, a été mise en place au laboratoire. Cette technique ne permet pas d'identifier le sequence-type de manière précise mais permet de déterminer le complexe clonal par PCR sur des régions d'intérêt qui sont discriminantes. En parallèle, une technique de PCR multiplex a été mise en place afin de déterminer le sérotype capsulaire des souches étudiées.

## **II. Matériel et méthodes**

### **1. Souches de *Streptococcus agalactiae***

Le travail a porté sur 508 souches de *S. agalactiae* isolées au laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHRU de Tours entre le 1<sup>er</sup> janvier 2000 et le 31 décembre 2018. L'étude de 269 souches isolées entre le 1<sup>er</sup> juillet 2010 et le 31 décembre 2018 est venue compléter un travail précédemment réalisé sur 239 souches isolées entre le 1<sup>er</sup> janvier 2000 et le 30 juin 2010.<sup>70</sup>

La sélection des souches a été effectuée à partir d'une extraction du système informatique de laboratoire qui a permis d'identifier 6997 prélèvements positifs pour la culture de *S. agalactiae* entre 2010 et 2018, tous prélèvements confondus.

Parmi tous ces prélèvements positifs, la sélection a été effectuée sur l'ensemble des prélèvements issus de nouveau-nés et de femmes enceintes. Ainsi, 43 souches provenant d'hémocultures, 7 provenant de liquide céphalo-rachidien ou 11 provenant d'autres liquides normalement stériles (liquide articulaire, abcès du sein et liquide péritonéal) ont pu être identifiés et constituent la base des souches invasives.

L'intégralité des prélèvements de placenta positifs à *S. agalactiae* a été incluse dans l'étude, et ont été réparties parmi les souches invasives ou de colonisation selon la clinique de la patiente et de son enfant.

Concernant les liquides gastriques de nouveau-né, une sélection aléatoire d'un prélèvement par mois lorsque cela était possible a été réalisée. Ces souches ont ensuite été réparties parmi les souches invasives ou de colonisation selon la clinique de l'enfant.

Afin de compléter la collection des souches de colonisation, un à deux prélèvements vaginaux positifs pour la culture de *S. agalactiae* par mois provenant des services d'obstétrique (hospitalisation et consultations externes) du centre Olympe de Gouges du CHRU de Tours ont été sélectionnés au hasard.

## **2. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques**

Un antibiogramme par diffusion en milieu gélosé a été réalisé pour chacune des 269 nouvelles souches étudiées. Considérant qu'il n'existe pas de résistances acquises aux bêta-lactamines et aux glycopeptides pour *S. agalactiae*, seules l'érythromycine, la lincomycine et la tétracycline ont été testées pour chaque souche. A partir d'une culture de 24 heures, une suspension en eau stérile de 0.5 McFarland a été préparée, permettant ainsi l'ensemencement par écouvillonnage d'une gélose Mueller-Hinton additionnée de 5% de sang de cheval défibriné et 20 mg/L de  $\beta$ -NAD (Gélose MH-F). Les géloses ont été incubées 24 heures à 35 +/-2 °C en atmosphère enrichie de 5% de CO<sub>2</sub>. Les résultats ont été interprétés selon les recommandations 2019 du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) et de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Les souches étaient caractérisées sensibles à la tétracycline, l'érythromycine et la lincomycine lorsque leur diamètre d'inhibition était supérieur ou égal respectivement à 23 mm, 21 mm et 21 mm. Devant une souche résistante à l'érythromycine et sensible à la lincomycine, le caractère inductible de cette résistance a été recherchée par la mise en évidence d'un antagonisme érythromycine-lincomycine (D-test).

## **3. Extraction de l'ADN bactérien**

Les souches, conservées au laboratoire à -80°C, ont été ensemencées sur une gélose trypticase-soja additionnée de 5% de sang de cheval (gélose TSH, BioMérieux), et incubées 24 heures à 37°C en aérobose. Après 24 heures

d'incubation, une suspension bactérienne dense en eau stérile a été réalisée à partir des colonies isolées (1,5 McFarland), à partir de laquelle 500 µL ont été prélevés et auxquelles 50 µL de mutanolysine (Sigma Aldrich) à 1 000 U/mL ont été additionnés. Cette solution a été incubée durant 1 heure à 56°C au bain-marie à sec, puis 10 minutes à 100°C avant d'être plongée dans la glace pour stopper la réaction. Après centrifugation durant 3 minutes à 15 000 G, le surnageant contenant l'ADN extrait a été collecté puis conservé à 4 °C avant utilisation ou alors à -20°C lorsque la suite des manipulations était effectuée un jour ultérieur.

#### **4. Typage capsulaire par amplification multiplex des gènes de capsule**

##### **1.4.1 Principe de la technique**

La méthode de génotypage capsulaire utilisée a été décrite par *Imperi et al.* en 2010<sup>44</sup>. Il s'agit d'une technique de PCR multiplex ciblant différents gènes de la région *cps* impliqués dans la synthèse du polysaccharide capsulaire. Ces différents gènes de la région *cps* sont ciblés par 19 amorces. Les amorces *cpsL-F* et *cpsL-R* ciblent une partie d'un gène conservé chez *S. agalactiae* (*cpsL*), ainsi les amplicons obtenus sont identiques pour tous les sérotypes et servent de contrôle interne à la réaction. Les autres amorces ciblent des régions variables de *cps*. Les dessins des amorces sont représentés dans le Tableau 1. Les amplicons sont ensuite identifiés après migration en gel d'agarose, et la combinaison obtenue pour une souche détermine son sérotype.

	Primer name	sequence 5' → 3'
1	cpsI-Ia-6-7-F	GAATTGATAACTTTTGTGGATTGCGATGA
2	cpsI-6-R	CAATTCTGTCGGACTATCCTGATG
3	cpsI-7-R	TGTCGCTTCCACACTGAGTGTGA
4	cpsL-F	CAATCCTAAGTATTTTCGGTTCATT
5	cpsL-R	TAGGAACATGTTTCATTAACATAGC
6	cpsG-F	ACATGAACAGCAGTTCAACCGT
7	CpsG-R	ATGCTCTCCAACTGTTCTTGT
8	CpsG-2-3-6-R	TCCATCTACATCTTCAATCCAAGC
9	CpsN-5-F	ATGCAACCAAGTGATTATCATGTA
10	CpsN-5-R	CTCTTCACTCTTTAGTGTAGGTAT
11	CpsJ-8-F	TATTTGGGAGGTAATCAAGAGACA
12	CpsJ-8-R	GTTTGGAGCATTCAAGATAACTCT
13	cpsJ-2-4-F	CATTATTGATTTCAGACGATTACATTGA
14	cpsJ-2-R	CCTCTTTCTCTAAAATATTCCAACC
15	cpsJ-4-R	CCTCAGGATATTTACGAATTCTGTA
16	cpsI-7-9-F	CTGTAATTGGAGGAATGTGGATCG
17	cpsI-9-R	AATCATCTTCATAATTTATCTCCCATT
18	cpsJ-Ib-F	GCAATTCTTAACAGAATATTTCAGTTG
19	cpsJ-Ib-R	GCGTTTCTTTATCACATACTCTTG

Tableau 1 : Séquences nucléotidiques des amorces ciblant les gènes cps. Imperi et al. 2010

#### 1.4.2 Protocole de PCR multiplex

Le mélange réactionnel était constitué de 5µL de tampon de PCR (5X Green GoTaq® Flexi Buffer, Promega), 2,75 µL d'eau, 5µL d'un mélange équimolaire de dNTP (1mM), 2µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM, Promega), 0,2 µL de TaqADN polymérase (5U/µL GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase, Promega) et de 0,25 µL (soit 250 nM) de chacune des amorces (25µM, Eurogentec), sauf pour les amorces cpsI-Ia-6-7-F et cpsI-7-9-F,

utilisées à 400 nM, soit 0,4 µL. Pour obtenir un volume final de 25 µL, 5µL d'extrait d'ADN était ajouté à ce mélange réactionnel.

Après une étape de dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, 40 cycles ont été programmés. Les 15 premiers cycles comprenaient une minute de dénaturation à 95°C, une minute d'hybridation à 54°C et deux minutes d'élongation à 72°C. Les 25 cycles suivants comprenaient une minute de dénaturation à 95°C, une minute d'hybridation à 56°C et deux minutes d'élongation à 72°C. Une élongation finale de 10 minutes à 72°C conclue cette PCR.

#### **1.4.3 Révélation des produits de PCR**

Une migration sur un gel d'agarose à 1,5% est nécessaire à la révélation des amplicons obtenus. Ce gel était préparé avec 1,5g d'agarose standard (Euromedec) dans 100mL de tampon TBE 1x (Tris Borate EDTA Buffer 10X) auquel on ajoutait 2µL d'un agent permettant la détection des acides nucléiques, le clearsight DNA Stain (Euromedex). Un dépôt de 6µL d'un marqueur de taille était déposé à chaque extrémité du gel (Bench Top 100pb DNA Ladder, Promega), et 10 µL du produit de PCR était déposé pour les échantillons. La migration électrophorétique était effectuée pendant 1h30 à 100V en tampon TBE 1X. La transillumination UV permettait de révéler les bandes correspondantes aux produits d'amplification, ainsi en comparant les bandes obtenues pour les différentes tailles en paires de base, un sérotype a pu être attribué aux différentes souches (*Figure 8*).

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

Figure 8 : Bandes d'amplicons obtenues suivant le sérotype capsulaire de la souche. Imperi et al. 2010

## 5. Détermination du complexe clonal par analyse du polymorphisme ponctuel de séquence (SNP)

### 1.5.1 Principe de la technique

Un SNP (Single nucleotid polymorphism) est une variation ponctuelle d'un seul nucléotide sur une séquence d'ADN connue, commune à des êtres vivants d'une même espèce. Ces SNP donne lieu à un polymorphisme déterminant 2, 3 ou 4 allèles pour une même séquence. Le plus souvent, 2 allèles sont décrits. *Honsa et al.* <sup>62</sup> ont déterminé 4 SNP permettant de déterminer le complexe clonal des souches de *S. agalactiae*. L'utilisation d'un logiciel (Minimum SNPs, version 2043) <sup>63</sup> a permis de définir 4 SNP informatifs après alignement et comparaison des séquences de 7 gènes de ménage issus de la base de données MLST. Pour ce faire, 3 méthodes ont été testées. L'algorithme « Not-N method » a été utilisé pour *S. agalactiae*. Cette fonction a pour intérêt de minimiser le nombre de faux négatifs lors de la détermination des SNP informatifs à la discrimination des différents ST d'un micro-organisme. En effet,



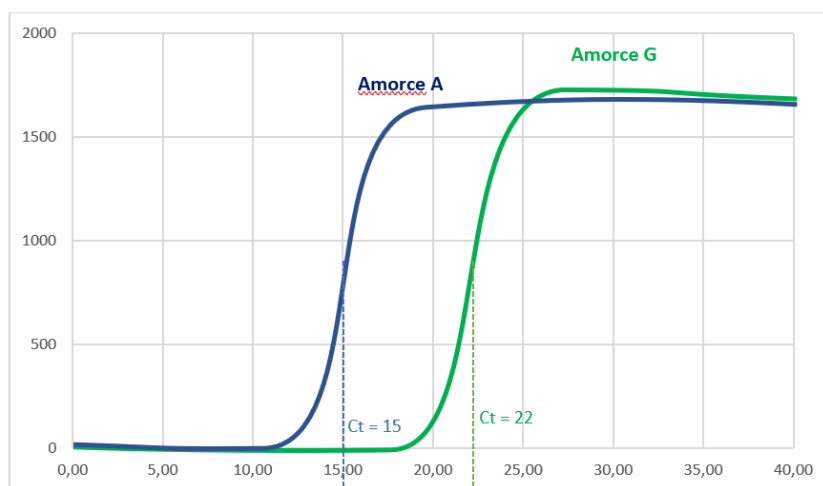
l'approche « D-method », permettant de différencier chaque ST connu, n'est pas la plus optimale pour *S. agalactiae*. Pour un pouvoir discriminant identique aux autres espèces bactériennes testées, il faudrait un nombre plus important de SNP.

Les SNP choisis par *Honsa et al.* se situent sur 3 des 7 gènes de ménage de *S. agalactiae* (Glutamine synthétase : *glnA36* et *glnA429* ; Glucose kinase : *glcK180* ; Alcool déshydrogénase : *adhP111*). Dans cette étude, une technique de PCR en temps-réel allèle-spécifique permet de déterminer le polymorphisme de ces différents SNP. Des amorces communes et complémentaires de chacun des polymorphismes ont été dessinées et sont représentées Tableau 2. Ces amorces permettent l'amplification d'une partie des gènes de ménage, d'une centaine de paires de base.

SNP	Primer Name	Primer Sequence (5' – 3')
<i>glnA36</i>	<i>glnA36-C</i>	ATATCCTGATTTAGATACTTGGATTCTC
	<i>glnA36-T</i>	ATATCCTGATTTAGATACTTGGATTCTT
	<i>glnA36-Rev</i>	TCTCCTTCTGCTGTATAGATATCACA
<i>glnA429</i> <sup>1</sup>	<i>glnA429-G</i> <sup>1</sup>	TTGTTTTAACAACCAATTTAAATAATTGAATC
	<i>glnA429-A</i>	TTGTTTTAACAACCAATTTAAATAATTGAATT
	<i>glnA429-For</i>	AAGTAGCAGTTGGACAGGATGAAA
<i>glcK180</i>	<i>glcK180-A</i>	GGCTGATACTCAAGAAGTAGGTTAA
	<i>glcK180-G</i>	GGCTGATACTCAAGAAGTAGGTTAG
	<i>glcK180-Rev</i>	ACCAAGTGCTGCAACATTAGC
<i>adhP111</i>	<i>adhP111-G</i>	TTGCATGGTTCTTTGAATGG
	<i>adhP111-A</i>	TTGCATGGTTCTTTGAATGA
	<i>adhP111-T</i>	TTGCATGGTTCTTTGAATGT
	<i>adhP111-Rev</i>	CAAAGCGTCTCACGTCCTGT

Tableau 2 : Dessins des amorces des différents SNP. Honsa et al. 2008

Pour chaque isolat, deux ou trois réactions de PCR par SNP ont été réalisées en utilisant à chaque manipulation une des amorces spécifiques avec l'amorce commune. Un nombre de cycle de PCR permettant d'atteindre une fluorescence seuil (Ct) a été déterminé pour chacune des réactions. En effet, lorsque le couple amorce/ADN cible présente un mésappariement, la réaction est ralentie en comparaison avec le couple sans mésappariement. Pour chaque polymorphisme, la réaction utilisant l'amorce spécifique de l'allèle portée par la souche présente le Ct le plus faible.



**Figure 9 : Exemple schématisé de courbes obtenues pour le SNP GlcK180.**  
 La PCR est positive en 15 cycles pour l'amorce A, et en 22 cycles pour l'amorce G pour cette souche. L'allèle porté par la souche est celle qui sort avec le plus faible Ct, soit l'allèle A

### 1.5.2 Protocole de PCR en temps réel

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un thermocycleur DTLite Real-Time PCR System (DNA technology). Pour un volume final de 20µL, le mélange réactionnel était composé de 8,3µL de Premix Ex Taq® (Perfect real Time, TaKaRa), 8µL d'eau, 1,7µL de SYBR® Green, 0,5µL (soit 5pmol) de chaque amorce (Eurogentec) ainsi que 1µL d'extrait d'ADN. Les plaques 96 puits ont été centrifugé 5 minutes à 3000 tours par minute après le dépôt du mélange réactionnel (centrifugeuse Thermo Scientific). Le programme d'amplification était le suivant : 30 secondes à 95°C puis 40 cycles comprenant chacun 5 secondes à 95°C (dénaturation) et une minute à 60°C (hybridation/élongation). Une étape finale (augmentation progressive de la température de 60°C à 95°C) a été réalisée afin d'obtenir une courbe de dissociation. Pour le SNP glnA429, le protocole était différent. La quantité d'amorces dans le mélange était doublée (10pmol), soit 1µL par amorce, et la température d'hybridation des amorces était de 65°C.

### 1.5.3 Analyse des résultats

Lors de ces réactions de PCR, la fluorescence émise par le SYBR® Green est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation. Cela permet le suivi cycle par cycle de l'amplification de l'extrait d'ADN. Un seuil de fluorescence a été déterminé et fixé dans un précédent travail. Ce seuil de fluorescence a été fixé afin qu'il coupe toutes les cinétiques en un point de leur phase exponentielle. L'intersection des courbes de PCR

avec ce seuil a permis de déterminer le cycle seuil ou Ct (Cycle threshold) pour chaque réaction, traduisant la positivité de la réaction. Pour chaque échantillon, les Ct obtenus pour chaque amorce spécifique ont été comparés, SNP par SNP, afin d'identifier les 4 nucléotides permettant la détermination du complexe clonal de la souche.

### **III. Résultats**

L'ensemble des résultats présentés correspondent d'une part à l'analyse des souches isolées au laboratoire entre juillet 2010 et décembre 2018 par les différentes techniques évoquées, puis à l'analyse globale de l'ensemble des données retrouvées au cours de notre travail et de celui de Dorine BOUVET en 2010.<sup>70</sup>

#### **1. Portage et répartition des souches**

Afin d'évaluer le portage vaginal chez la femme enceinte au CHRU de Tours, l'analyse informatique des recherches spécifique de *S. agalactiae* dans les prélèvements vaginaux effectués entre le 1<sup>er</sup> juillet 2010 et le 31 décembre 2018 a été effectuée : parmi 29 564 prélèvements, 2907 sont revenus positifs. Ainsi le portage de *S. agalactiae* au CHRU de Tours est estimé à 10% des femmes enceintes.

La sélection de 104 souches issues de ces prélèvements vaginaux représente la majorité des souches de colonisation. Parmi les 22 placentas positifs, 11 ont été classés en souches invasives et 11 en souches de colonisation. Parmi les 82 souches de liquide gastrique sélectionnées, 18 souches ont été classées dans les souches invasives car posant le diagnostic d'infection materno-fœtale. Les 64 souches restantes ont été classées parmi les souches de colonisation. Le nombre total de souches de colonisation est ainsi de 179.

En plus de certains placenta et liquides gastriques, les souches invasives sont représentées principalement par 43 souches provenant d'hémocultures, 7 provenant de liquide céphalo-rachidien et 11 provenant d'autres liquides normalement stériles (liquide articulaire, abcès du sein et liquide péritonéal). Le nombre final de souches invasives isolées entre 2010 et 2018 est de 90 souches.

#### **2. Répartition des types d'infections retrouvés**

Concernant les souches invasives, 31,1% d'entre elles ont été isolées dans le cadre d'infections néonatales tardives et 37,8% dans le cadre d'infections néonatales précoces. Les souches restantes ont été isolées dans le cadre de mort fœtale *in utero*

liée à une chorioamniotite pour 5,6 % d'entre elles, dans le cadre d'infection maternelle pour 22,2% d'entre elles, et enfin 3 souches objectivées *a posteriori* non liées à une infection materno-fœtale ont été incluses : une bactériémie chez une enfant atteinte d'une leucémie aiguë lymphoblastique, une infection digestive et une mastite chez des femmes non enceintes.

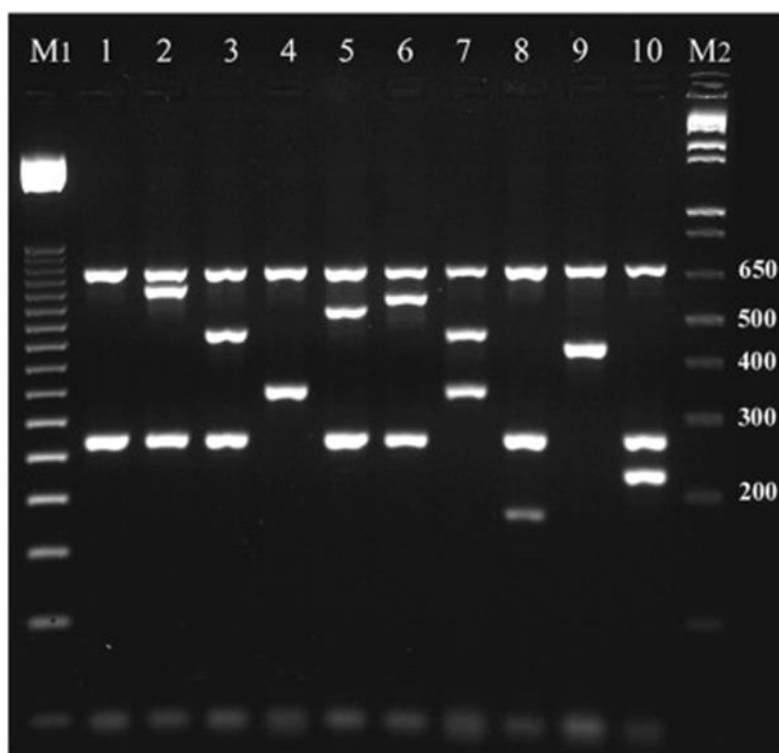
Concernant l'ensemble des infections néonatales entre 2000 et 2018, en incluant les morts fœtales *in utero*, les souches se répartissent de la manière suivante : 50,5% issues d'infections néonatales précoces, 41,6% issues d'infections néonatales tardives et 7,9% issues dans le cadre d'une mort fœtale *in utero*.

### **3. Prévalence des sérotypes au sein de la population étudiée**

La technique de génotypage capsulaire utilisée a permis de typer 268 des 269 nouvelles souches de notre étude. Une seule souche de colonisation issue d'un liquide gastrique n'a pu être typée.

#### **3.3.1 Diversité des sérotypes**

Pour chacun des types capsulaires existant, les produits de PCR obtenus diffèrent en taille et/ou en nombre. La révélation attendue des amplicons en fonction du sérotype est présentée dans la *Figure 10*.

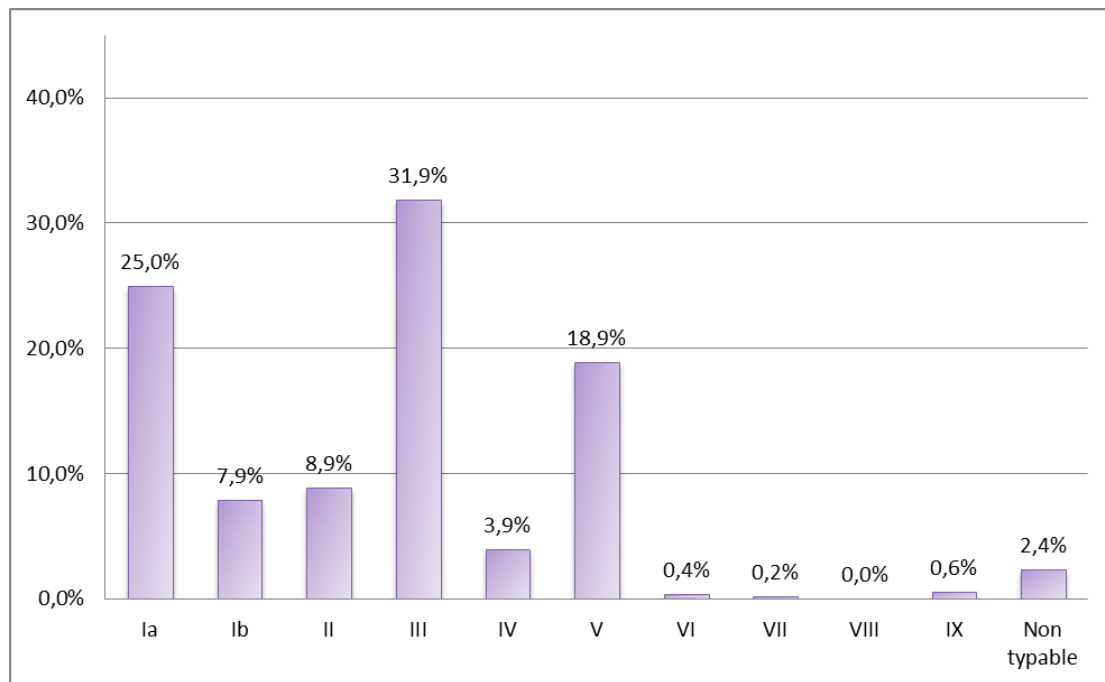


**Figure 10 : Révélation des amplicons attendus pour chaque sérotype capsulaire : 1-Ia ; 2-Ib ; 3-II ; 4-III ; 5-IV ; 6-V ; 7-VI ; 8-VII ; 9-VIII ; 10-IX . Imperi et al. 2010**

Dans notre étude, huit types capsulaires ont été mis en évidence parmi les 10 connus. Entre 2010 et 2018, nous n'avons pas mis en évidence de sérotype VII ni de sérotype VIII. Entre 2000 et 2010, neuf types capsulaires différents avaient été retrouvés : une souche de sérotype VII avait été mise en évidence en plus des sérotypes Ia, Ib, II, III, IV, V, VI et IX.<sup>70</sup>

### **3.3.2 Prévalence globale des sérotypes**

Les sérotypes III, Ia et V sont prédominants dans notre étude. Les sérotypes Ib et II correspondent chacun à moins de 10% des souches, et le sérotype IV correspond à moins de 5 % des souches. Les autres sérotypes (VI, VII, VIII, IX) et les souches non typées sont très minoritaires. (Figure 11)

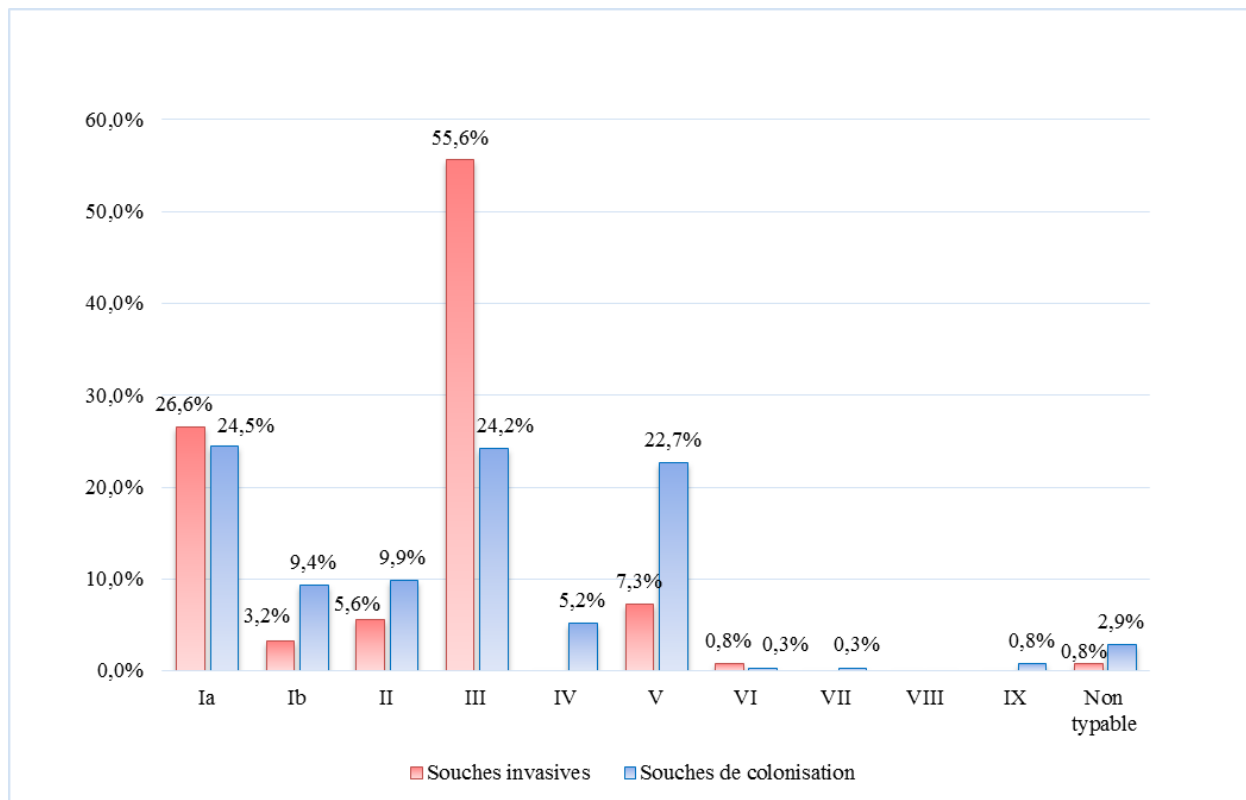


*Figure 11 : Répartition globale des sérotypes*

### 3.3.3 Prévalence des sérotypes en fonction de l'origine des souches

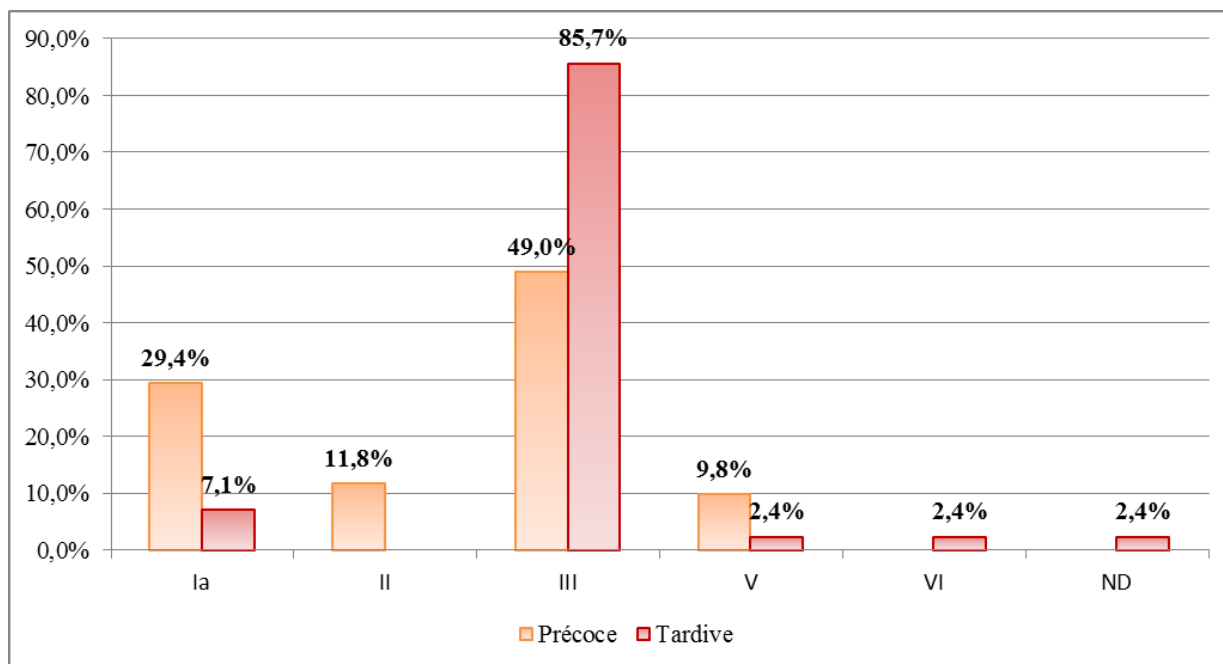
Concernant les souches de colonisation, la répartition des sérotypes est superposable à la prévalence globale. Les sérotypes majoritaires (Ia, III et V) se répartissent cependant de manière plus équilibrée.

Concernant les souches invasives, la grande majorité est représentée par le sérotype III (55,6%), suivi du sérotype Ia (26,6%), ce qui correspond à plus de 80% des souches invasives. Le sérotype V (7,3%) se distingue par sa prévalence plus élevée au sein des souches de colonisation. Les sérotypes Ib, II et IV sont également retrouvés plus fréquemment pour des souches de colonisation.



**Figure 12 : Répartition des sérotypes selon l'origine des souches**

Parmi les souches invasives, la répartition des sérotypes obtenus est différente selon que l'on s'intéresse aux souches issues d'infection néonatale précoce ou tardive. Dans le cadre des infections néonatales tardives, les souches de sérotype III sont très majoritaires et quasiment exclusives. Quelques souches de sérotypes Ia sont retrouvées, et les autres sérotypes sont très exceptionnels. En parallèle, dans le cadre des infections néonatales précoces la répartition des sérotypes est moins uniforme. Ainsi, les souches de sérotypes III restent majoritaires et représentent la moitié des souches, un tiers de souches sont de sérotype Ia, et une souche sur dix est une souche de sérotype II ou de sérotype V. (Figures 12 et 13)



**Figure 13 : Répartition des sérotypes des souches d'infections néonatales**

#### **4. Prévalence des complexes clonaux**

##### **3.4.1 Analyse des profils obtenus**

Pour chaque polymorphisme ponctuel de séquence (SNP), la réaction de PCR positive avec le Ct le plus faible a mis en évidence quel allèle était porté par la souche. La *figure 14* montre l'exemple du SNP GlcK180 pour l'échantillon 110, pour lequel un Ct plus faible est obtenu pour l'allèle G.



### Qualitative analysis

Number of the well	ID of the tube	Ct, Fam	Ct, Hex	Result
A1	110a (complexe clonal sag)	23,0		+
D1	110g (complexe clonal sag)	13,0		+

\* Manual(Threshold) method (B,F) Threshold\_FAM = 25,2 Threshold\_HEX = 0,0

### Dependence of FAM channel fluorescence on cycle number

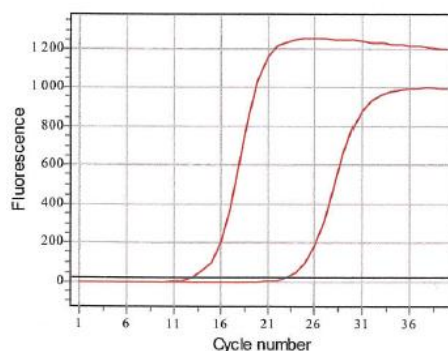


Figure 14 : Exemple de courbes obtenues pour l'échantillon 110 pour le SNP GlcK180.

L'analyse des courbes obtenues pour les 4 polymorphismes ponctuels de séquence a permis d'identifier pour chaque souche un profil à 4 lettres correspondant aux 4 nucléotides de chacun des SNP respectivement dans l'ordre : le SNP glnA36, glnA429, glcK180 et adhP111. *Honsa et al.* ont décrit dix profils permettant de définir l'appartenance aux différents complexes clonaux, retrouvés dans le Tableau 3.

Profil SNP (glnA36 ; glnA429 ; glcK180 ; adhP111)	Complexes clonaux
CTAG	CC1
CTAA	CC10
CCGG	CC17
CCAG	CC19
TCGG	CC23 et CC22
CTGG	CC67
CCAA	4 membres du CC1 et 4 singletons
TCAG	7 singletons
TCAA	ST227 et ST159
CCGT	ST137

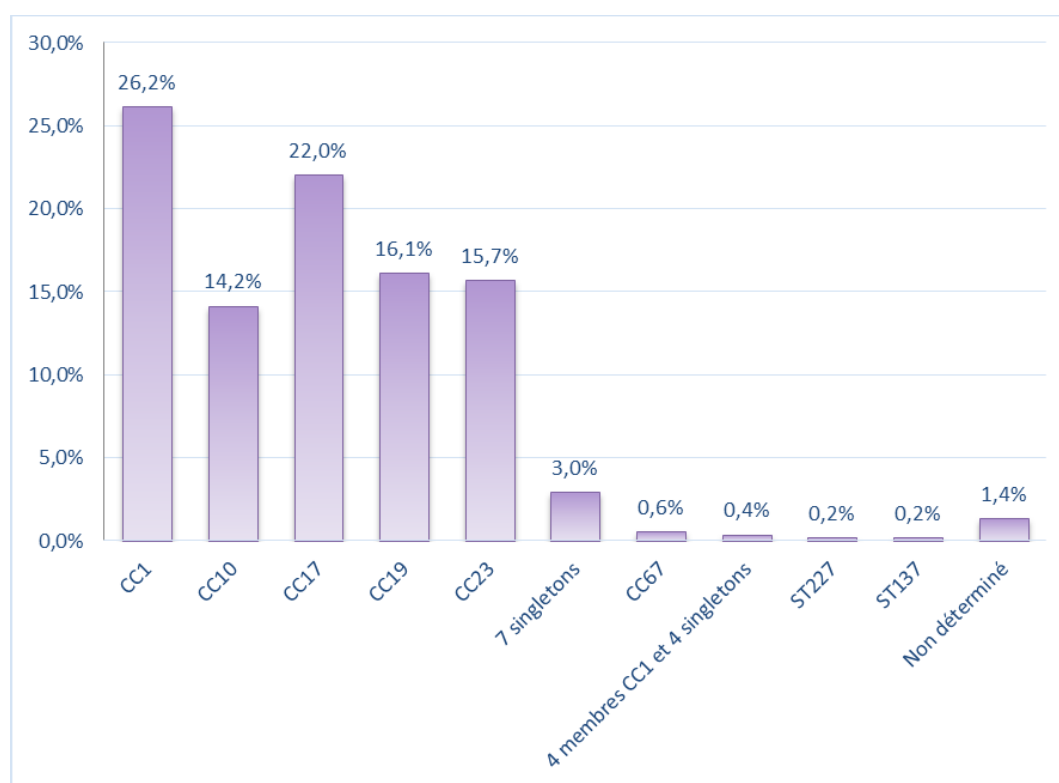
Tableau 3 : Correspondance entre les profils nucléotidiques des SNP et les complexes clonaux

En utilisant notre technique, sept souches n'ont pas pu être attribuées à un complexe clonal : six souches de colonisations et 1 souche invasive. En effet, la combinaison de SNP obtenue pour ces souches ne correspondait à aucun profil décrit

par *Honsa et al.* Par exemple, le profil obtenu pour une souche de colonisation issue d'un prélèvement vaginal de décembre 2011 donnait le profil CTGA. Cette dernière ayant pu être typée (sérotypage II) et son profil de résistance (résistance à la tétracycline, sensible aux macrolides) étant concordant, nous avons décidé de conserver la souche dans notre étude.

### 3.4.2 Prévalence globale des complexes clonaux

Dans l'ensemble de la population étudiée, les souches appartiennent à cinq complexes clonaux principaux : le CC1 dans 26,2% des cas, suivi de nombreuses souches appartenant au CC17 (22,0%). Les CC19, CC23 et CC10 sont également fortement représentés avec respectivement 16,1 %, 15,7% et 14,2%. Certaines souches appartenant à d'autres complexes clonaux ont également été retrouvés, en grande minorité. (*Figure 15*)



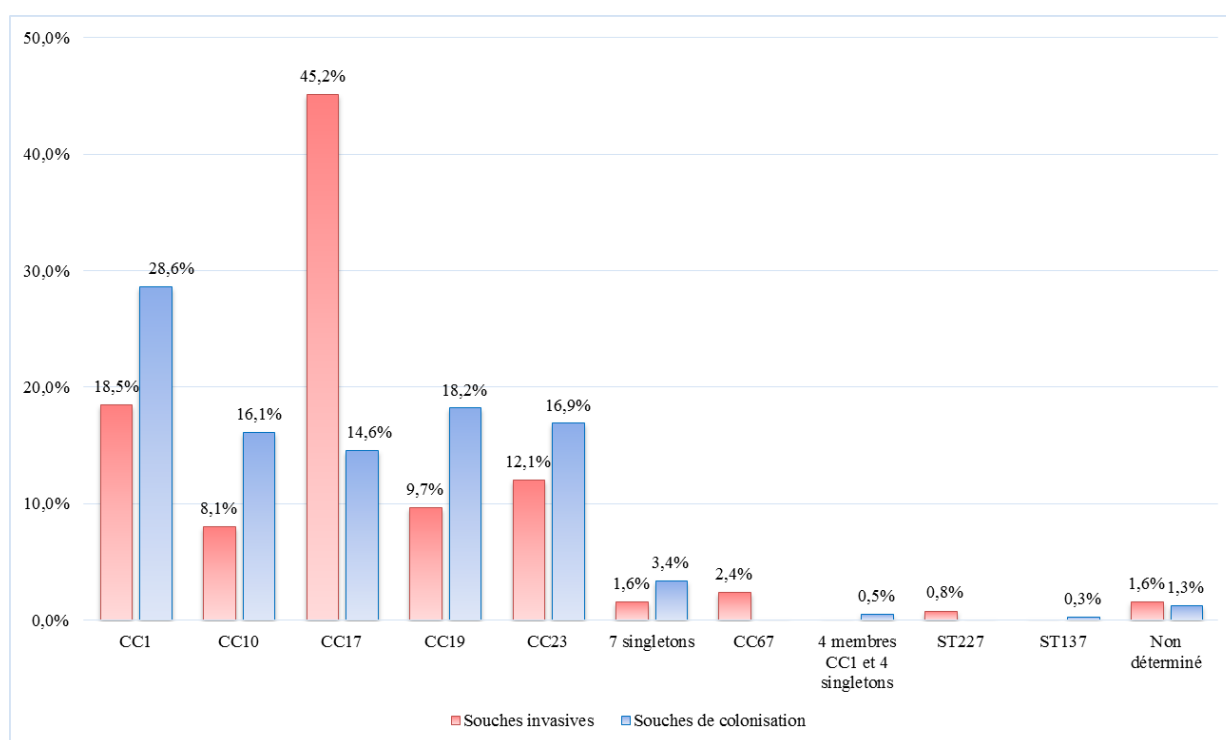
**Figure 15 : Répartition des complexes clonaux**

### 3.4.3 Prévalence des complexes clonaux en fonction de l'origine des souches

Les souches de colonisation appartiennent majoritairement au CC1, et ce pour 28,6% d'entre elles. Les autres souches se répartissent équitablement parmi les CC19, CC23, CC10 et CC17 avec respectivement 18,2%, 16,9%, 16,1% et 14,6%. (Figure 16)

Cette répartition est bien différente concernant les souches invasives. En effet, ces dernières appartiennent très majoritairement au CC17 avec 45,2% des souches. On retrouve par ailleurs des souches appartenant au CC1 pour 18,5% d'entre elles et également des souches appartenant aux CC23, CC19 et CC10 pour respectivement 12,1%, 9,7% et 8,1%.

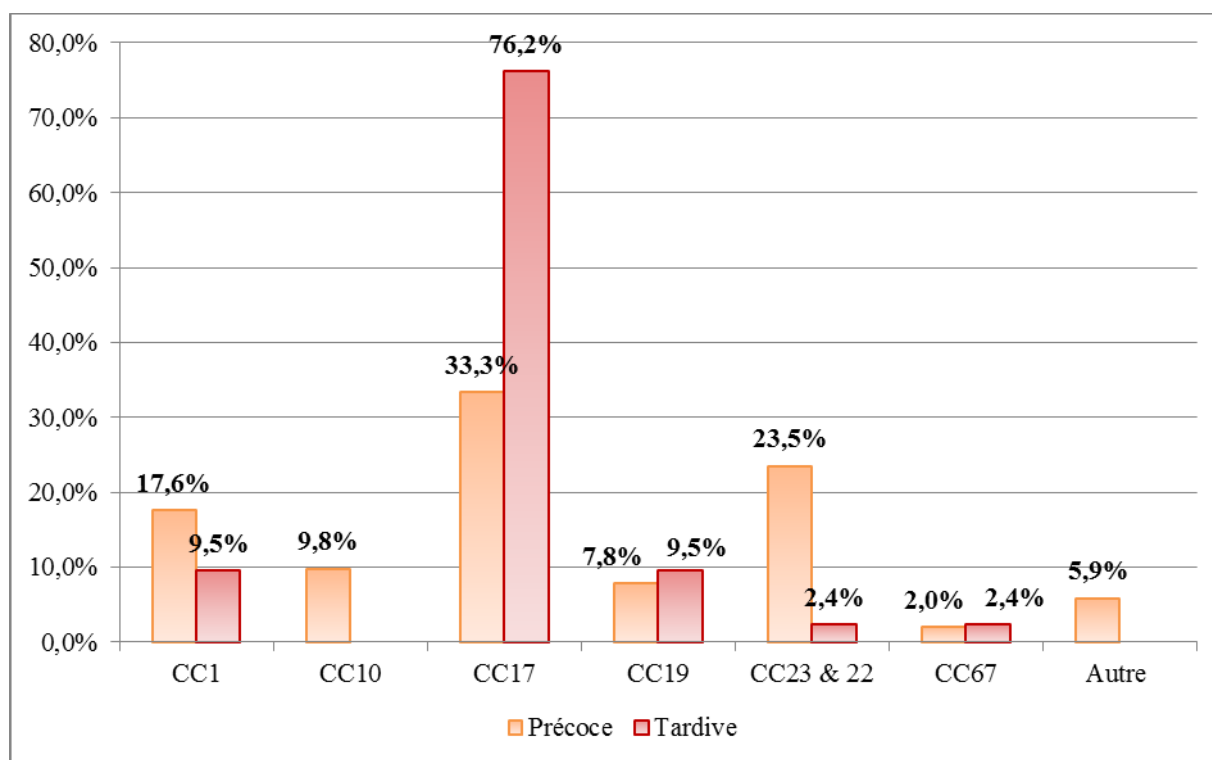
La présence de quelques souches invasives appartenant au CC67, moins retrouvées au sein des souches de colonisations est à notifier (2,4%).



**Figure 16 : Répartition des complexes clonaux selon l'origine des souches**

Parmi les souches invasives, celles issues d'infections néonatales tardives sont très majoritairement des souches appartenant au CC17. Les complexes clonaux CC1 et CC19 représentent chacun une souche sur dix. En comparaison, les souches issues d'infections néonatales précoces appartiennent à des complexes clonaux plus

diversifiés. Le CC17 est également majoritaire, mais seulement un tiers des souches appartiennent à ce complexe clonal. Un quart des souches appartiennent au CC23&22, contrairement aux souches d'infections néonatales tardives où il est très rarement retrouvé. Un peu moins d'une souche sur cinq appartient au CC1, et les souches appartenant aux CC10 (non retrouvé chez les souches d'infection tardive) et CC19 correspondent à un peu moins d'une souche sur dix. (Figure 17)



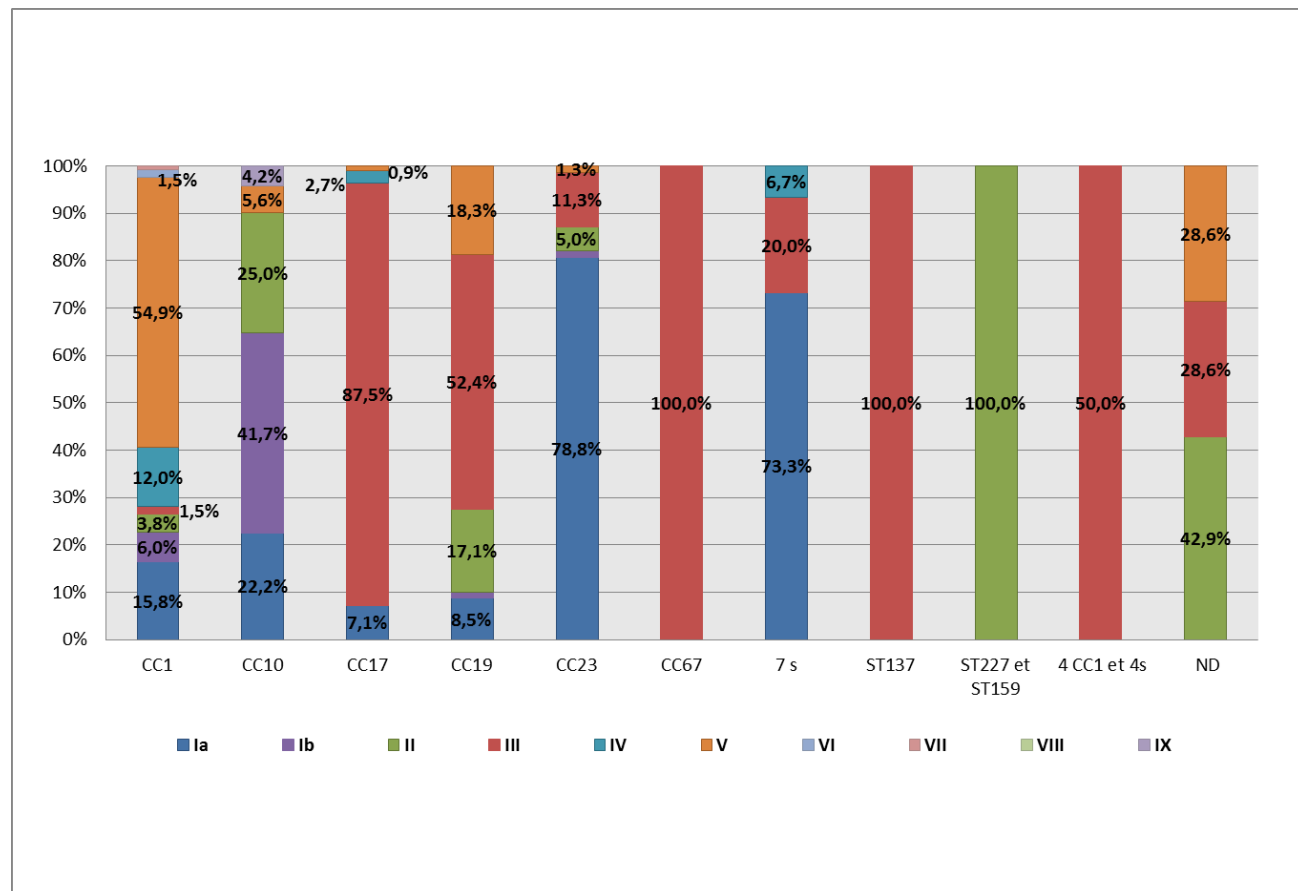
**Figure 17 : Répartition des complexes clonaux des souches d'infections néonatales**

## 5. Corrélation entre sérotypes et complexes clonaux

Au sein d'un même complexe clonal, nos résultats démontrent que deux à sept types capsulaires sont retrouvés. Certains complexes clonaux sont plus homogènes, avec trois types capsulaires majoritaires. Le CC17, dans lequel on retrouve 87,5% de sérotype III, en fait partie. Le CC23, représenté majoritairement par des souches de sérotype Ia (78,8%) et de sérotype III (11,3%) également.

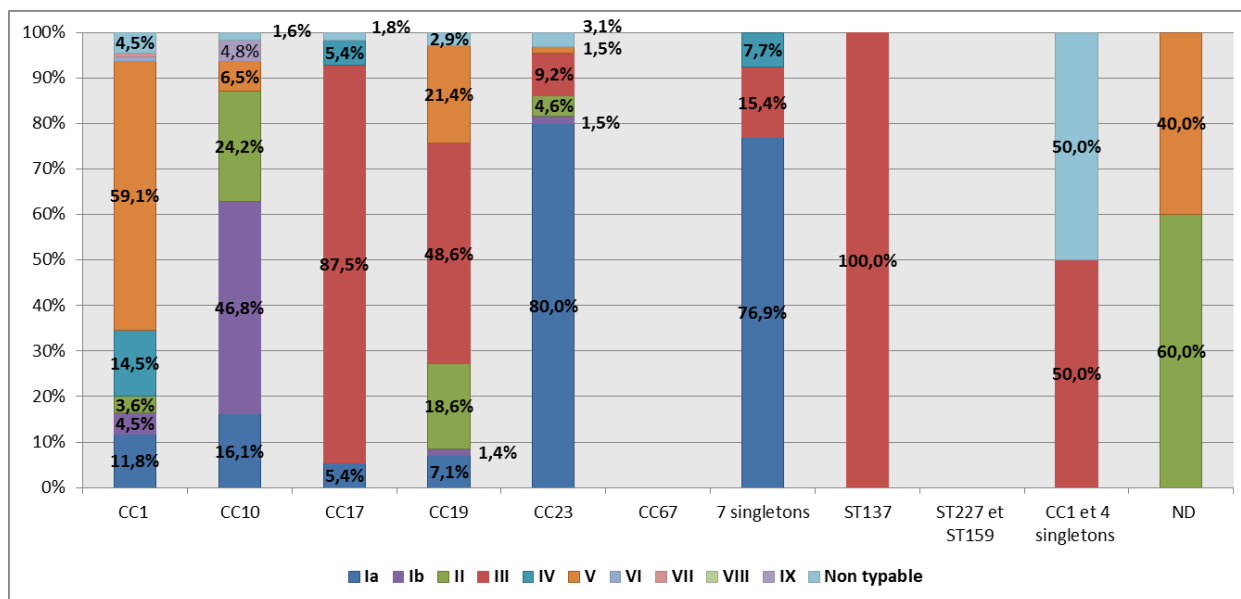
A l'inverse, le CC1 est bien plus hétérogène avec sept types capsulaires retrouvés. Le sérotype V représente la majorité des souches du CC1 avec 54,9%. Le reste des souches de ce complexe clonal ayant pu être sérotypées sont représentées

par les sérotypes Ia (15,8%), IV (12,0%), Ib (6,0%), II (3,8%), III (1,5%), VI (1,5%) et VII (0,8%). (*Figure 18*)



**Figure 18 : Répartition des sérotypes au sein des complexes clonaux**

Concernant les souches de colonisation, la répartition des sérotypes en fonctions des complexes clonaux se superpose à la répartition globale. (*Figure 19*)



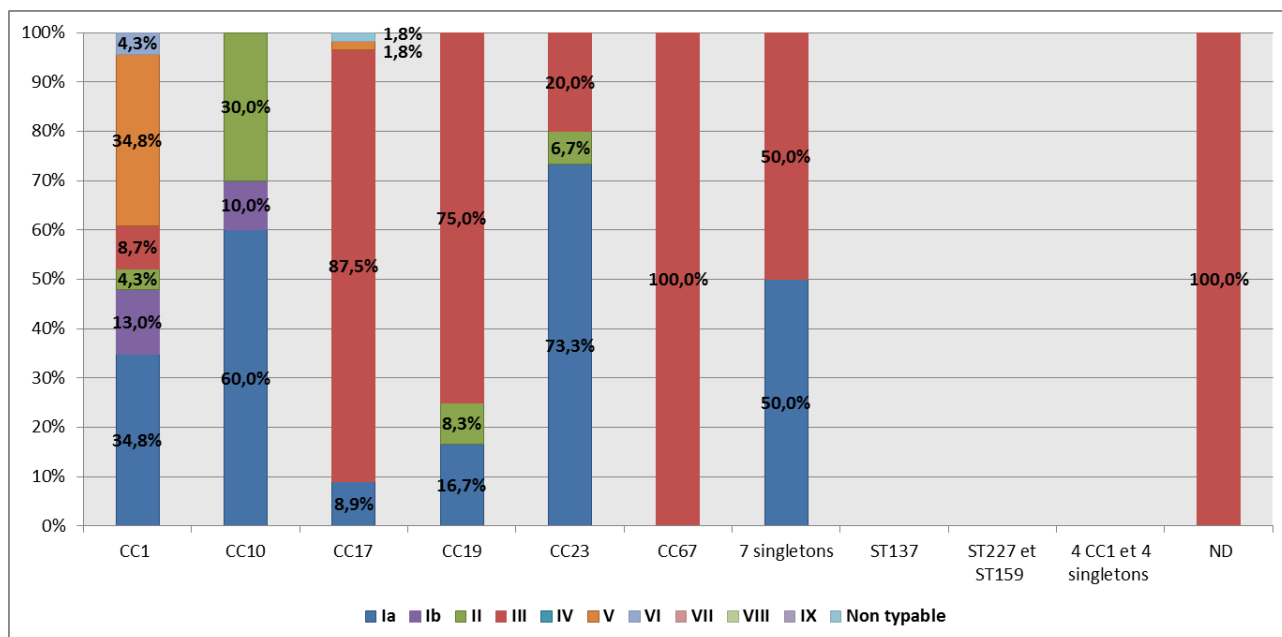
**Figure 19 : Répartition des sérotypes au sein des complexes clonaux pour les souches de colonisation**

Concernant les souches invasives, quel que soit le complexe clonal étudié, les sérotypes III et Ia sont les plus représentés.

En s'attardant sur l'ensemble des souches, celles appartenant au CC1 sont représentées majoritairement par le sérotype V. Concernant les souches invasives, le sérotype V est bien représenté, mais le sérotype Ia également, dans les mêmes proportions. De plus, le sérotype III est retrouvé, alors qu'il est absent chez les souches de colonisation.

Concernant les souches invasives appartenant au CC10, le sérotype Ia est majoritairement représenté. Or sur l'intégralité des souches, ce sérotype est présent par un nombre moins important de souches que les sérotypes Ib et II au sein de ce complexe clonal.

Les souches invasives appartenant aux CC17, CC19 et CC23, ainsi que les autres complexes clonaux plus rares, sont essentiellement des souches de sérotypes III ou Ia. (Figure 20)

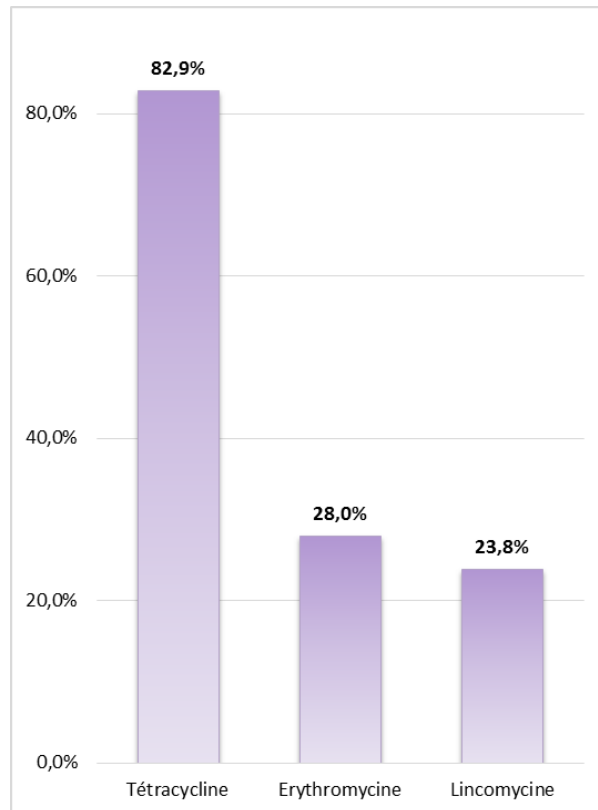


**Figure 20 : Répartition des sérotypes au sein des complexes clonaux pour les souches invasives**

## 6. Résistances aux antibiotiques

### 3.6.1 Profils phénotypiques de résistance

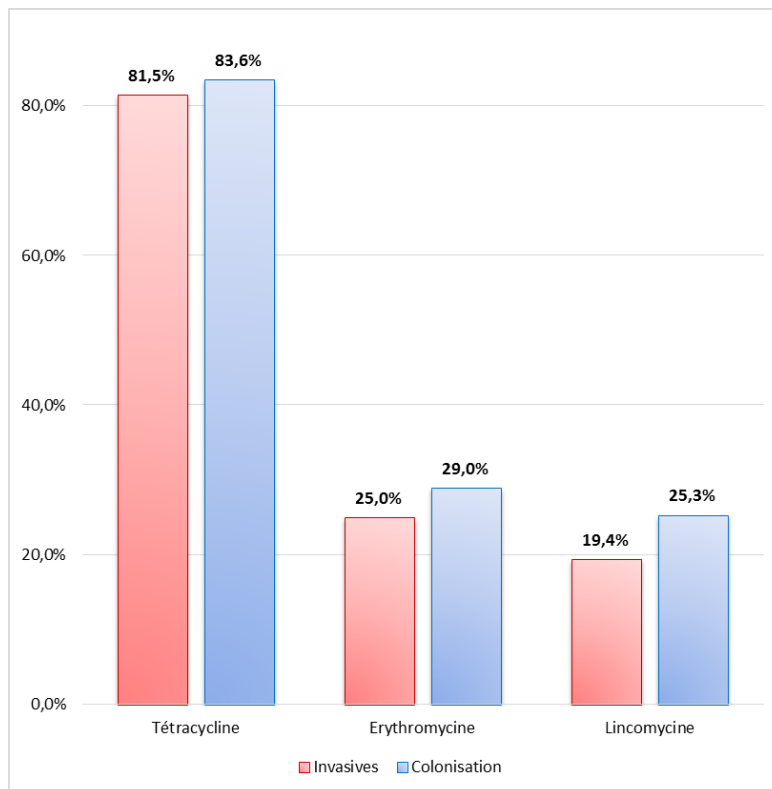
La résistance à la tétracycline moyenne retrouvée pour nos souches est de l'ordre de 82,9%. (*Figure 21*) Quel que soit l'écosystème, il semble que cette résistance soit constante.



**Figure 21 : Résistance moyenne aux molécules testées**

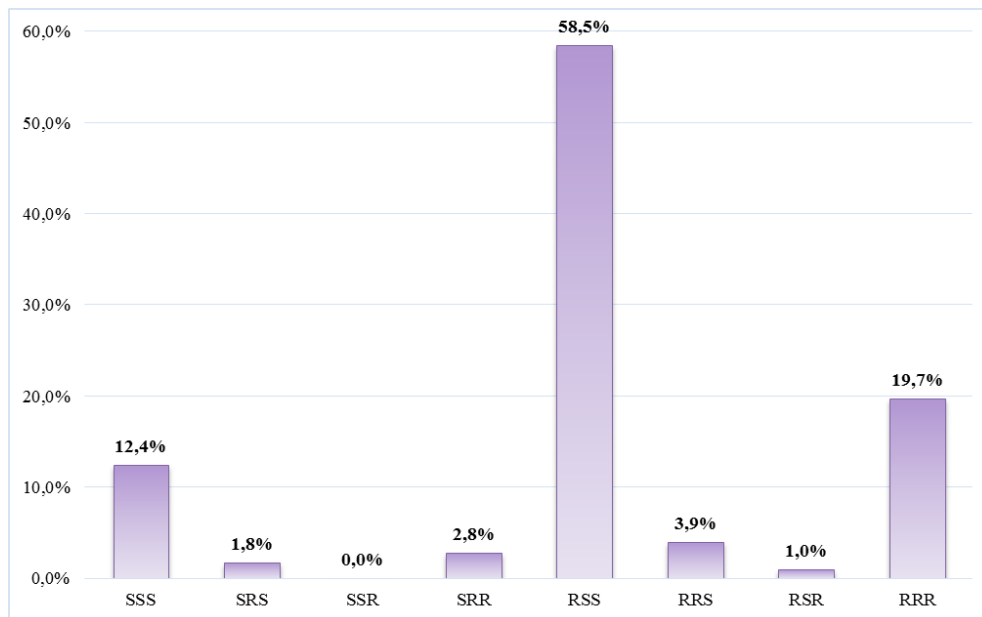
Il est observé que selon l'écosystème étudié, la résistance aux macrolides semble légèrement différer. En effet, les souches de colonisation sont plus résistantes aux macrolides : 29,0% concernant l'érythromycine versus 25,0% pour les souches invasives. Il en est de même pour la lincomycine : 25,3% pour les souches de colonisation et 19,4% pour les souches invasives. (Figure 22)





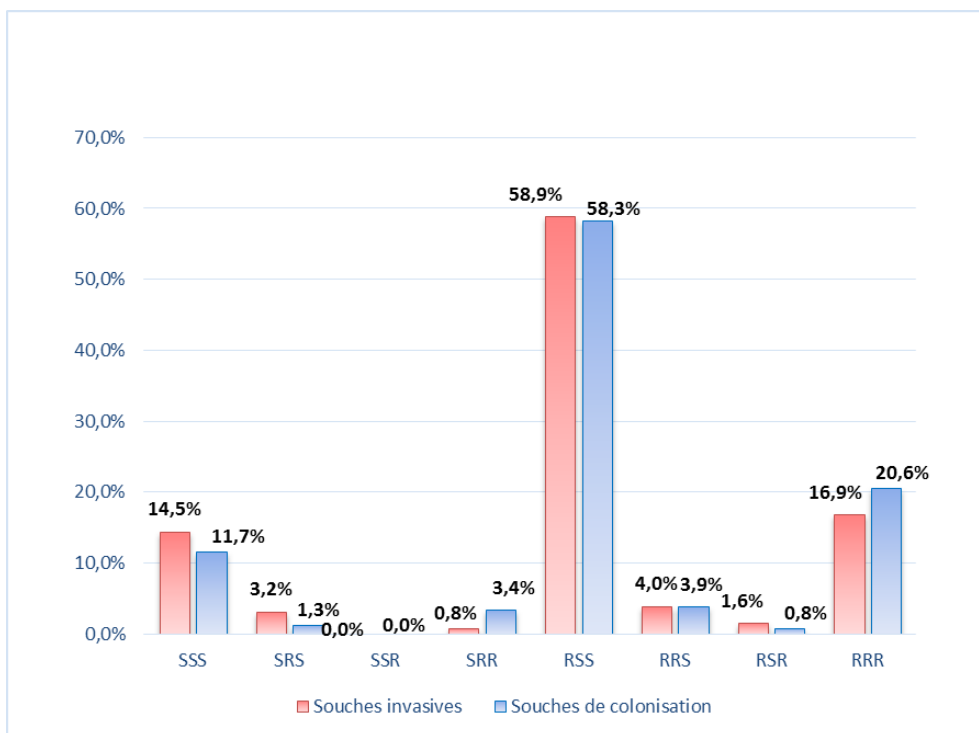
**Figure 22 : Résistance moyenne aux molécules testées selon l'origine des souches**

Les phénotypes principaux retrouvés sont des souches uniquement résistantes à la tétracycline dans 58,5% des cas, des souches résistantes aux trois molécules dans 19,7% des cas et des souches sensibles aux trois molécules dans 12,4 %. Des souches ayant d'autres phénotypes existent et représentent moins de 5% de l'ensemble. (Figure 23)



**Figure 23 : Répartition des différents phénotypes de résistance aux molécules testées  
(Dans l'ordre : Tétracycline ; Erythromycine ; Lincomycine)**

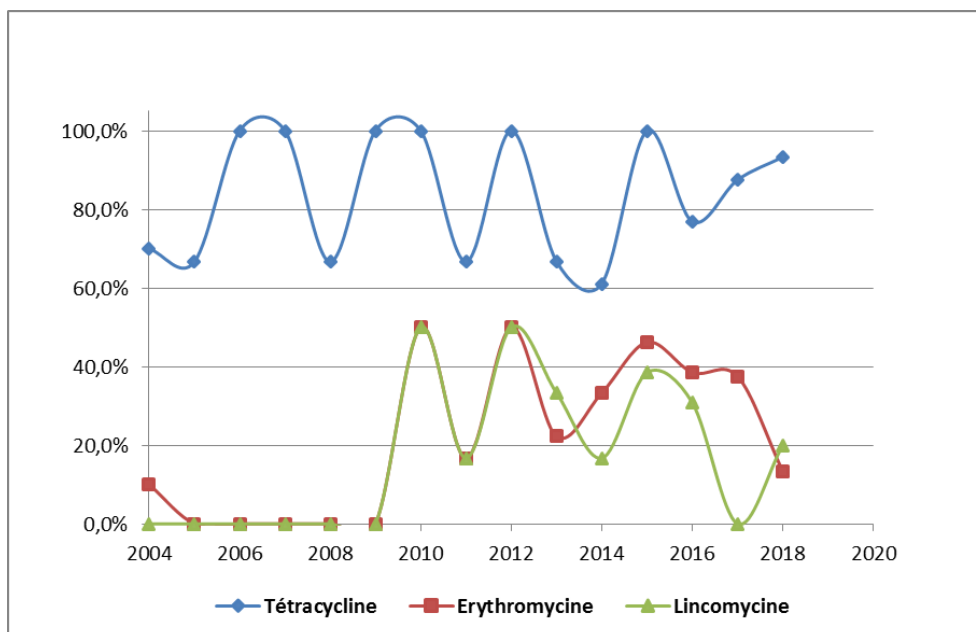
Les souches résistantes à la fois à l'érythromycine et à la lincomycine (SRR ou RRR) par un mécanisme MLSb inductible ou constitutif sont retrouvées un peu plus fréquemment dans les souches de colonisation. Au contraire, les souches totosensibles (SSS) semblent plus fréquentes chez les souches invasives. (Figure 24)



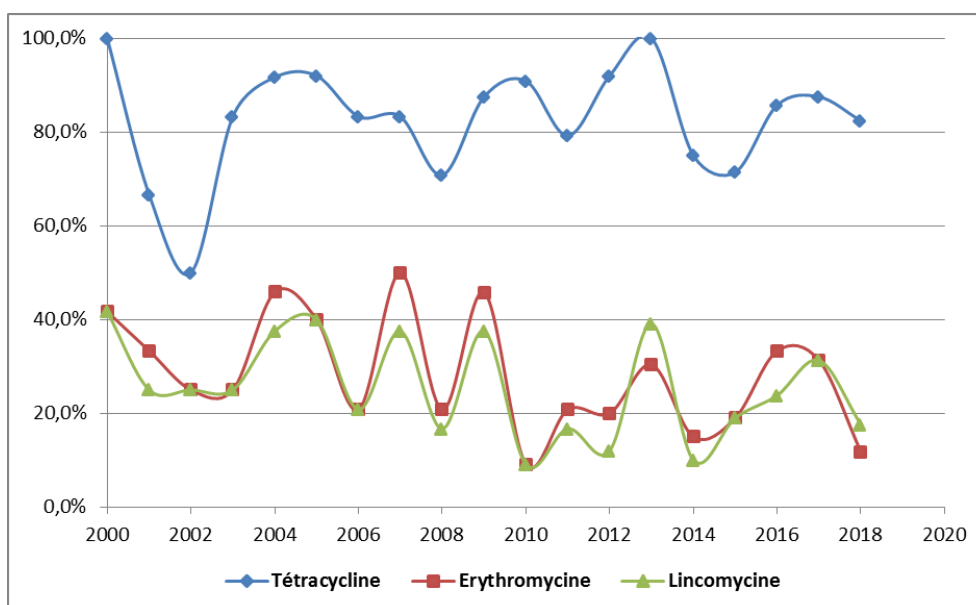
**Figure 24 : Répartition des phénotypes de résistances aux molécules testées selon l'origine des souches (Dans l'ordre : Tétracycline ; Erythromycine ; Lincomycine)**

### 3.6.2 Évolution de la résistance au cours du temps

Une première conclusion avait pu être apportée dans un précédent travail jusque 2010 : une augmentation de la résistance à la tétracycline après 2003 concernant les souches de colonisation avait été démontrée. Cette période fait suite à la mise en place des recommandations de l'ANAES en 2001. Notre travail confirme cette première conclusion. En parallèle, la résistance aux macrolides n'était pas modifiée.



**Figure 25 : Evolution de la résistance aux antibiotiques des souches invasives au cours du temps**



**Figure 26 : Evolution de la résistance aux antibiotiques des souches de colonisation au cours du temps**

Avec notre travail, une augmentation de la résistance aux macrolides concernant les souches invasives a pu être observée. En effet, la résistance aux macrolides est restée faible jusque 2011, et concerne en moyenne 34,4% des souches pour l'érythromycine et 27,0% pour la lincomycine à partir de 2012. (Figure 25)

A fortiori, la tendance est inversée par rapport aux souches de colonisation dont la résistance semble en diminution : pour l'érythromycine, 31,5% des souches jusqu'en 2011 puis 23% à partir de 2012, et pour la lincomycine, 27,7% des souches jusqu'en 2011 puis 21,8% à partir de 2012. (*Figure 26*)

L'analyse simultanée de l'ensemble des souches reproduit de manière très similaire l'évolution des courbes obtenues pour les souches de colonisation. L'ajout des souches invasives aux souches de colonisation lisse particulièrement la courbe de la résistance à l'érythromycine et permet d'observer la progression de cette dernière dans le temps, notamment entre 2010 et 2017.

### **3.6.3 Résistance aux antibiotiques en fonction du sérotype**

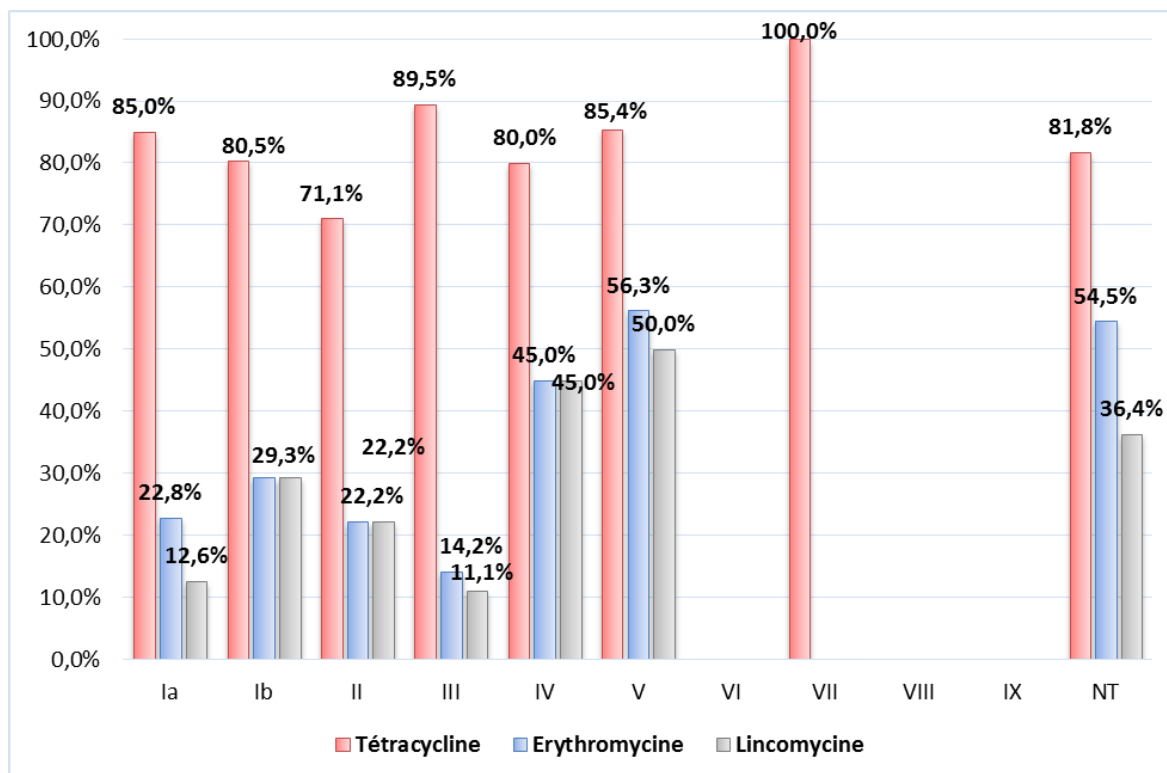
Selon le sérotype, la résistance aux différents antibiotiques testés est hétérogène et représentée dans la *Figure 27*.

Les souches de sérotype III semblent avoir un niveau de résistance à la tétracycline plus élevé (89,5% des souches) mais un niveau de résistance aux macrolides moindre (14,2% des souches résistantes à l'érythromycine et 11,1% des souches résistantes à la lincomycine).

Les souches de sérotype Ia semblent présenter moins de résistance aux macrolides, et en particulier à la lincomycine (12,6% des souches).

Les souches de sérotype II présentent une meilleure sensibilité à la tétracycline, avec seulement 71,1% des souches résistantes.

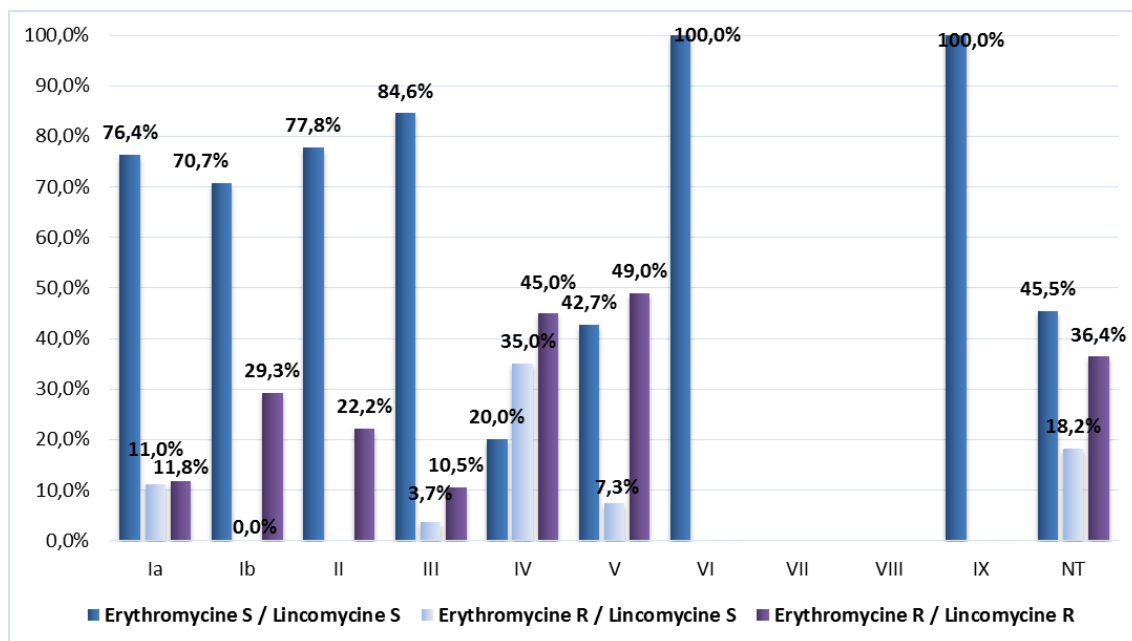
Enfin, les souches de sérotypes V semblent présenter un niveau de résistance aux macrolides beaucoup plus élevé : 56,3% des souches sont résistantes à l'érythromycine et 50% des souches sont résistantes à la lincomycine. Les souches du sérotype IV présentent un phénotype de résistance similaire aux souches du sérotype V.



**Figure 27 : Répartition de la résistance aux antibiotiques selon le sérotype capsulaire**

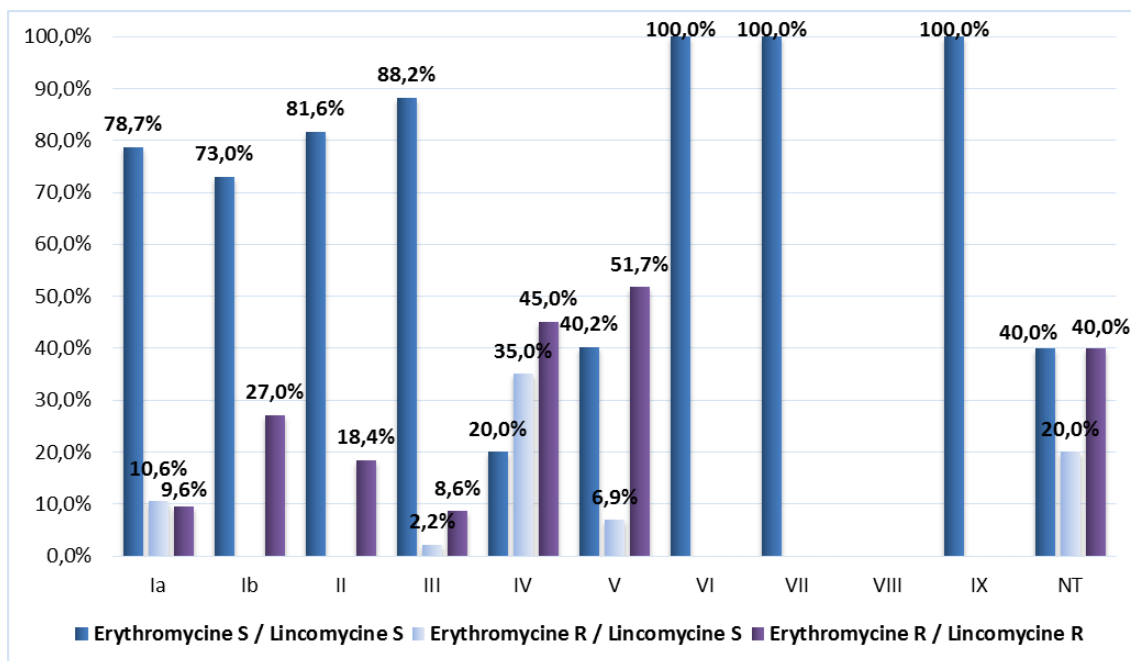
### 3.6.4 Résistance aux macrolides en fonction du sérotype

Les souches de sérotype IV et V présentent un nombre de souches résistantes aux macrolides plus importants. De plus, la majorité des souches de sérotype V sont résistantes à tous les macrolides (Erythromycine et lincomycine). Les souches de sérotypes Ib et II sont plus sensibles que ces deux derniers, mais elles présentent un phénotype similaire à celles du sérotype V lorsqu'elles sont résistantes. (Figure 28)

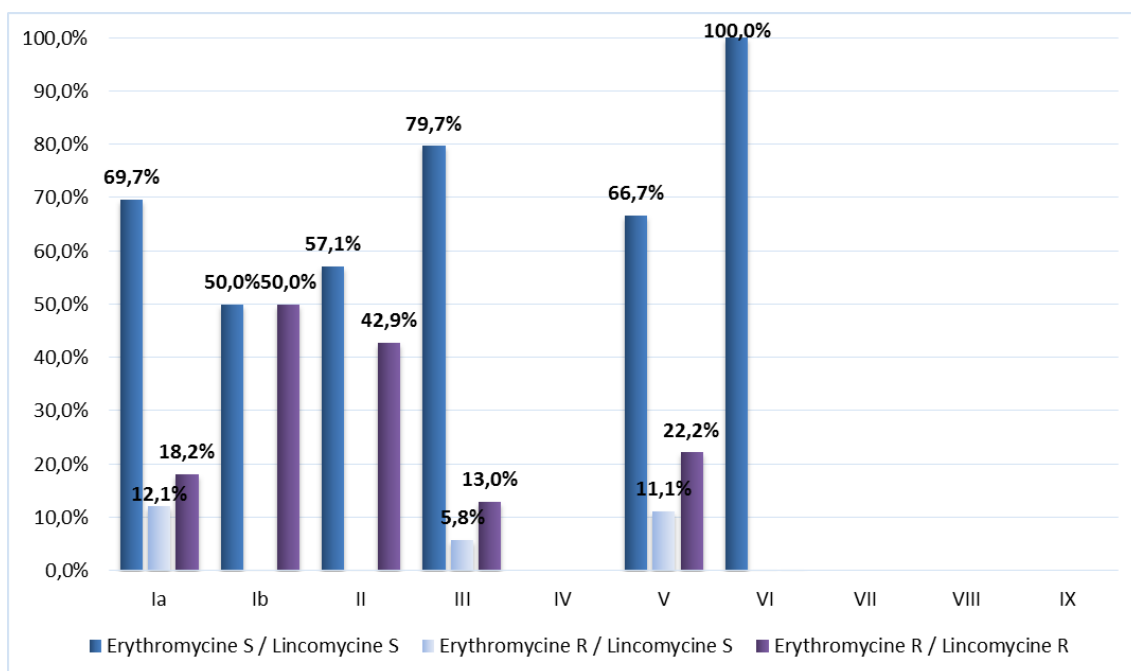


**Figure 28 : Répartition des phénotypes de résistance aux macrolides selon le sérotype capsulaire des souches**

Selon l'écosystème étudié, quelques nuances sont observables (*Figure 29 ; Figure 30*). Les souches de sérotype V sont plus résistantes aux macrolides pour les souches de colonisation. En effet, les souches invasives de sérotype V présentent une meilleure sensibilité aux macrolides. A l'inverse, les souches invasives de sérotype Ib et II présentent une résistance un peu plus fréquente aux macrolides. Cependant la quantité de souches de ces trois sérotypes est faible dans cet écosystème, en comparaison aux souches de colonisation.



**Figure 29 : Résistances aux macrolides des souches de colonisation selon le sérotype capsulaire**



**Figure 30 : Résistances aux macrolides des souches invasives selon le sérotype capsulaire**

### 3.6.5 Résistance aux antibiotiques en fonction du complexe clonal

La répartition de la résistance aux différents antibiotiques testés en fonction de complexe clonal des souches est représentée dans la *Figure 31*.



La résistance aux tétracyclines semble plus élevée pour les souches appartenant aux CC17, mais aussi CC19. Cela s'explique par le fait que la majorité des souches de ces complexes clonaux soit de sérotype III, présentant des souches résistantes à la tétracycline dans 89,5% des cas.

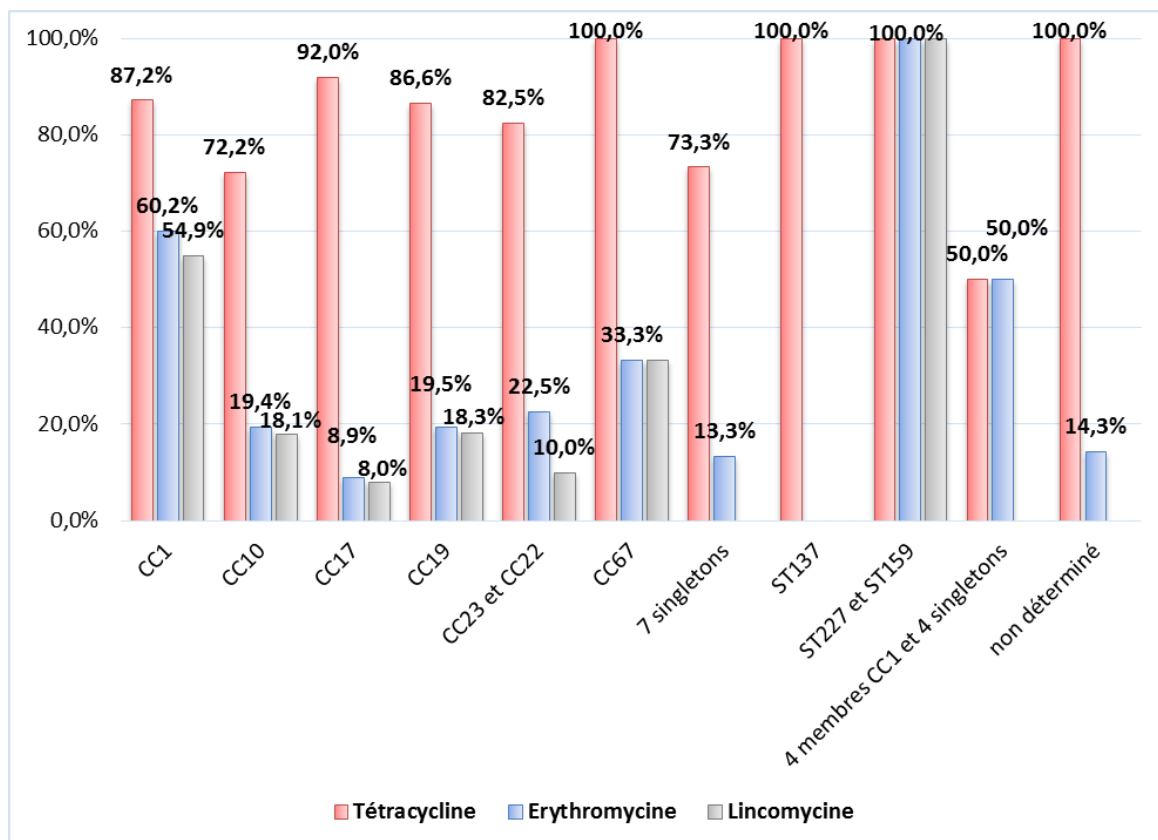
En parallèle, les souches appartenant au CC10 semblent plus sensibles à la tétracycline. Cela peut s'expliquer par la présence de nombreuses souches de sérotype II, plus sensibles à la tétracycline, dans ce complexe clonal.

Concernant le CC19, malgré la présence d'une proportion non négligeable des souches de sérotype II dans ce complexe clonal, la résistance reste élevée de par la très grande majorité de souches de sérotype III.

La résistance aux macrolides semble homogène, exceptée pour le CC17, moins résistant, et le CC1, plus résistant.

Comme pour la tétracycline, la faible résistance aux macrolides des souches appartenant au CC17 s'explique par le très grand nombre de souches appartenant au sérotype III.

Les souches appartenant au CC1 sont majoritairement de sérotype V, or ces souches présentent un niveau de résistance aux macrolides bien plus élevé que les autres sérotypes.

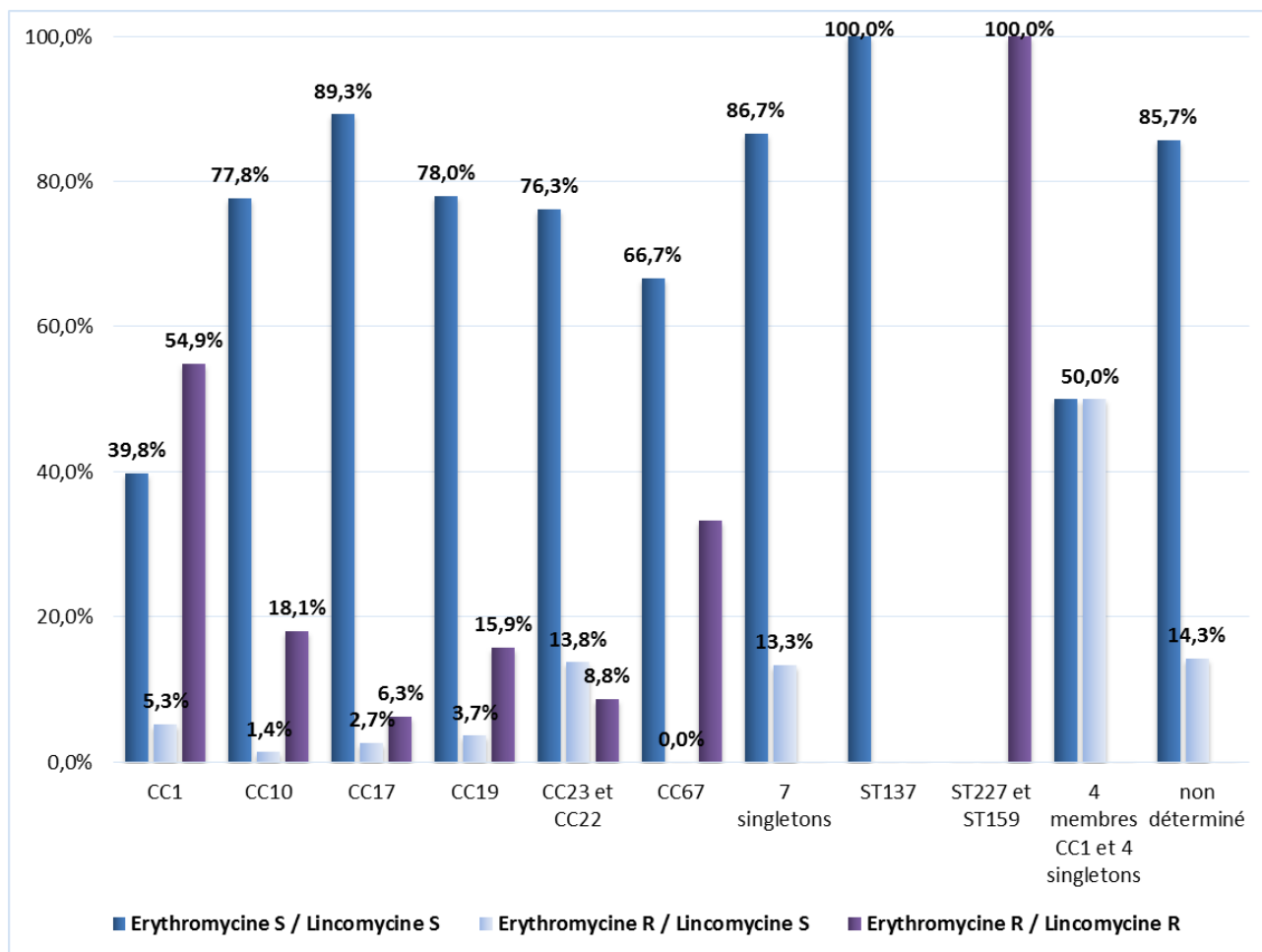


**Figure 31 : Résistance aux antibiotiques selon le complexe clonal**

### 3.6.6 Résistance aux macrolides en fonction du complexe clonal

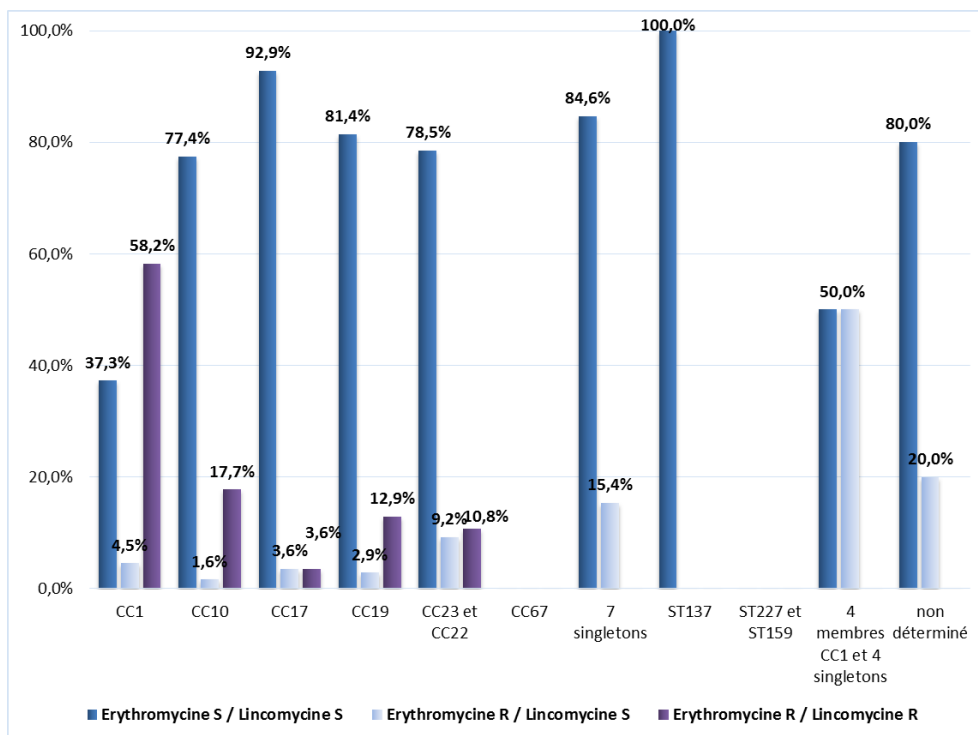
Comme rapporté précédemment, la résistance aux macrolides est plus importante pour les souches appartenant au CC1. Ces souches présentent pour la majorité un phénotype de résistance à tous les macrolides. En effet, on retrouve dans ce complexe clonal de nombreuses souches de sérotype V et IV présentant ce phénotype de résistance aux macrolides. (Figure 32)

Les souches appartenant au CC10 sont plus sensibles, mais présentent le même phénotype lorsqu'elles sont résistantes. Une grande partie des souches de ce complexe clonal sont de sérotype Ib. Pour rappel, le sérotype Ib présente des souches plus sensibles que les sérotypes V et IV, mais qui ont un phénotype similaire lorsqu'elles sont résistantes.

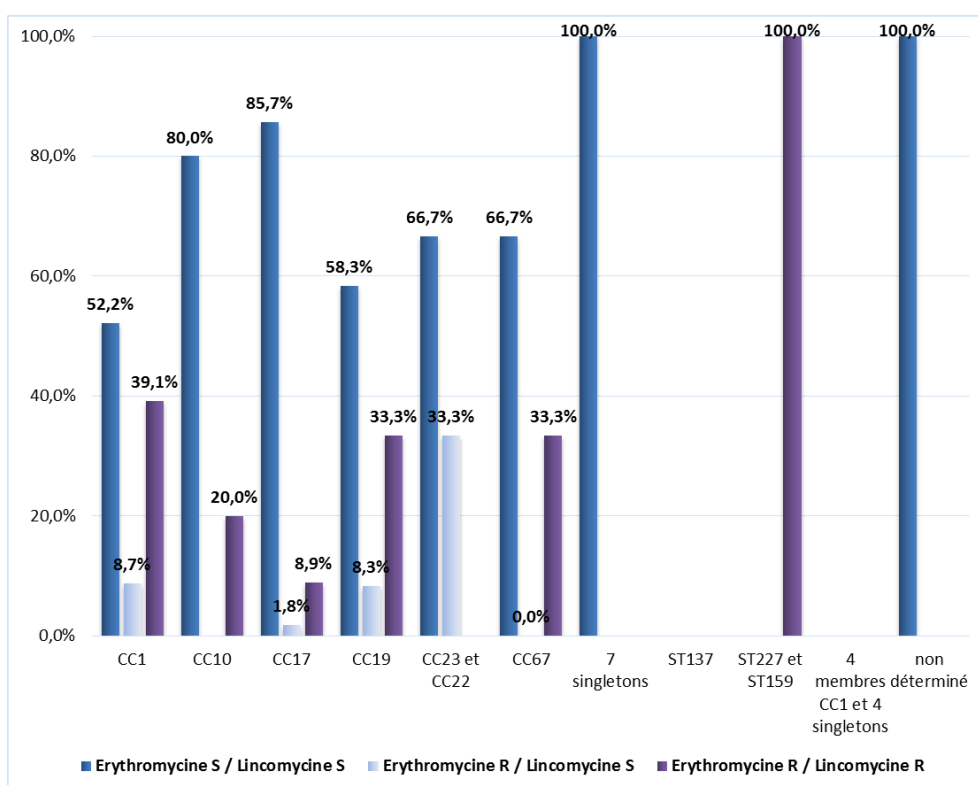


**Figure 32 : Résistance aux macrolides en fonction du complexe clonal**

Les souches invasives appartenant au CC1 sont moins résistantes aux macrolides que les souches de colonisation, mais les souches résistantes présentent le même phénotype. A l'inverse, les souches invasives appartenant au CC19 semblent plus résistantes aux macrolides, avec une prédominance de souches résistantes à tous les macrolides plutôt qu'à l'érythromycine uniquement. (Figure 33 ; Figure 34)



**Figure 33 : Résistance aux macrolides en fonction du complexe clonal des souches de colonisation**



**Figure 34 : Résistances aux macrolides en fonction du complexe clonal des souches invasives**

## IV. Discussion

Dans l'objectif de caractériser les souches de *S. agalactiae* retrouvées chez l'Homme, de nombreuses techniques de typage ont été mises en place. Historiquement, la découverte de déterminants antigéniques propres à la capsule de la bactérie a permis le classement des différentes souches en sérotypes capsulaires.<sup>7,45,64,65</sup> Les méthodes usuelles de sérotypage étaient initialement des méthodes utilisant l'immunodiffusion en gel ou l'agglutination en bille de latex. Or, ces méthodes peuvent être mises en défaut car elles sont très dépendantes de la production de la capsule par la bactérie, qui peut être faible. Afin d'harmoniser et d'augmenter la sensibilité, des méthodes de biologie moléculaire ont été mis en place, et notamment la technique de PCR multiplex décrite par *Imperi et al.* en 2010 que nous avons utilisé<sup>44</sup>. La recherche de tous les gènes codant pour les enzymes nécessaires à la production de la capsule, dont l'expression est différente d'un sérotype à l'autre, permet de déterminer le sérotype de manière précise. L'utilisation de cette technique nous a permis de déterminer le sérotype de toutes les souches étudiées de 2010 à 2018, exceptée une qui s'avérerait faire partie d'un complexe clonal rare. Ce cas s'étant déjà produit lors de l'analyse des souches de 2000 à 2011, une méthode complémentaire pourrait alors être envisagée pour ces souches, comme de l'agglutination.

Afin de préciser de plus faibles différences entre les souches, des techniques plus discriminantes de typage ont été développées, et la référence est actuellement la technique MLST. Le séquençage sur 500 paires de bases des sept gènes de ménage, codant pour des enzymes essentielles au métabolisme de *S. agalactiae* permet d'affecter à chaque souche donnée un numéro d'allèle pour chacun de ces gènes, attribuant ainsi à ces souches un sequence-type (ST).<sup>21</sup> Le regroupement de ces ST en complexes clonaux, c'est-à-dire l'ensemble des ST ayant au moins six allèles sur sept en commun, simplifie le regroupement phylogénique des souches. Pour la très grande majorité de nos souches, nous avons pu déterminer le complexe clonal auquel elles appartiennent à l'aide d'une méthode plus simple utilisant l'analyse des polymorphismes ponctuels de séquence ou SNP, décrite par Honsa et al. en 2008.<sup>62</sup> Cette méthode consiste en l'utilisation d'une PCR ayant pour but d'amplifier spécifiquement les deux ou trois allèles de chacun des quatre SNP d'intérêts pour chacune de nos souches. Malgré plusieurs essais pour chacun des SNP, sept souches

n'ont pas pu être attribuées à un complexe clonal : six souches de colonisation et 1 souche invasive. La combinaison de SNP obtenue pour ces souches ne correspondait à aucun profil décrit par Honsa et al., et aucun complexe clonal n'a pu leur être attribué. Le sérotype et le profil de résistance de ces souches ayant pu être déterminés, nous avons cependant décidé de les conserver dans notre étude. Cela souligne la relative efficacité de notre technique, car la majorité des souches ont pu être typées, mais quelques-unes restent indéterminées. Il est probable que ces souches appartiennent à des complexes clonaux moins fréquemment retrouvés et dont la détermination ne peut se faire par la technique utilisée. Néanmoins, son utilisation a permis un gain de temps et de moyen considérable pour la caractérisation relativement précise de ces souches, en comparaison avec une technique utilisant une méthode de séquençage tel que le MLST. En effet, le MLST est la référence et permet de caractériser toutes les souches, mais elle est chronophage et nécessite des moyens plus importants. Cependant, son utilisation comme technique complémentaire a été envisagée, afin d'attribuer un complexe clonal aux souches pour lesquelles notre méthode n'a pas fonctionné. Cette analyse des SNP est donc une approche simplifiée et efficace pour le typage de la plupart des souches de *S. agalactiae* mais elle doit être complétée par une technique complémentaire telle que la technique de référence lorsqu'elle est mise en défaut, et ce d'autant plus lorsque nous sommes confrontés à un clone de ST moins fréquent, n'appartenant pas aux complexes clonaux dits principaux.

La caractérisation de souches isolées au CHRU de Tours entre 2000 et 2018 à l'aide des deux techniques précédemment décrites avait pour objectif d'effectuer un suivi épidémiologique des souches de *S. agalactiae* responsables de colonisation vaginale chez la femme enceinte et impliquées dans les infections chez ces dernières et chez les nouveau-nés. Le sérotypage moléculaire et la détermination du complexe clonal des souches a été complété par leur phénotype de résistance aux antibiotiques. La sensibilité constante de *S. agalactiae* aux bêta-lactamines et aux glycopeptides nous a conduit à nous intéresser essentiellement aux molécules de deuxième intention que sont les macrolides et apparentés, représentés par l'érythromycine et la clindamycine, et à la tétracycline, dont les résistances acquises sont fréquentes.<sup>25,66</sup> Ceci étant, il existe quelques études récentes qui rapportent une diminution de la sensibilité à la pénicilline ou d'autres bêta-lactamines pour quelques rares souches<sup>28,67</sup>. Il est également observé dans la majorité de ces études que la résistance à la

tétracycline est fréquente, de l'ordre de 85%, et que les résistances aux macrolides et apparentées sont en augmentation.

Les résultats de sérotypage obtenus pour l'ensemble des souches sont superposables à ceux obtenus pour les souches de colonisation spécifiquement, et ils sont en accord avec les données épidémiologiques mondiales. Nos résultats sont similaires aux données de répartition des sérotypes de *S. agalactiae* colonisant les femmes enceintes en Europe : les sérotypes III, Ia et V prédominent, suivi des sérotypes Ib, II et IV plus minoritaires. Enfin, les autres sérotypes (VI, VII, VIII et IX) sont plus exceptionnels, ces derniers étant retrouvés plus volontiers chez les souches de colonisation des femmes enceintes des régions asiatiques.<sup>10</sup>

La fréquence d'isolement de certains sérotypes, comme le sérotype III, dans le cadre d'infections suggère que les souches à risque invasif possèdent des déterminants antigéniques particuliers. A contrario, certains sérotypes sont retrouvés chez des souches colonisant le tractus génital féminin et sont très rarement retrouvés dans le cadre d'infection. En effet, il a été montré que les souches de sérotype III, mais également Ia et V sont les plus fréquemment retrouvés lors d'infections.<sup>7,31</sup> En s'intéressant plus spécifiquement aux souches invasives, les résultats obtenus concernant leur sérotype sont en accord avec ces données. Les souches invasives de sérotypes III et Ia représentent plus de 80% de l'ensemble des souches invasives testées. Plus précisément, la grande majorité correspond à des souches de sérotype III, en particulier dans le cadre d'infections néonatales tardives. Dans le cadre d'infections néonatales précoces, le sérotype III est également prédominant, mais les sérotypes Ia, II et V sont un peu plus représentés. Pour compléter nos données de sérotypage, il pourrait être intéressant de déterminer le sous-type de ces souches de sérotypes III afin de vérifier si ces souches invasives sont bien des sous-types III-2, comme montré dans l'étude de *Zhao et al.* de 2008.<sup>50</sup>

Par ailleurs, les complexes clonaux que nous avons mis en évidence sont bien les complexes clonaux principaux retrouvés dans la littérature : les CC1, CC10, CC17, CC19 et CC23.<sup>31</sup> L'appartenance des souches à ces derniers est différente selon qu'il s'agisse de souches de colonisation ou de souches invasives. Les souches de colonisation se répartissent relativement équitablement parmi ces complexes clonaux, et certains complexes clonaux ou singletons, moins fréquents, sont volontiers

retrouvés. Le CC17, réputé pour être un complexe clonal de souches ayant un fort potentiel invasif, est le complexe clonal principal retrouvé le moins fréquemment parmi ces souches de colonisation.<sup>31</sup> Il s'agit cependant bien du complexe clonal majoritairement retrouvé pour les souches invasives, pour près de la moitié d'entre elles. Plus précisément, au cours d'infections néonatales tardives, on retrouve ce complexe clonal pour plus de 75% de nos souches. Lors d'infections néonatales précoces, le CC17 reste le plus fréquent, mais les autres complexes clonaux sont plus souvent retrouvés.

Le recoupement de ces différentes analyses effectuées pourrait faire penser que l'analyse moléculaire visant à attribuer à une souche un complexe clonal semble au premier abord être une approche plus précise que le sérotypage capsulaire pour la caractérisation des souches. Cependant d'après nos résultats, ces deux analyses sont complémentaires. En effet, au sein d'un même complexe clonal, on peut retrouver deux à sept types capsulaires différents. Comme retrouvé dans la littérature, les souches appartenant au CC17, qui est principalement caractérisé par le clone ST-17 hypervirulent, sont presque exclusivement de sérotype III.<sup>31</sup> Or, de nombreuses souches de sérotype III n'appartiennent pas à ce complexe clonal, et ne sont pas systématiquement issues de souches invasives, ce qui suggère que le typage moléculaire est plus à même de caractériser ces souches comme invasives. A l'inverse, il existe des souches appartenant au CC17, pour la majorité de sérotype III, qui sont non invasives. Cependant, parmi ces souches de colonisation de CC17, une partie est de sérotype IV, sérotype non retrouvé chez les souches invasives. Ceci suggère donc que le typage moléculaire en complexe clonal ne suffit pas à lui seul à caractériser les souches comme invasives, mais bien que la détermination du sérotype capsulaire puisse également avoir un impact sur cette caractérisation. Dans la même lignée, le sérotype Ia est plus présent chez les souches invasives appartenant au CC1 ou au CC10, alors que la répartition est plus équilibrée chez les souches de colonisation. A l'inverse, les souches de sérotype Ib ou V sont beaucoup plus fréquentes chez les souches de colonisation, bien que parfois présentent chez les souches invasives notamment pour le sérotype V au sein des souches du CC1.



Enfin, la caractérisation des profils de résistance aux antibiotiques a mis en évidence la constante résistance à la tétracycline, caractérisant de très nombreuses souches de cette espèce : 82,9% de nos souches y sont résistantes, ce qui correspond à ce qui est retrouvé dans la plupart des études.<sup>27,31</sup> La présence d'une résistance à un ou plusieurs macrolides est plus variable. Ces différences semblent se marquer selon que l'on s'intéresse aux souches de colonisation ou aux souches invasives : les résistances à l'érythromycine et à la lincomycine indépendamment sont plus fréquemment retrouvées chez les souches de colonisation. Il est à noter que la résistance aux macrolides est le plus souvent liée à un mécanisme MLSb inducible ou constitutif. L'efflux conférant une résistance uniquement à l'érythromycine et le phénotype de résistance isolé à la lincomycine (codé par exemple par le gène LinA) sont plus rares et retrouvés chez moins de 5% des souches. Enfin, les souches multi-sensibles semblent plus fréquentes chez les souches invasives.

L'observation de ces phénotypes de résistances, et en particulier aux macrolides semble montrer une relation avec le sérotype et le complexe clonal des souches. Les souches de sérotypes IV ou de sérotype V, et appartenant au CC1, présentent une résistance beaucoup plus fréquente à tous les macrolides que les autres. Ces souches sont essentiellement des souches de colonisation. Certaines souches invasives de sérotypes V appartenant au CC1 ont été mises en évidence et présentent un phénotype plus fréquemment sensible aux macrolides. De la même façon, de nombreuses souches de sérotype Ib ou II appartenant au CC10, sont volontiers plus sensibles mais présentent le même phénotype de résistance lorsqu'elles le sont. Les souches invasives de sérotypes II, appartenant soit au CC10 soit au CC19 semblent plus résistantes également.

En résumé, les souches que nous avons étudiées se caractérisent comme pour la majorité des études portant sur des souches de *S. agalactiae* de colonisation génitale ou d'infection materno-foetale : les sérotypes III, Ia et V prédominent, suivis des sérotypes Ib, II et IV. Ces souches appartiennent aux cinq complexes clonaux majeurs : le CC1 et le CC17 majoritairement, puis le CC10, le CC19 et le CC23&22. Concernant les résistances : 82,9% sont résistantes à la tétracycline, 28,0% sont résistantes à l'érythromycine et 23,8% sont résistantes à la lincomycine. Concernant les souches de colonisation, celles de CC17 sont moins fréquemment retrouvées. L'évolution de la résistance de ces souches au cours du temps montre une stabilité de

la résistance à la tétracycline, et semble montrer une diminution de la résistance aux macrolides. Les souches invasives étudiées confirment certaines données de la littérature : les souches de sérotype III sont majoritaires, et en particulier celles appartenant au CC17.<sup>31,68</sup> Ces souches sont très significativement retrouvées dans le cadre d'infections néonatales tardives : plus de 75% des souches invasives d'infection tardives sont représentées par ces dernières. Pour compléter ces dernières, certaines souches de sérotypes III appartiennent au CC19, et quelques souches sont de sérotype Ia et appartiennent soit au CC1 soit au CC19. Pour les infections néonatales précoces, les souches de sérotype III appartenant au CC17 sont majoritaires également, mais d'autres sérotypes (Ia, V, II) et complexes clonaux (CC19, CC23&22 et CC1/CC10) sont retrouvés, plus fréquemment dans ce contexte. La majorité des souches appartenant au CC23&22, complexe clonal assez majoritaire, sont surtout de sérotype Ia.

Ces résultats présentent un tableau exhaustif de l'écologie rencontrée au CHRU de Tours, et permettent de donner une idée de l'écologie globalement retrouvée en France, de par leur similarité avec les données issues des différentes publications internationales.<sup>10</sup> Afin de confirmer cela, une étude similaire dans plusieurs régions de France pourrait être envisagée. La caractérisation complète des sérotypes et complexes clonaux de toutes les souches isolées au laboratoire en routine ne semble pas pertinent, cependant la recherche de certaines caractéristiques précises pourrait être envisagée à l'avenir. Par exemple, l'identification de manière systématique de l'appartenance au CC17, responsable de la majorité des cas d'infection néonatale tardive mais aussi précoce, des souches de *S. agalactiae* issues de colonisation maternelle pourrait être envisagée. Cela pourrait inciter à un suivi plus rapproché et une surveillance plus approfondie de l'enfant à la naissance. L'intérêt serait d'améliorer la prévention des infections néonatales tardives à *S. agalactiae*, car l'antibioprophylaxie, pourtant efficace sur le syndrome précoce, ne fait pas diminuer l'incidence de ces syndromes tardifs.<sup>2,7</sup> De plus, une association entre le portage maternel de souches appartenant au CC17 et la survenue de ce syndrome tardif a bien été démontrée.<sup>68</sup> Cette caractéristique pourrait être déterminée par une méthode moléculaire comme présentée dans ce travail, mais cela nécessiterait une manipulation relativement lourde par rapport au bénéfice, du fait du caractère invasif finalement peu prévisible de la souche isolée. Une alternative plus abordable serait

d'utiliser la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF, avec laquelle la recherche de pics d'intensités spécifiques pourrait permettre d'identifier le CC17 en particulier.<sup>69</sup> A minima, cette recherche pourrait être effectuée de manière systématique sur des prélèvements « profonds » tel que les placentas ou les liquides gastriques qui sont plus rares, et dont la positivité peut poser le diagnostic d'infection ou de colonisation en fonction de la clinique. Dans le cadre d'une colonisation du placenta ou de l'enfant à la naissance, l'apparition a posteriori d'un syndrome tardif n'est pas exclue et le fait de connaître les caractéristiques de la souche isolée pourrait permettre de mettre en place des moyens de prévention dès sa détection. Enfin, cette étude aura permis de compléter des données locales existantes d'épidémiologie concernant *S. agalactiae* chez les nouveau-nés et la femme enceinte, et l'évolution de ces données pourraient être intéressantes à suivre par la suite. Cela aura notamment permis de mettre en évidence l'évolution au cours du temps de la résistance en particulier aux macrolides. Malgré une augmentation de cette résistance concernant les souches invasives, une tendance à la diminution semble se présenter au sein des souches de colonisation. La détermination de ces phénotypes mérite d'être étudiée de manière systématique dans les laboratoires de microbiologie, bien que *S. agalactiae* soit sensible de manière constante aux traitements de première intention qui sont des bêta-lactamines. En effet, ce suivi pourrait devenir un des marqueurs de suivi de l'évolution de la résistance aux macrolides chez les streptocoques, mais aussi les cocci Gram positifs au sens large.

## V. Références bibliographiques

1. Hanna, M. & Noor, A. Streptococcus Group B. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
2. Streptocoque du groupe B. <https://cnr-strep.fr/index.php/infections-a-streptocoque/infection-neonatale-a-streptococcus-agalactiae>.
3. Fry, R. M. Fatal infections by haemolytic *Streptococcus* group B. *The Lancet* **231**, 199–201 (1938).
4. Mannik, M., Baringer, J. R. & Stokes, J. Infections due to group B beta-hemolytic Streptococci. *N. Engl. J. Med.* **266**, 910–913 (1962).
5. Six, A., Joubrel, C., Tazi, A. & Poyart, C. Infections materno-fœtales à *Streptococcus agalactiae*. *Presse Médicale* **43**, 706–714 (2014).
6. Van der Mee-Marquet, N. *et al.* Genetic diversity of *Streptococcus agalactiae* strains and density of vaginal carriage. *J. Med. Microbiol.* **58**, 169–173 (2009).
7. Raabe, V. N. & Shane, A. L. Group B Streptococcus (*Streptococcus agalactiae*). *Microbiol. Spectr.* **7**, (2019).
8. Cho, C.-Y. *et al.* Group B Streptococcal infection in neonates and colonization in pregnant women: An epidemiological retrospective analysis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **52**, 265–272 (2019).
9. Money, D. & Allen, V. M. The prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease. *J. Obstet. Gynaecol. Can. JOGC J. Obstet. Gynecol. Can. JOGC* **38**, S326–S335 (2016).
10. Russell, N. J. *et al.* Maternal colonization with group B *Streptococcus* and serotype distribution worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **65**, S100–S111 (2017).

11. Deutscher, M. *et al.* Incidence and severity of invasive *Streptococcus pneumoniae*, group A *Streptococcus*, and group B *Streptococcus* infections among pregnant and postpartum women. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **53**, 114–123 (2011).
12. Puopolo, K *et al.* Group B streptococcal infection in pregnant women (2017)
13. Tazi, A. *et al.* Méningite néonatale à streptocoque du groupe B. *médecine/sciences* **27**, 362–364 (2011).
14. Nanduri, S. A. *et al.* Epidemiology of invasive early-onset and late-onset Group B streptococcal disease in the United States, 2006 to 2015. *JAMA Pediatr.* **173**, 224–233 (2019).
15. Ong, S. W., Barkham, T., Kyaw, W. M., Ho, H. J. & Chan, M. Characterisation of bone and joint infections due to Group B *Streptococcus* serotype III sequence type 283. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **37**, 1313–1317 (2018).
16. Hansen, S. M., Uldbjerg, N., Kilian, M. & Sørensen, U. B. S. Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 83–89 (2004).
17. Weindling, A. M., Hawkins, J. M., Coombes, M. A. & Stringer, J. Colonisation of babies and their families by group B streptococci. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed* **283**, 1503–1505 (1981).
18. Slotved, H.-C. & Hoffmann, S. The Epidemiology of Invasive Group B *Streptococcus* in Denmark From 2005 to 2018. *Front. Public Health* **8**, (2020).
19. High, K. P., Edwards, M. S. & Baker, C. J. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 839–847 (2005).

20. Hasperhoven, G. F., Al-Nasiry, S., Bekker, V., Villamor, E. & Kramer, B. Universal screening versus risk-based protocols for antibiotic prophylaxis during childbirth to prevent early-onset group B streptococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **127**, 680–691 (2020).
21. Jones, N. *et al.* Multilocus sequence typing system for Group B Streptococcus. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 2530–2536 (2003).
22. Rallu, F., Barriga, P., Scrivo, C., Martel-Laferrière, V. & Laferrière, C. Sensitivities of antigen detection and PCR assays greatly increased compared to that of the standard culture method for screening for Group B *Streptococcus* carriage in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 725–728 (2006).
23. Dunne, W. M. & Holland-Staley, C. A. Comparison of NNA agar culture and selective broth culture for detection of group B streptococcal colonization in women. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2298–2300 (1998).
24. Haenni, M., Lupo, A. & Madec, J.-Y. Antimicrobial resistance in *Streptococcus spp.* *Microbiol. Spectr.* **6**, (2018).
25. Rigvava, S., Kharebava, S., Giorgobiani, T., Dvalidze, T. & Goderdzishvili, M. Identification and antibiotic susceptibility patterns of *Streptococcus agalactiae*. *Georgian Med. News* 149–153 (2019).
26. Zhang, X. X. *et al.* Clinical analysis of children with group B streptococcal meningitis in 2013-2017 in a single center. *Zhonghua Er Ke Za Zhi Chin. J. Pediatr.* **57**, 452–457 (2019).
27. Gajic, I. *et al.* Molecular epidemiology of invasive and non-invasive group B *Streptococcus* circulating in Serbia. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **309**, 19–25 (2019).

28. Moroi, H. *et al.* Isolation of group B *Streptococcus* with reduced  $\beta$ -lactam susceptibility from pregnant women. *Emerg. Microbes Infect.* **8**, 2–7 (2019).
29. Banno, H. *et al.* High isolation rate and multidrug resistance tendency of penicillin-susceptible group B *Streptococcus* with reduced ceftibuten susceptibility in Japan. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **37**, 1511–1519 (2018).
30. Kimura, K. *et al.* First molecular characterization of group B *Streptococci* with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2890–2897 (2008).
31. Li, J. *et al.* Molecular characteristics of group B *Streptococcus* isolates from infants in southern mainland China. *BMC Infect. Dis.* **19**, 812 (2019).
32. Bozdogan, B. *et al.* A new resistance gene, linB, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 925–929 (1999).
33. Betriu, C. *et al.* Erythromycin and Clindamycin resistance and Telithromycin susceptibility in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1112–1114 (2003).
34. Loulergue, J., Couhé, C., Grasmick, C., Laudat, P. & Quentin, R. Sensibilité aux antibiotiques des souches de streptocoque du groupe B de portage vaginal isolées en France, 2003. 4.
35. Duboureau, H., Achkar, K., Stephan, R., Schmit, J. L. & Saint, F. Ecology and fluoroquinolon resistance profiles in febrile urinary tract infections (FUTI) after prostate needle biopsy: A retrospective study in 466 biopsies]. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* **27**, 345–350 (2017).

36. Piccinelli, G. *et al.* Emergence of the first levofloxacin-resistant strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 2466–2469 (2015).
37. Arias, B. *et al.* Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus agalactiae* invasive isolates recovered in Argentina. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N* **25**, 739–743 (2019).
38. Toniolo, C. *et al.* *Streptococcus agalactiae* capsule polymer length and attachment is determined by the proteins cpsABCD. *J. Biol. Chem.* **290**, 9521–9532 (2015).
39. Marques, M. B., Kasper, D. L., Pangburn, M. K. & Wessels, M. R. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infect. Immun.* **60**, 3986–3993 (1992).
40. Cieslewicz, M. J. *et al.* Structural and genetic diversity of group B *Streptococcus* capsular polysaccharides. *Infect. Immun.* **73**, 3096–3103 (2005).
41. Spellerberg, B. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes Infect.* **2**, 1733–1742 (2000).
42. Wessels, M. R., Haft, R. F., Heggen, L. M. & Rubens, C. E. Identification of a genetic locus essential for capsule sialylation in type III group B streptococci. *Infect. Immun.* **60**, 392–400 (1992).
43. Rubens, C. E., Heggen, L. M., Haft, R. F. & Wessels, M. R. Identification of cpsD, a gene essential for type III capsule expression in group B streptococci. *Mol. Microbiol.* **8**, 843–855 (1993).
44. Imperi, M. *et al.* A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. *J. Microbiol. Methods* **80**, 212–214 (2010).



45. Slotved, H.-C., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S. & Gilbert, G. L. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2929–2936 (2007).
46. Alhazmi, A., Hurteau, D. & Tyrrell, G. J. Epidemiology of invasive Group B streptococcal disease in Alberta, Canada, from 2003 to 2013. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 1774–1781 (2016).
47. Skoff, T. H. *et al.* Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **49**, 85–92 (2009).
48. Tong, Z., Kong, F., Wang, B., Zeng, X. & Gilbert, G. L. A practical method for subtyping of *Streptococcus agalactiae* serotype III, of human origin, using rolling circle amplification. *J. Microbiol. Methods* **70**, 39–44 (2007).
49. Sun, Y., Kong, F., Zhao, Z. & Gilbert, G. L. Comparison of a 3-Set genotyping system with multilocus sequence typing for *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*). *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4704–4707 (2005).
50. Zhao, Z. *et al.* Distribution of genotypes and antibiotic resistance genes among invasive *Streptococcus agalactiae* (group B *streptococcus*) isolates from Australasian patients belonging to different age groups. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**, 260–267 (2008).
51. Rolland, K., Marois, C., Siquier, V., Cattier, B. & Quentin, R. Genetic features of *Streptococcus agalactiae* strains causing severe neonatal infections, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis and hylB gene analysis. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1892–1898 (1999).

52. Gherardi, G. *et al.* Molecular epidemiology and distribution of Serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B *Streptococci* in Italy. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2909–2916 (2007).
53. Bohnsack, J. F. *et al.* Phylogenetic classification of serotype III group B *Streptococci* on the basis of hylB gene analysis and DNA sequences specific to restriction digest pattern type III-3. *J. Infect. Dis.* **183**, 1694–1697 (2001).
54. Takahashi, S. *et al.* Identification of a highly encapsulated, genetically related group of invasive type III group B *Streptococci*. *J. Infect. Dis.* **177**, 1116–1119 (1998).
55. Hauge, M., Jespersgaard, C., Poulsen, K. & Kilian, M. Population structure of *Streptococcus agalactiae* reveals an association between specific evolutionary lineages and putative virulence factors but not disease. *Infect. Immun.* **64**, 919–925 (1996).
56. Kong, F., Martin, D., James, G. & Gilbert, G. L. Towards a genotyping system for *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus): use of mobile genetic elements in Australasian invasive isolates. *J. Med. Microbiol.* **52**, 337–344 (2003).
57. Beauruelle, C., Pastuszka, A., Mereghetti, L. & Lanotte, P. Group B *Streptococcus* vaginal carriage in pregnant women as deciphered by clustered regularly interspaced short palindromic repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* **56**, (2018).
58. Beauruelle, C. *et al.* CRISPR: a useful genetic feature to follow vaginal carriage of group B *Streptococcus*. *Front. Microbiol.* **8**, 1981 (2017).
59. Beauruelle, C. *et al.* Whole-genome sequencing confirms the coexistence of different colonizing group B *Streptococcus* isolates underscored by CRISPR typing. *Microbiol. Resour. Announc.* **9**, (2020).

60. Burcham, L. R. *et al.* Determinants of group B streptococcal virulence potential amongst vaginal clinical isolates from pregnant women. *PloS One* **14**, e0226699 (2019).
61. Six, A. *et al.* Srr2, a multifaceted adhesin expressed by ST-17 hypervirulent group B *Streptococcus* involved in binding to both fibrinogen and plasminogen. *Mol. Microbiol.* **97**, 1209–1222 (2015).
62. Honsa, E. *et al.* Assignment of *Streptococcus agalactiae* isolates to clonal complexes using a small set of single nucleotide polymorphisms. *BMC Microbiol.* **8**, 140 (2008).
63. Price, E. P., Inman-Bamber, J., Thiruvengkataswamy, V., Huygens, F. & Giffard, P. M. Computer-aided identification of polymorphism sets diagnostic for groups of bacterial and viral genetic variants. *BMC Bioinformatics* **8**, 278 (2007).
64. Ferrieri, P., Baker, C. J., Hillier, S. L. & Flores, A. E. Diversity of surface protein expression in group B streptococcal colonizing & invasive isolates. *Indian J. Med. Res.* **119 Suppl**, 191–196 (2004).
65. Ferrieri, P. & Flores, A. E. Surface protein expression in group B streptococcal invasive isolates. *Adv. Exp. Med. Biol.* **418**, 635–637 (1997).
66. Guo, H. *et al.* Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* from pregnant women in southern China. *J. Infect. Dev. Ctries.* **13**, 802–809 (2019).
67. Campo, C. H., Martínez, M. F., Otero, J. C. & Rincón, G. Vagino-rectal colonization prevalence by *Streptococcus agalactiae* and its susceptibility profile in pregnant women attending a third-level hospital. *Biomed. Rev. Inst. Nac. Salud* **39**, 689–698 (2019).

68. Joubrel, C. *et al.* Group B streptococcus neonatal invasive infections, France 2007–2012. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, 910–916 (2015).
69. Guillaume, C., Intérêt de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF pour l'identification d'espèces, de sous-espèces et de certaines lignées bactériennes au sein du genre *Streptococcus*, *Thèse d'exercice pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie*(2017)
70. Bouvet D., Infection et colonisation à *Streptococcus agalactiae* chez les femmes enceintes et les nouveau-nés : caractérisation des souches sur une période de 10 ans au CHU de Tours., *Thèse d'exercice pour le diplôme d'état de docteur en médecine* (2011)

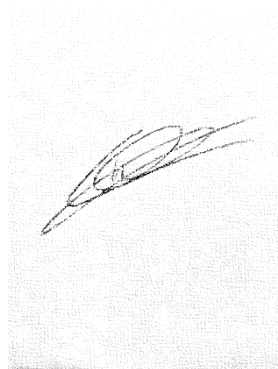
## ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) LE GALLOU Brice .....

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (Décret n°92-657 du 13 juillet 1992)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



**SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN**

N° Étudiant : **21709758**

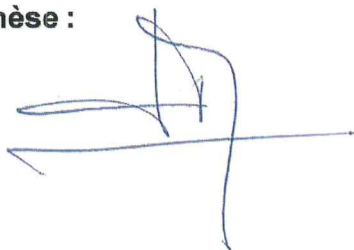
N° Thèse : **59**

Nom et Prénom : **LE GALLOU Brice**

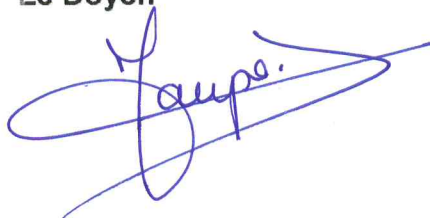
Sujet : Colonisation et infection materno-foetale à *Streptococcus agalactiae* : étude  
épidémiologique au CHRU de TOURS entre 2000 et 2018

Tours, le : **23/10/20**

Le(s) Directeur(s) de Thèse :



**Vu et Transmis :  
Le Doyen**



Colonisation et infection materno-fœtales à *Streptococcus agalactiae* : étude épidémiologique au CHRU de Tours de 2000 à 2018.

## RÉSUMÉ DE LA THÈSE

*STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EST LE PREMIER AGENT RESPONSABLE D'INFECTION MATERNO-FŒTALE. CETTE BACTÉRIE COMMENSALE, RETROUVÉE AU NIVEAU DES TRACTUS GÉNITAL ET DIGESTIF, COLONISE NOTAMMENT LE VAGIN DE 10% À 25% DES FEMMES ENCEINTES. EN L'ABSENCE D'ANTIBIOPROPHYLAXIE PER-PARTUM, 50% À 70% DES NOUVEAUX-NÉS SE RETROUVENT COLONISÉS À LEUR TOUR, ET 2% D'ENTRE EUX DÉCLARERONT UNE INFECTION À *S. AGALACTIAE*. DE NOMBREUSES ÉTUDES ONT MIS EN ÉVIDENCE QUE LES SOUCHES INVASIVES SONT POUR LA MAJORITÉ DE SÉROTYPE CAPSULAIRE III ET APPARTIENNENT AU COMPLEXE CLONAL CC17.

L'OBJECTIF DE CE TRAVAIL A ÉTÉ DE RÉALISER UN SUIVI ÉPIDÉMIOLOGIQUE DES SOUCHES DE *S. AGALACTIAE* RESPONSABLES DE COLONISATION VAGINALE ET D'INFECTIONS CHEZ LA FEMME ENCEINTE ET LES NOUVEAUX-NÉS. CE TRAVAIL A ÉTÉ RÉALISÉ EN CARACTÉRISANT DES SOUCHES DE *S. AGALACTIAE* ISOLÉES AU CHRU DE TOURS ENTRE 2000 ET 2018 PAR TYPAGE CAPSULAIRE PAR AMPLIFICATION MULTIPLEX DES GÈNES DE LA CAPSULE, DÉTERMINATION DU COMPLEXE CLONAL PAR ANALYSE DES SINGLE NUCLEOTID POLYMORPHISM PAR PCR EN TEMPS REEL ET DÉTERMINATION DE LEUR PHÉNOTYPE DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES PAR DIFFUSION EN MILIEU GÉLOSE.

LE PORTAGE VAGINAL DE *S. AGALACTIAE* CHEZ LA FEMME ENCEINTE A ÉTÉ ÉVALUÉ À 10% DANS NOTRE COHORTE. CE TRAVAIL A MIS EN ÉVIDENCE QUE LES SÉROTYPES III, IA ET V SONT MAJORITAIRES QUELLE QUE SOIT L'ORIGINE DES SOUCHES. LE SÉROTYPE III EST PRÉDOMINANT PARMI LES SOUCHES INVASIVES, EN PARTICULIER POUR LES SOUCHES ISOLÉES D'INFECTIONS NEONATALES TARDIVES. LES SOUCHES ANALYSÉES APPARTIENNENT MAJORITAIREMENT AUX COMPLEXES CLONAUX CC1, CC17, CC29, CC23 ET CC10. LES SOUCHES DE CC17 SONT BIEN PLUS REPRÉSENTÉES AU SEIN DES SOUCHES RESPONSABLES D'INFECTIONS NEONATALES, ET EN PARTICULIER PARMI LES INFECTIONS TARDIVES. L'ÉVOLUTION DES RÉSISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES MONTRE UNE STABILITÉ DANS LE TEMPS DE LA RÉSISTANCE À LA TETRACYCLINE (83% DES SOUCHES). LA RÉSISTANCE AUX MACROLIDES EST STABLE POUR LES SOUCHES DE COLONISATION, MAIS ELLE SEMBLE EN AUGMENTATION POUR LES SOUCHES INVASIVES.

*Streptococcus agalactiae*, épidémiologie, colonisation materno-fœtale, infections néonatale, résistance, sérotypage, typage moléculaire,

## JURY

PRÉSIDENT : M. le Professeur Philippe Lanotte, PU-PH, Faculté de Pharmacie et CHRU de TOURS

MEMBRES : M. le Professeur Laurent Mereghetti, PU-PH, Faculté de Médecine et CHRU de TOURS

Mme le Docteur Cécile Le Brun, Pharmacien PH, CHRU de TOURS

Mr le Docteur Jérôme Potin, Médecin PH, CHRU de TOURS

Mme le Professeur Delphine Mitanchez, PU-PH, Faculté de Médecine et CHRU de TOURS

Soutenue publiquement le 23 octobre 2020 à la faculté de pharmacie de Tours