

**ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS
UNIVERSITÉ DE TOURS**

FACULTÉ DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2021

N°85

**MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
Spécialité Biologie médicale**

**TENANT LIEU DE THÈSE D'EXERCICE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par Camille PETILLON

Née le 25/01/1993 à TOULOUSE (31)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 08/10/2021

**Expression du système de sécrétion de type VIIb de
*Streptococcus agalactiae***

JURY

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

Membres : M. le Docteur Eric MORELLO, MCU, Université de TOURS
M. le Professeur Laurent MEREGHETTI, PU-PH, Faculté de Médecine et
CHRU de TOURS
Mme le Docteur Isabelle VIRLOGEUX-PAYANT, Directrice de recherche,
INRAE de Nouzilly
Mme le Docteur Adeline PASTUSZKA, AHU, Faculté de Médecine et
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

10 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
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
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

6 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
GIRAudeau	Bruno	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

2 PROFESSEURS ÉMERITES

GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

35 MAITRES DE CONFÉRENCES

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
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-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BOUVIN-PLY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAYE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

Mise à jour du 05/01/2020

LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MARCHAIS	Hervé	PHARMACIE GALENIQUE
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MUNNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
OMBETTA-GOKA	Jean-Edouard	CHIMIE ORGANIQUE
ODIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA
VIERRON	Emilie	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

3 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
RESPAUD	Renaud	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE

1 CONTRAT D'ENSEIGNEMENT

VANIER	Antoine	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
--------	---------	-----------------------------

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

2 CHARGÉS DE RECHERCHE

MEVELEC	Marie-Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE

1 PHARMACIEN D'OFFICINE – PAST (Enseignant Associé)

JOYEUX	VINCENT	Filière Pharmacie
--------	---------	-------------------

2 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

1 ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche)

HEREDIA-MARQUEZ	Arturo Vladimir	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
-----------------	-----------------	------------------------------------------



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 : 8/10/21

L'étudiant

Mme PETILLON Camille

*Le Doyen de la Faculté
Professeur Véronique Maupoil*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Philippe Lanotte de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Merci pour votre accompagnement, votre écoute et votre bienveillance tout au long de mon parcours d'internat. Trier la paillassse de microbiologie avec vous aura été un plaisir, toujours un petit message, des connaissances à partager pour chaque dossier clinique, j'en ai noté des choses dans mon petit carnet !

Je remercie le Professeur Laurent Mereghetti de m'avoir accordée sa confiance lors de mon passage dans son service. Merci pour votre disponibilité et pour avoir toujours pris à cœur de savoir où en étaient mes projets futurs et mes recherches de poste (ça a été du stress cette recherche de postes pour mon compagnon et moi dans la même ville !), ainsi que pour l'autonomie que vous m'avez rapidement laissée en tant qu'interne dans votre service, cela m'a permis de prendre davantage confiance en moi. Je vous remercie également de m'avoir permis d'effectuer mon master 2 et la suite des manip pour ma thèse au sein de l'équipe Bactéries et Risque Materno-Fœtal.

Mes remerciements vont ensuite au Docteur Eric Morello, mon directeur de thèse, avec qui mes racines toulousaines ont refait surface (« ça pègue », « à m'en donné »). Merci d'avoir accepté de diriger ma thèse d'exercice (une première pour toi ! Promis c'est beaucoup moins long qu'une thèse scientifique !). Ce fut un plaisir de travailler avec toi : pour ta disponibilité, le partage de tes connaissances et pour tes conseils avisés (y compris dans les moments où je voulais aller plus vite que la musique dans mes manip ; ça a rarement été concluant !) mais surtout... pour ton optimisme sans failles quand « ça ne marche pas comme je veux ». Pour résumer nos échanges entre deux centri : « Uno, dos, tres...Cinco, seis, siete 🎶 ».

Je remercie le Docteur Adeline Pastuszka et le Docteur Isabelle Virlogeux-Payant d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'évaluer mon travail de thèse. Ce fut un plaisir de travailler à tes côtés Adeline autant au labo de bactério qu'au labo de recherche. Je te souhaite bon courage pour ton périple canadien (il risque y faire beaucoup plus froid qu'au labo !!)

Mes remerciements s'adressent ensuite :

A l'ensemble des équipes des différents laboratoires où je suis passée en tant qu'interne, en particulier aux techniciennes et techniciens de bactériologie et de virologie de Tours (et leur super secrétaire Nora !) au contact desquels j'ai beaucoup appris et partagé de bons moments de rigolade, de chant (Aaaah les chansons qui restent en tête toute la journée !), et de danse (Because I'm happy 🎶). Merci à tous les biologistes de bactériologie et de virologie pour leur super encadrement, je pars de Tours avec un bagage solide pour appréhender la suite de mes aventures en tant que jeune assistante.

A l'ensemble des membres de l'équipe BRMF pour tous les conseils et l'aide qu'ils ont pu m'apporter au cours de mon stage de master 2. Ce fut un plaisir de passer cette année recherche à vos côtés dans la convivialité et la bonne humeur.

A tous les internes que j'ai pu côtoyer durant mon internat et tous ceux avec qui j'ai partagé de nombreuses soirées endiablées et weekend de folie (et qui se reconnaîtront), merci de m'avoir sortie, surtout durant cette dernière ligne droite !! Merci à la team Salsa qui a rythmé bon nombre de mes soirées !

A mes amies de longue date restées pour la plupart sur Toulouse (qui très certainement ne liront pas cette thèse et se demandent encore quand ma vie d'étudiante prendra fin !), merci d'avoir toujours été là pour moi.

A mes parents ainsi qu'à ma sœur qui m'ont toujours soutenue et encouragée tout au long de mon internat malgré la distance. On en aura passé des heures au téléphone et en visio ! Tous les moments passés ensemble auront été pour moi un vrai boost pour avancer. Et promis un jour, je vous expliquerai vraiment ce que je fais dans la vie !

A toi Joey qui partage ma vie depuis maintenant 5 ans, on en aura vécu des moments de stress ensemble ! Tu as toujours su trouver les bons mots pour m'encourager et donner le meilleur de moi-même, y compris dans les moments difficiles « On n'est pas bien là tous les deux ? ». A tous nos futurs projets !

« Une vie épanouie ne se construit pas en visant la perfection mais l'équilibre. »

Table des matières

Liste des abréviations.....	8
Liste des figures	10
Liste des tableaux	11
Liste des annexes	11
Partie I – Introduction bibliographique.....	12
1. <i>Streptococcus agalactiae</i> , agent d’infections invasives sévères aux âges extrêmes de la vie.....	13
1.1. Caractères bactériologiques.....	13
1.1.1. Taxonomie	13
1.1.2. Identification de la bactérie	13
1.1.3. Marqueurs épidémiologiques	14
1.2. Pouvoir pathogène.....	16
1.2.1. Infections néonatales	16
1.2.2. Infections chez l’adulte (hors grossesse).....	18
1.3. Prévention des infections néonatales.....	19
1.4. Sensibilité aux antibiotiques.....	21
1.5. Perspectives vaccinales	22
1.6. Virulence de <i>S. agalactiae</i>	23
2. Le système de sécrétion de type VII (SST7)	24
2.1. Découverte initiale chez les mycobactéries	24
2.2. Un système homologue (SST7b) décrit chez les Firmicutes et en particulier chez <i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.3. Rôles connus du SST7b au sein des Firmicutes	29
Partie II - Matériels et méthodes	31
1. Souches bactériennes et conditions de culture	32
2. Extraction des ARN totaux.....	32
3. Purification d’ADN chromosomique et plasmidique	32
4. PCR et RT-PCR.....	32
5. 5’-RACE PCR	33
6. Electroporation.....	33
7. Construction des fusions transcriptionnelles <i>lacZ</i>	33

8. Construction des fusions traductionnelles Flag au <i>locus</i>	34
9. Séquençage d'ADN	35
10. Dosage de l'activité β -galactosidase	35
11. <i>Western blot</i> et préparation des échantillons.....	36
Partie III – Résultats expérimentaux	38
1. La comparaison des <i>loci</i> codant le SST7b au sein des souches de référence de <i>S. agalactiae</i> révèle une importante variabilité génétique	39
2. L'expression des gènes codant le SST7b est hétérogène au sein des souches de référence de <i>S. agalactiae</i>	41
3. L'expression du SST7b est sous la dépendance d'un promoteur fort situé en amont du gène <i>esxA2</i> chez la souche A909	42
4. Un promoteur est présent au niveau de la région intergénique <i>SAK_1130-esxA1</i> chez la souche A909.....	44
5. La substitution A→G au niveau de la boîte -10 prédite du promoteur en amont de <i>esxA</i> chez la souche NEM316 se traduit par une inactivation du promoteur	47
6. Les protéines du translocon EsaA et EssC sont exprimées dans la souche A909 de <i>S. agalactiae</i>	50
7. La protéine effectrice EsxA2 est exprimée dans la souche A909 de <i>S. agalactiae</i> ...	52
Partie IV - Discussion	54
Partie V - Références bibliographiques	61
Annexes	68

Liste des abréviations

AA : Acide Aminé

ACOG : *American College of Obstetricians and Gynecologists*

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique Complémentaire

ADNg : Acide Désoxyribonucléique Génomique

ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé

ARN : Acide Ribonucléique

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

CC : *Clonal Complex*

CDC : *Center of Disease Control*

CFP-10 : *Culture Filtrate Protein*

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNGOF : Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français

CNR : Centre National de Référence

CRISPR-Cas9 : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Caspase 9*

DO : Densité Optique

DTT : Dithiothréitol

ESAT-6 : *Early Secreted Antigenic Target*

ESS : *ESAT-6 Secretion System*

ESX : *ESAT-6 Secretion Complex*

HAS : Haute Autorité de Santé

INP : Infection Néonatale Précoce

INT : Infection Néonatale Tardive

IV : Intraveineux

kb : kilobase

kDa : kilodalton

LB : Luria-Bertani

LXG : Leu-Xaa-Gly

M : mol/L

MLST : *MultiLocus Sequence Typing*

ONERBA : Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques

ONPG : O-Nitrophenyl β -D-Galactopyranoside

Pb : Paire de Base

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PLP : Protéine Liant la Pénicilline

PS : Peptide Signal

RACE-PCR : *Rapid Amplification of cDNA Ends - Polymerase Chain Reaction*

RBS : *Ribosome Binding Site*

RD1 : *Region of Difference 1*

RPM : *Revolutions Per Minute*

RT-PCR : *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

SA : Semaine d'Aménorrhée

SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

Sec : *general secretory pathway*

SGB : Streptocoque de Groupe B

SST7 ou T7SS : Système de Sécrétion de Type VII / *Type VII Secretion System*

ST : *Sequence Type*

TAT : *Twin Arginine Translocation*

TBST : *Tris-Buffered Saline Tween 20*

TDR : Test de Diagnostic Rapide

TH : Todd Hewitt

TSS : *Transcription Start Site*

WT : *Wild Type*

WXG100 : Trp-Xaa-Gly 100

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

Liste des figures

Figure 1 – Fréquence des 12 séquences-types (ST) les plus répandues chez <i>Streptococcus agalactiae</i>	15
Figure 2 – Distribution des sérotypes au sein des séquences-types (ST) ainsi que leurs complexes clonaux (CC) correspondants	15
Figure 3 – Scénario physiopathologique de l’infection néonatale à <i>S. agalactiae</i>	18
Figure 4 – Nombres estimés de cas d’infections invasives néonatales précoces et tardives à <i>S. agalactiae</i> de 1996 à 2012 en France métropolitaine.....	21
Figure 5 – Fonctions biologiques des systèmes de sécrétion de type VIIa (T7SSa) et VIIb (T7SSb)	25
Figure 6 – Comparaison des différents <i>clusters</i> de gènes codant les systèmes de sécrétion VIIa (<i>M. tuberculosis</i>) et VIIb (Firmicutes)	26
Figure 7 – Représentation schématique du <i>locus ess</i> de <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Figure 8 – Localisation subcellulaire et topologie prédite des différentes protéines constituant le SST7b de <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Figure 9 – Architecture de la machinerie de sécrétion du SST7b	28
Figure 10 – Comparaison des <i>loci</i> codant le SST7b au sein de différentes souches de référence de <i>S. agalactiae</i>	40
Figure 11 – Les gènes du <i>locus</i> codant le SST7b chez <i>S. agalactiae</i> sont exprimés chez les souches A909 et COH1 en conditions de laboratoire	42
Figure 12 – Les gènes du translocon sont transcrits en opéron avec le gène <i>esxA2</i> en amont et les gènes <i>esxC</i> , <i>SAK_1121</i> et <i>SAK_1120</i> en aval chez la souche A909	44
Figure 13 – Deux promoteurs forts <i>P_{esxA1}</i> et <i>P_{esxA2}</i> sont présents au niveau des régions intergéniques <i>SAK_1130-esxA1</i> et <i>esxA1-esxA2</i> respectivement chez la souche A909.....	45
Figure 14 – Quatre sites d’initiation de la transcription (TSS, <i>transcription start site</i>) sont présents au niveau du <i>locus</i> codant le SST7b chez la souche A909	46
Figure 15 – La boîte -10 prédite du promoteur en amont du gène <i>esxA</i> présente une substitution A→G chez la souche NEM316	48
Figure 16 – La substitution A→G au niveau de la boîte -10 prédite du promoteur en amont de <i>esxA</i> chez la souche NEM316 se traduit par une inactivation du promoteur	49
Figure 17 – Localisation subcellulaire et topologie prédite des différentes protéines constituant le SST7b de <i>S. agalactiae</i>	51
Figure 18 – La détection des fusions EsaA-Flag et EssC-Flag dans les fractions cellulaires de la souche A909 est dépendante de la phase de croissance bactérienne.....	52
Figure 19 – La fusion EsxA2-Flag est uniquement détectée dans la fraction cellulaire dans la souche A909	53

Liste des tableaux

Tableau 1 – Prédiction <i>in silico</i> de localisation des protéines de la machinerie de sécrétion SST7b dans la souche de <i>S. agalactiae</i> A909	50
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Liste des annexes

Annexe 1 – Souches bactériennes et plasmides utilisés pour cette étude	68
Annexe 2 – Amorces utilisées pour cette étude	70

PARTIE I

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. *Streptococcus agalactiae*, agent d'infections invasives sévères aux âges extrêmes de la vie

1.1. Caractères bactériologiques

1.1.1. Taxonomie

Streptococcus agalactiae appartient au *phylum* des Firmicutes, composé essentiellement de bactéries à Gram positif, à l'ordre des Lactobacillales et à la famille des *Streptococcaceae*. Au sein du genre *Streptococcus*, il appartient au groupe B de la classification établie par Rebecca Lancefield en 1966 qui est basée sur la nature antigénique d'un composé de la paroi des streptocoques, le polyside C, d'où son nom de « streptocoque du groupe B » (SGB) (1). La bactérie a été pour la première fois identifiée par le médecin vétérinaire et microbiologiste Edmond Nocard en 1887 et décrite comme responsable de mammite chez les vaches laitières (2). Ce n'est qu'en 1938 que le pathogène a été décrit en pathologie humaine suite à trois cas mortels de septicémie *post-partum* (3). Dans les années 1970, la bactérie devient alors le principal agent responsable d'infections néonatales.

1.1.2. Identification de la bactérie

S. agalactiae est une bactérie capsulée se présentant sous forme de *cocci* à Gram positif groupés en diplocoques ou en chaînettes de longueur variable, immobiles et non sporulés. Le SGB se développe sur des milieux de cultures riches tels que les géloses trypticase soja ou Columbia enrichies de 5% de sang (de cheval ou de mouton) et les bouillons à base de macération ou d'infusion de viande (Todd Hewitt (TH), cœur-cerveau, ...) (4). Le SGB peut aussi se cultiver sur des milieux chromogènes utilisés dans le cadre du dépistage anténatal à partir d'un prélèvement vaginal effectué chez la femme enceinte, comme la gélose Granada (Biomérieux) qui incubée en anaérobiose, permet d'exacerber l'expression d'un pigment caractéristique du SGB et les colonies apparaissent alors de couleur orange à rouge brique. Après 24 à 48 heures de culture à 37°C sur milieu nutritif gélosé additionné de sang, *S. agalactiae* se présente sous forme de petites colonies grisâtres, brillantes, à bords réguliers et réalise une discrète hémolyse totale dite β -hémolyse formant un halo transparent autour de la colonie. La famille des *Streptococcaceae* est dépourvue de catalase et d'oxydase et possède un métabolisme anaérobie-aérotolérant.

1.1.3. Marqueurs épidémiologiques

Au sein de l'espèce *S. agalactiae*, la classification des souches a tout d'abord été réalisée aux moyens de marqueurs phénotypiques comme la sérotypie reposant sur la réaction d'antisérums vis-à-vis des antigènes polysaccharidiques de la capsule bactérienne. Parmi les dix sérotypes décrits jusqu'ici, cinq (Ia, Ib, II, III et V) sont à l'origine de maladies chez l'Homme. Le SGB de sérotype III est particulièrement important car il est à l'origine d'un pourcentage significatif d'infections néonatales : il est notamment à lui seul responsable de 80% des méningites à streptocoques du nouveau-né (5).

L'importante évolution des techniques de séquençage des deux dernières décennies a permis de mettre en place de nouvelles méthodes de typage chez cette bactérie pour établir un lien entre patrimoine génétique des isolats et pouvoir pathogène. Le typage génomique multilocus (MLST, *multilocus sequence typing*) (6) a été développé pour déterminer le lien génétique entre les différents isolats de SGB afin de définir des génogroupes associés à certains contextes cliniques particuliers. Cette méthode est capable de distinguer de nombreuses séquences-types (ST, *sequence type*) (**Figure 1**) et de regrouper les séquences proches pour définir des complexes clonaux (CC, *clonal complex*) (7). Des lignées phylogénétiques bien définies sont associées à une pathogénicité spécifique. En particulier le CC17 constitue un groupe homogène spécifiquement adapté à l'Homme et, est composé principalement d'isolats impliqués dans la majorité des infections invasives chez le nouveau-né (80% des cas de méningites néonatales) (8). L'hyper-pathogénicité et le tropisme méningé du clone hypervirulent ST17 a récemment pu être attribuée à des capacités accrues de colonisation du tube digestif et de franchissement des barrières physiologiques, en particulier intestinale et hémato-encéphalique (2).

Les autres complexes clonaux majoritaires, impliqués chez l'homme dans les infections et/ou la colonisation sont les CC1, CC10, CC19 et CC23 (9). Il existe une relation entre ST et sérotype capsulaire, mais un sérotype capsulaire n'est généralement pas limité à un ST spécifique, et inversement (**Figure 2**).

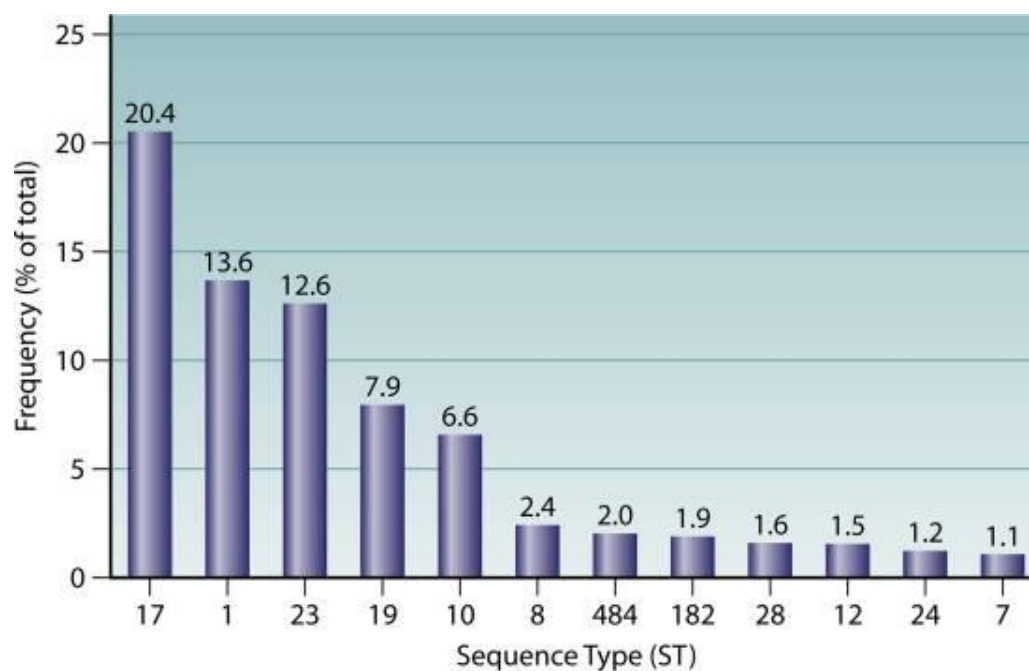


Figure 1 – Fréquence des 12 séquences-types (ST) les plus répandues chez *Streptococcus agalactiae*. Données disponibles dans la base MLST, qui comprend 635 ST (les ST restantes représentent <1% pour chaque) ; Furfaro *et al.*, 2018

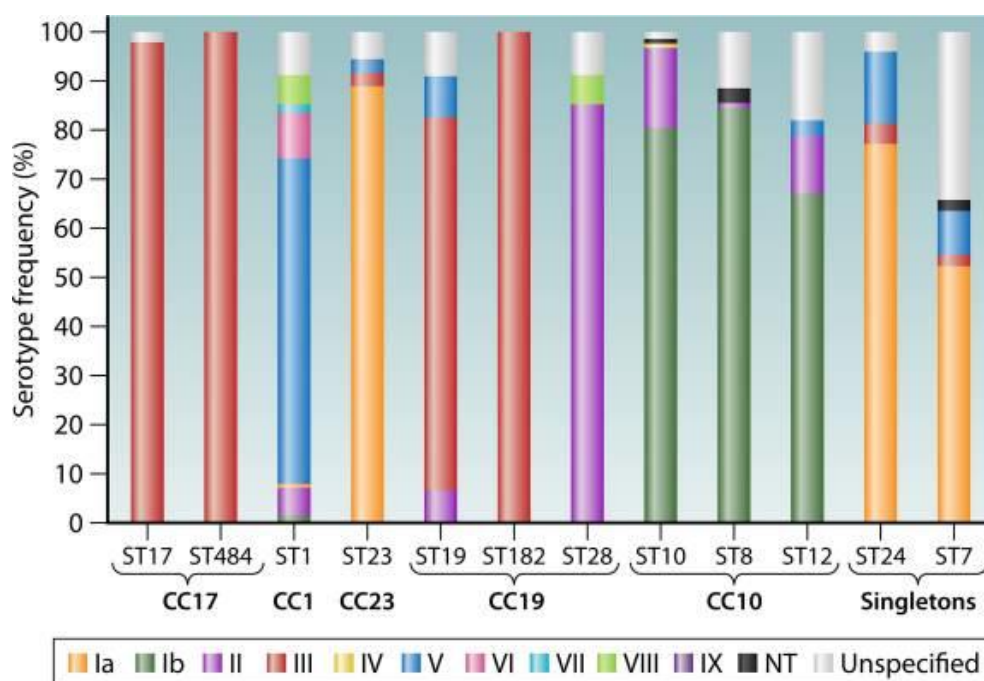


Figure 2 – Distribution des sérotypes au sein des séquences-types (ST) ainsi que leurs complexes clonaux (CC) correspondants ; Furfaro *et al.*, 2018

1.2. Pouvoir pathogène

1.2.1. Infections néonatales

Streptococcus agalactiae est une bactérie commensale du tube digestif qui colonise de manière asymptomatique les voies génitales d'environ 5 à 35 % des femmes. Ce pathogène représente la première cause d'infections néonatales invasives (10) avec une incidence des infections invasives à SGB chez les enfants de moins de 1 an estimée à 0,7 cas pour 1 000 naissances en France en 2018 (soit 482 cas d'infections invasives) (11). Malgré une nette amélioration des soins intensifs néonataux depuis les années 2000, le taux global de mortalité reste de 10%, et 40% des nouveau-nés garderont des séquelles neurologiques permanentes post-méningite (12).

La transmission verticale est le mode principal de transmission de la mère à l'enfant, soit par voie ascendante par infection *in utero* du liquide amniotique à partir du portage vaginal maternel, soit lors de la délivrance par inhalation ou ingestion des sécrétions vaginales au passage de la filière génitale maternelle. En l'absence d'antibioprophylaxie *per-partum*, le taux de transmission de la mère colonisée à son nouveau-né est de l'ordre de 50 à 75%, et 1 à 2% des nouveau-nés colonisés déclareront une infection invasive à SGB susceptible d'entraîner le décès ou de graves séquelles neurologiques après dissémination du pathogène (10). Les facteurs de risque maternels prédisposant le nouveau-né à une infection précoce à SGB sont la colonisation vaginale maternelle à *S. agalactiae*, un accouchement prématuré, une rupture prolongée des membranes de plus de 18 heures, une température de plus de 38°C pendant le travail ou encore un antécédent d'infection néonatale bactérienne à SGB (13). La transmission horizontale est possible après la naissance par contamination manuportée par la mère ou encore le personnel de la maternité.

Deux syndromes sont associés à l'infection par la bactérie selon l'âge de l'enfant lors de la déclaration de l'infection : le syndrome précoce, survenant dans les 72 premières heures le plus souvent et, au plus tard, dans la 1^{ère} semaine de vie (<7 jours) et le syndrome tardif caractérisé par des manifestations cliniques apparaissant entre 7 et 90 jours de vie (14).

Le syndrome précoce se caractérise essentiellement par des bactériémies et/ou des infections pulmonaires associées à une atteinte méningée dans 4 à 28% des cas selon les études (2,12). Cette forme est essentiellement due à une transmission verticale à partir de la

colonisation vaginale maternelle entraînant rapidement la colonisation de la muqueuse respiratoire du nouveau-né, puis le franchissement de l'épithélium conduit à la dissémination du pathogène et à un sepsis sévère associé à une pneumonie.

Le syndrome tardif quant à lui, se présente le plus souvent par une bactériémie associée à une atteinte méningée dans 50 % des cas, d'autres formes plus rares pouvant se manifester (cellulite, arthrite, ostéomyélite). Aucun facteur de risque n'explique ces formes tardives, en particulier le lien avec le portage vaginal maternel n'est pas établi (10,15). Le mode de transmission de la bactérie à l'enfant n'est pas clairement défini pour ce syndrome et reste encore très controversé. Différentes hypothèses sont émises comme une transmission horizontale maternelle durant la période périnatale mais aussi issue de l'hôpital ou d'une source communautaire (10,16). L'hypothèse d'une transmission par le lait maternel a également été avancée (17), mais est mise en défaut par les nombreux cas d'infections néonatales tardives qui surviennent chez des enfants non allaités. Un autre scénario possible est la transmission verticale de la bactérie lors de l'accouchement et la persistance de la bactérie au niveau digestif chez le nouveau-né suivie d'une translocation digestive tardive aboutissant alors à une dissémination hématogène (**Figure 3**) (2).

Le Centre National de Référence (CNR) français des streptocoques a recensé sur une période de 2007 à 2012, à partir de 438 infections invasives néonatales à SGB notifiées, 40% de syndromes précoces et 60% de syndromes tardifs. Les sérotypes I à V représentaient 98 % des infections dont le sérotype III, à lui-seul, représentait 57% des syndromes précoces et 80% des syndromes tardifs (12). Il existe une forte association entre un unique clone de sérotype capsulaire III, le ST17, et infection néonatale tardive d'une part et méningite néonatale d'autre part. Ce clone désigné d'hypervirulent a été responsable de 60% des infections néonatales à SGB déclarées au CNR Streptocoques entre 2007 et 2012, de près de 80% des syndromes tardifs, et de 80% des méningites tous syndromes confondus (2,9). Une comparaison de souches de SGB de différents ST a révélé une capacité accrue d'adhérence des souches ST17 aux cellules de l'épithélium intestinal et de l'endothélium vasculaire cérébral comparé aux souches non-ST17. Le clone ST17 serait plus à même de coloniser le tube digestif et de traverser les barrières intestinale et hémato-encéphalique, ceci en accord avec l'association entre ST17 et syndrome tardif (18).

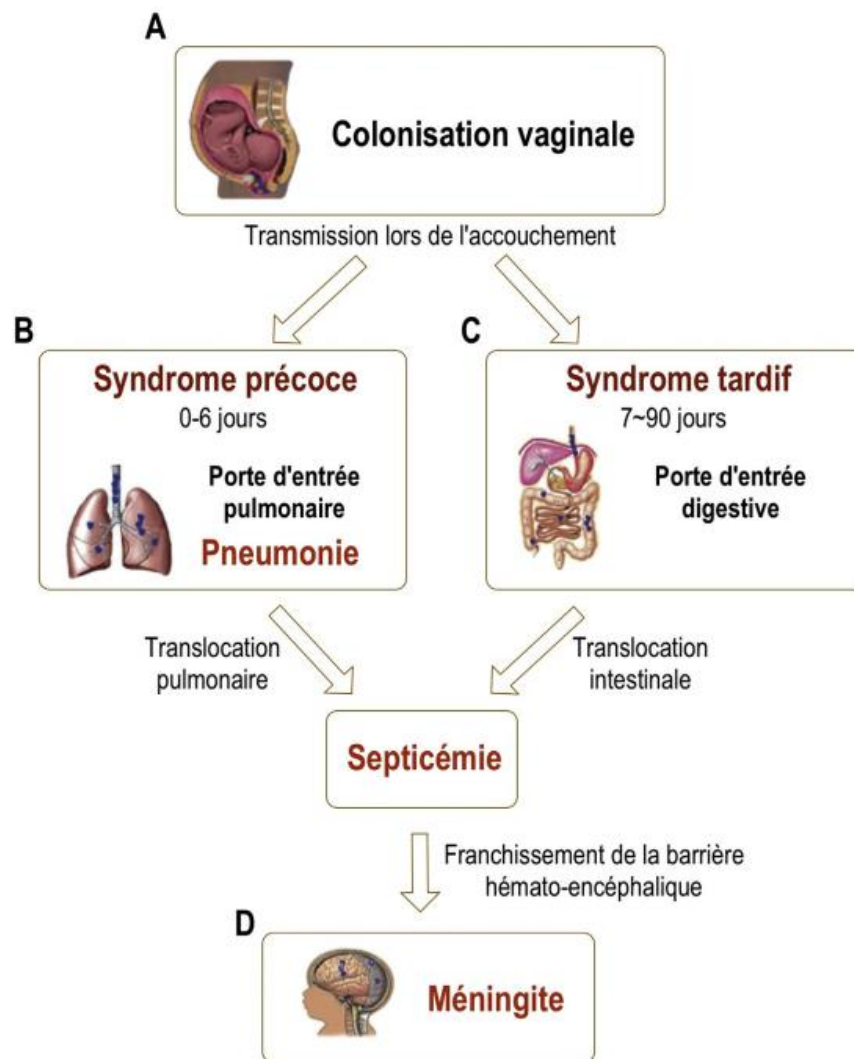


Figure 3 – Scénario physiopathologique de l’infection néonatale à *S. agalactiae* ; Six *et al.*, 2014

1.2.2. Infections chez l’adulte (hors grossesse)

Plus récemment, *S. agalactiae* occupe une nouvelle place en tant qu’agent infectieux émergent chez les sujets adultes âgés et/ou immunodéprimés. En effet, il est à l’origine d’une morbidité et d’une mortalité non négligeables chez les individus souffrant de pathologies sous-jacentes, en particulier chez les plus de 65 ans (cancers, diabète, insuffisance rénale chronique, cirrhose, maladies cardiovasculaires,...) (2). Une recrudescence des infections invasives à *S. agalactiae* dans la population adulte (femmes enceintes exclues) a été constatée depuis deux décennies. En effet, le bulletin du réseau EPIBAC qui a pour objectif de surveiller l’incidence des infections invasives bactériennes, a recensé 1903 cas d’infections invasives (méningites et bactériémies) à SGB chez les sujets âgés ≥ 65 ans en France en 2018 contre 1335 cas en 2011

(11,19). Chez les individus colonisés (20 à 35 % de la population), le SGB est généralement isolé de cultures au niveau rectal, périanal, vaginal, cervical, urétral ou moins communément à partir de la peau ou du pharynx. Des pathologies chroniques associées à une altération des barrières physiologiques que constituent la peau et les muqueuses (diabète, maladies vasculaires périphériques, escarres, maladie ulcéreuse, ...) augmentent le risque d'infection invasive par échappement de la bactérie de son réservoir. Les manifestations cliniques sont variées mais les plus fréquentes sont les bactériémies sans source clairement identifiée et les infections de la peau et des tissus mous. Parmi les autres signes cliniques retrouvés, les infections ostéoarticulaires, les pneumonies, les infections urinaires et plus rarement, les endocardites et les méningites ont été décrits (20). Chez cette population à risque, plus des deux tiers des cas sont attribuables aux sérotypes Ia, III et V, avec une émergence en particulier du sérotype V (21).

1.3. Prévention des infections néonatales

Dans la plupart des pays industrialisés, des mesures ont été prises dans le cadre de la prévention anténatale du risque d'infection du nouveau-né. Aux Etats-Unis, dès 1996, le CDC (*Center of Disease Control*) en collaboration avec l'*American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) a émis des recommandations d'utilisation d'une antibioprophylaxie *per partum*. En 2002, le dépistage de la colonisation à *S. agalactiae* des femmes enceintes est ajouté à ces recommandations afin d'optimiser l'identification des femmes devant bénéficier de l'antibioprophylaxie *per-partum*. En France, le Collège national des gynécologues et obstétriciens français (CNGOF) a recommandé en 1997 le dépistage systématique de la colonisation des femmes enceintes et, en 2001, l'HAS (Haute Autorité de Santé) suite aux recommandations de l'ANAES (Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé) intègre ces recommandations dans le cadre de la prévention des infections néonatales, avec un dépistage systématique du portage de *S. agalactiae* en fin de grossesse, entre 34 et 38 SA (22).

Dans le cas d'un portage vaginal positif dépisté pendant la grossesse ou d'une bactériurie asymptomatique à *S. agalactiae*, ou en présence de facteurs de risques tels qu'un accouchement prématuré, une rupture prolongée des membranes de plus de 18 heures, une température de plus de 38°C pendant le travail ou encore un antécédent d'infection néonatale bactérienne à SGB, une antibioprophylaxie *per partum* à base de pénicilline G ou d'amoxicilline par voie intraveineuse (IV) en 1^{ère} intention, toutes les 4 heures dès le déclenchement du travail jusqu'à

la naissance est recommandée. En cas d'allergie à la pénicilline, l'érythromycine ou un apparenté aux macrolides, la clindamycine, sont administrés en IV, après vérification sur l'antibiogramme que la souche est bien sensible. En effet, en France, aucune souche résistante à la pénicilline n'a encore été décrite mais, ces dernières années, une augmentation du nombre d'isolats cliniques résistants aux macrolides et apparentés a été observée au niveau mondial, avec une forte association avec le sérotype capsulaire V.

Plusieurs milieux sélectifs ou chromogènes pour l'isolement et l'identification de *S. agalactiae* sont commercialisés dans le cadre du dépistage anténatal de SGB. Des Tests de Diagnostic Rapide (TDR) reposant sur des techniques d'immunochromatographie (reconnaissance d'antigènes spécifiques de *S. agalactiae*) ou de biologie moléculaire et destinés aux femmes enceintes hospitalisées n'ayant pas pu bénéficier d'un dépistage préalable (rupture prématurée des membranes, menace d'accouchement prématuré, absence de suivi médical) sont également disponibles. Les techniques de biologie moléculaire (PCR, *polymerase chain reaction*) bénéficient d'excellentes sensibilité et spécificité et l'existence de kits et d'automates commerciaux rend leur utilisation possible au lit des patientes. Ces techniques sont recommandées, aux États-Unis et au Canada, pour les femmes à terme au statut de portage inconnu (22). Cependant, elles sont plus contraignantes et davantage coûteuses justifiant le maintien du dépistage par culture en 1^{ère} intention, notamment en France.

Il est important de noter que bien que le nombre de cas d'infections néonatales précoces (INP) à SGB ait diminué depuis l'instauration du dépistage systématique des femmes enceintes et de l'antibioprophylaxie *per-partum*, le nombre de cas d'infections néonatales tardives (INT) reste stable, voire en légère augmentation (**Figure 4**). Cette augmentation est due à l'incapacité actuelle de prévenir les INT par l'antibioprophylaxie *per-partum* (22). En effet l'antibioprophylaxie permet une diminution de la charge bactérienne mais n'élimine pas totalement la bactérie et il a été mis en évidence une persistance accrue du clone ST17 après une antibioprophylaxie par rapport aux autres souches (23). La majorité des cas de syndromes précoces actuellement recensés en France peut être expliquée par une absence de dépistage de la mère ou par des faux négatifs (22). En effet, le portage vaginal de SGB au cours de la grossesse est chronique, intermittent ou transitoire, et un prélèvement positif entre 35 et 37 SA le sera encore dans 87 % des cas au moment de l'accouchement. Cependant, 5 à 10 % des femmes dont le dépistage est négatif seront positives à l'accouchement (24).

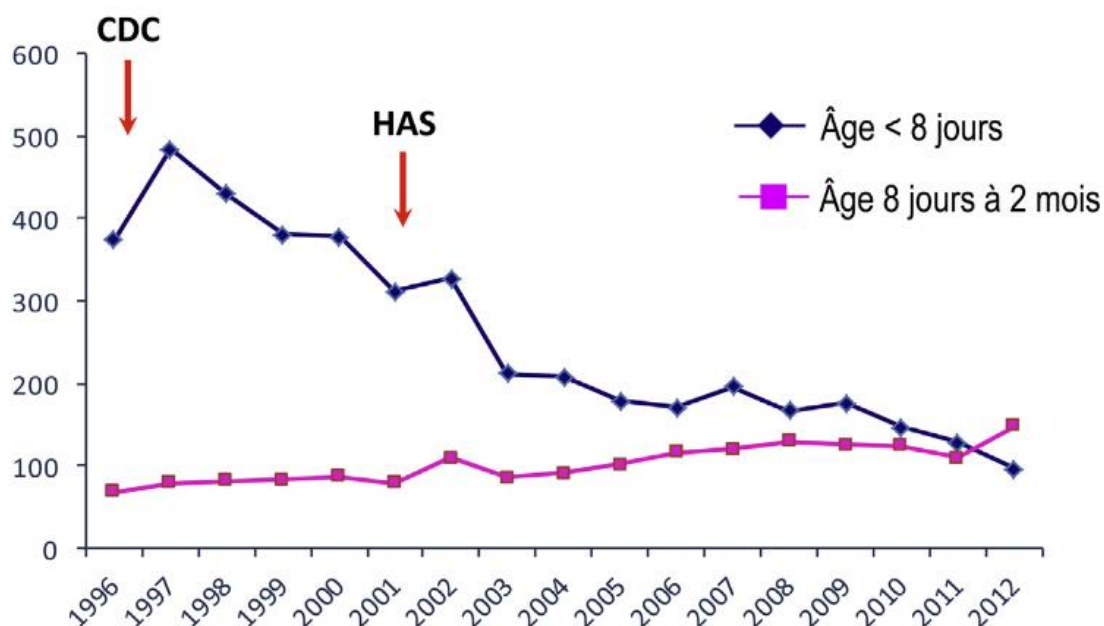


Figure 4 – Nombres estimés de cas d’infections invasives néonatales précoces et tardives à *S. agalactiae* de 1996 à 2012 en France métropolitaine. Emission des recommandations de prévention par les autorités de santé américaines (*Center of Disease Control*, CDC) et françaises (Haute Autorité de santé, HAS) ; Six *et al.*, 2014

1.4. Sensibilité aux antibiotiques

S. agalactiae est sensible aux β -lactamines et en particulier à la pénicilline G, aux aminopénicillines et aux carbapénèmes. Les céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} génération sont également actives mais parmi elles, la cefotaxime est la seule molécule utilisable chez le nouveau-né retrouvée dans le liquide céphalo-rachidien à une concentration minimale inhibitrice (CMI) comparable à celle des pénicillines (10). De rares souches de *S. agalactiae* dites de sensibilité diminuée à la pénicilline ont été décrites au Japon, secondaire à une expression réduite de la protéine liant les pénicillines 2x (PLP2x) (14). Le SGB possède une résistance naturelle de bas niveau aux aminosides, l’association d’une β -lactamine à un aminoside dans le cas des infections sévères permettant une action synergique bactéricide. Des résistances acquises aux macrolides et apparentés, qui constituent les molécules utilisées en 2^{ème} intention dans l’antibioprophylaxie *per partum* en cas d’allergie aux β -lactamines, ont été décrites.

L’Observatoire National de l’Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (ONERBA) a recensé en 2017, 30,6% et 17,4% des souches résistantes à l’érythromycine et aux apparentés aux macrolides, la clindamycine et la lincomycine,

respectivement (25). Il s'agissait essentiellement d'une résistance par méthylation de l'ARN ribosomal 23S, par une méthylase codée par les gènes *erm*, dont l'expression peut être inductible ou constitutive, touchant l'ensemble des macrolides, les lincosamides et la streptogramine B (phénotype MLSb). Des mécanismes d'efflux, codé par *mefA* sont aussi retrouvés, conférant la résistance à l'érythromycine (26). La résistance de *S. agalactiae* aux tétracyclines, autres molécules utilisables en cas d'allergie aux β -lactamines, est élevée représentant 84,1% des souches en France en 2017 (25).

1.5. Perspectives vaccinales

L'incidence croissante des infections à *S. agalactiae* chez l'adulte, ainsi que l'inefficacité de l'antibioprophylaxie dans la prévention des infections néonatales tardives ont amené à développer d'autres moyens de prévention tels que la vaccination qui permettrait notamment en vaccinant les femmes en fin de grossesse de prévenir les infections néonatales par la transmission des anticorps maternels au nouveau-né.

A ce jour, aucun vaccin n'est encore disponible. Malgré l'utilisation de différentes stratégies d'identification de cibles vaccinales, les études se concentrent actuellement sur des vaccins dirigés contre la capsule de *S. agalactiae*. Cependant, les différents sérotypes capsulaires présentent peu de protection croisée, ce qui impose la mise au point de vaccins multivalents. Les sérotypes Ia, Ib, II, III et V, qui représentent 96 % des infections néonatales et 88 % des infections chez l'adulte en Europe et en Amérique du Nord, sont les sérotypes actuellement inclus dans les vaccins en cours de développement (22). Actuellement un essai clinique de phase I/II ([NCT03170609](#)) contrôlé randomisé, débuté en 2017 a montré que le vaccin à l'étude, un vaccin conjugué hexavalent dirigé contre les sérotypes capsulaires Ia, Ib, II, III, IV et V et administré en 3 doses, était sûr d'utilisation, bien toléré, et induisait une réponse immunitaire robuste au moins durable jusqu'à 6 mois chez des adultes sans facteurs de risque entre 18 et 49 ans (hors femmes enceintes) (27). Un autre essai clinique de phase I/II ([NCT01193920](#)) a été mené en 2010 chez 295 enfants nés de mères randomisées durant leur grossesse pour recevoir vers 28-35 SA soit le vaccin conjugué trivalent (Ia, Ib et III) testé soit le placebo, et a mis en évidence un transfert des anticorps maternels aux nouveau-nés jusqu'à trois mois après l'accouchement, couvrant la période la plus à risque d'infection néonatale (28). Un essai d'efficacité de phase 3 est actuellement en cours chez la femme enceinte (2).

L'émergence de souches d'un sérotype capsulaire non ciblé par le vaccin après son lancement reste cependant envisageable. Ceci souligne la difficulté d'élaborer un vaccin universel à partir d'antigènes capsulaires (22). De plus, des souches cliniques ayant effectué des échanges capsulaires ont été décrites (29). Ces souches appartenant au complexe clonal hypervirulent CC17 présentaient un remplacement du sérotype capsulaire III en IV se traduisant par des échanges de fragments géniques au niveau de l'opéron *cps*. Ces échanges capsulaires entre souches de différents sérotypes pourraient favoriser l'échappement au système immunitaire de l'hôte.

Des protéines de surface de *S. agalactiae* ont également été étudiées en tant que composants vaccinaux potentiels et testées dans des modèles animaux. Plusieurs cibles vaccinales ont été retenues (protéine sécrétée Sip et trois composants des *pili*), cependant à ce jour aucun antigène universel n'a été identifié (22,30,31).

1.6. Virulence de *S. agalactiae*

Le pouvoir pathogène du SGB dépend de nombreux facteurs impliqués dans différents mécanismes complexes tels que l'adhérence aux cellules de l'hôte, l'échappement aux défenses immunitaires, l'invasion des tissus infectés (16,32). L'expression de ces facteurs dépend de l'environnement dans lequel la bactérie évolue et de son patrimoine génétique. Le SGB réside en tant que commensal dans les voies génitales et le tractus gastro-intestinal mais peut devenir pathogène et transiter vers diverses niches de l'hôte. La bactérie est capable d'analyser son environnement et de s'y adapter, cette adaptation reposant sur la perception de signaux environnementaux qui, en modulant le métabolisme général, vont conditionner l'expression de gènes impliqués dans la colonisation et la virulence (16). Mereghetti *et al.* (33,34) et Sitkiewicz *et al.* (35) ont montré qu'il existe de nombreux niveaux de régulation qui modulent l'expression et l'activité d'enzymes qui, dans la bactérie ou sécrétées à l'extérieur, vont influencer son métabolisme général et sa capacité à interagir avec l'environnement et l'hôte. Des données de la littérature ont comparé les transcriptomes de la souche de référence NEM316 de sérotype III (dont le génome a été entièrement séquencé (5)) cultivée dans du milieu de laboratoire TH, à celui obtenu au cours de cultures réalisées dans du sang humain ou du liquide amniotique (34,35). L'analyse détaillée de ces résultats montrent que certains gènes, *gbs1061-1076* sont particulièrement induits dans ces fluides biologiques, ces gènes faisant partie d'une région chromosomique correspondant à l'îlot de pathogénicité IX décrit chez *S. agalactiae* (34,36). Il

comprend plusieurs gènes annotés comme codant des protéines hypothétiques de fonctions inconnues. Une récente analyse de ces séquences suggère qu'une partie de cette région code un système de sécrétion homologue au système de sécrétion de type VII (SST7) initialement décrit dans le *phylum* des actinobactéries et notamment chez *Mycobacterium tuberculosis* où un rôle a été montré dans la virulence (37).

2. Le système de sécrétion de type VII (SST7)

A ce jour, jusqu'à 10 types de système de sécrétion de protéines ont été décrits chez les bactéries (38,39). La plupart des systèmes permettant d'exporter directement dans les cellules hôtes ou dans l'environnement de l'hôte, des protéines nécessaires à la virulence ont été initialement décrits chez les bactéries à Gram négatif (types I à VI). Les protéines sécrétées par ces systèmes sont impliquées entre autres dans les voies de détoxification, de résistance aux antibiotiques, d'antagonisme bactérien, ou encore d'acquisition de ressources essentielles à la survie des bactéries au sein d'une niche environnementale (*scavenging*) (38,40). En plus des systèmes largement distribués Sec (*general secretory pathway*) et Tat (*twin arginine translocation*) responsables de la translocation de protéines effectrices au travers de la membrane cytoplasmique, à la fois chez les Gram positif et les Gram négatif, un système de sécrétion spécialisé de type VII est présent uniquement chez certaines bactéries à Gram positif. En effet, ce système de sécrétion a été initialement décrit chez les mycobactéries et autres bactéries Gram-positives à GC% élevé (taux de Guanine et Cytosine) appartenant au *phylum* des *Actinobacteria*.

2.1. Découverte initiale chez les mycobactéries

L'identification d'un tel système de sécrétion spécial chez les mycobactéries découle de la souche utilisée dans le vaccin BCG (Bacille de Calmette et Guérin) contre la tuberculose. Il a été montré que l'atténuation de la virulence de *Mycobacterium bovis* à l'origine du BCG était due à la délétion d'une région de 9,5 kilobase (kb) appelée RD1 pour « région de différence 1 » comportant des gènes codant les éléments d'une machinerie de sécrétion très sophistiquée et spécialisée, dite « système de sécrétion de type VII » (SST7). Plusieurs mycobactéries pathogènes possèdent jusqu'à 5 *clusters* de gènes de SST7 génétiquement distincts appelés ESX-1 à ESX-5 (*ESAT-6 Secretion Complex 1-5*). Cette machinerie, logée dans la membrane des mycobactéries, est à l'origine de l'export et de la sécrétion des protéines Esx ESAT-6

(« *Early Secreted Antigenic Target* », de 6 kb) et CFP-10 (« *Culture Filtrate Protein* », de 10 kb) vers le milieu extérieur (37).

La région RD1 absente dans la souche vaccinale BCG est en revanche conservée au sein des génomes des souches virulentes *M. tuberculosis* et *M. bovis*, et semble essentielle à la virulence de ces bactéries. En effet, lorsque *M. tuberculosis* ne possède pas de système ESX-1 fonctionnel, sa virulence est réduite, tandis que lorsque *M. bovis* BCG est complété par un *locus* ESX-1 intact, il retrouve partiellement sa virulence (41). De plus, il a été démontré qu'un système ESX-1 fonctionnel semblait crucial chez *M. tuberculosis* ou encore *M. marinum* pour échapper à la phagocytose par les macrophages (42). De même, il a été mis en évidence que le SST7 de *M. tuberculosis* facilitait l'acquisition de fer et de zinc *via* ESX-3, et l'absorption sélective d'autres nutriments essentiels à la bactérie comme les acides gras *via* ESX-5. Le système ESX-1 est également impliqué dans la signalisation dépendante de la communication intercellulaire au cours de la conjugaison d'ADN médiée par ESX-4 chez *Mycobacterium smegmatis* (**Figure 5**) (43).

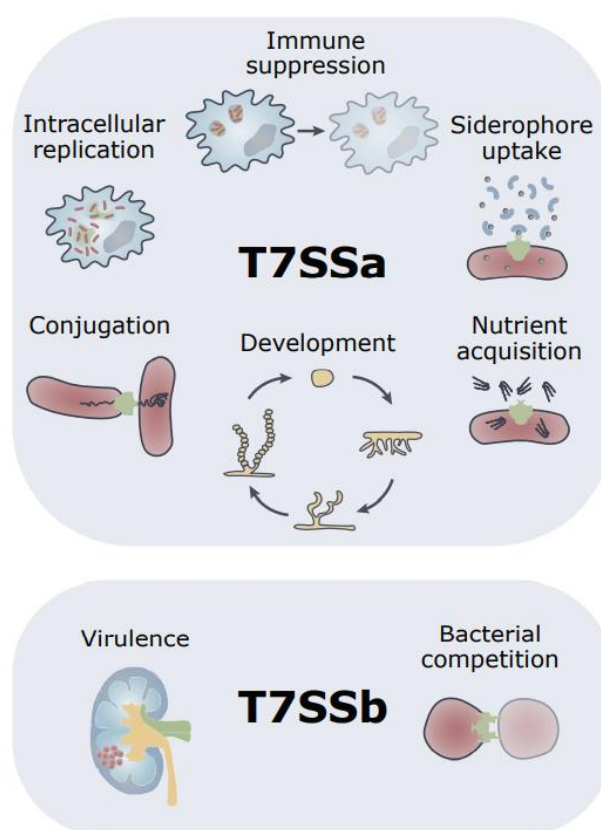


Figure 5 – Fonctions biologiques des systèmes de sécrétion de type VIIa (T7SSa) et VIIb (T7SSb) ; Tran *et al.*, 2021

2.2. Un système homologue (SST7b) décrit chez les Firmicutes et en particulier chez *Staphylococcus aureus*

Plusieurs analyses génomiques montrent la présence d'un système équivalent dans le *phylum* des Firmicutes et notamment chez plusieurs bactéries pathogènes à Gram positif comme *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus suis* ou encore *Bacillus subtilis*. Cependant, plusieurs gènes appartenant au système de sécrétion de type VII des mycobactéries sont manquants chez les Firmicutes et un nombre variable de gènes supplémentaires sont retrouvés dont plusieurs semblent communs au *phylum* (**Figure 6**). L'ensemble de ces données suggère fortement que le système de sécrétion de type VII des Firmicutes appartient à une sous-famille spécifique, désignée dans la littérature comme système de sécrétion VIIb (SST7b) par opposition à celui des mycobactéries alors désigné SST7a (37).

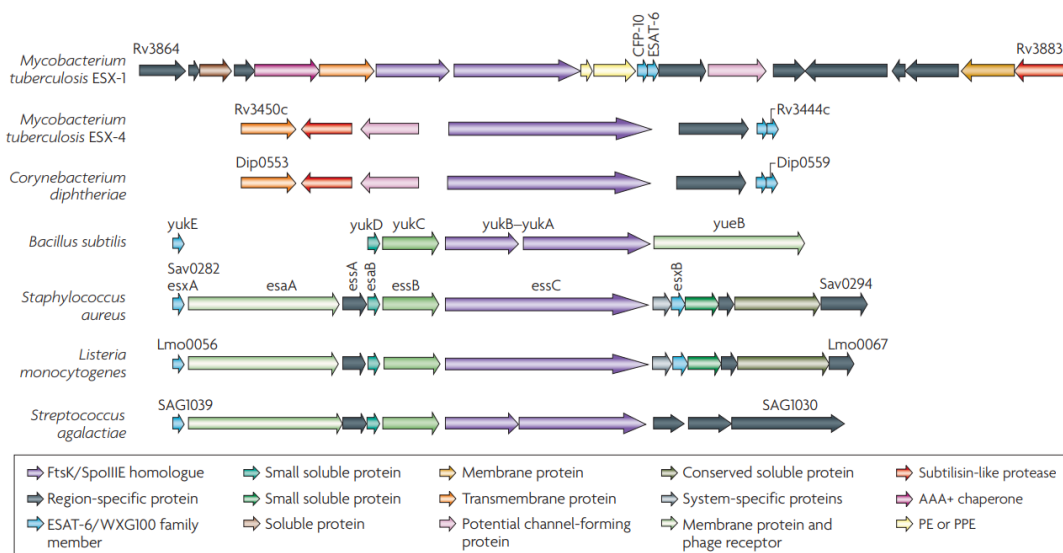


Figure 6 – Comparaison des différents clusters de gènes codant les systèmes de sécrétion VIIa (*M. tuberculosis*) et VIIb (Firmicutes) ; Abdallah *et al.*, 2007

Chez les Firmicutes, les effecteurs dont la sécrétion dépend du SST7b appartiennent à la superfamille des protéines WXG100. Ces protéines d'une centaine d'acides aminés (AA), comportent au milieu de leur séquence protéique, un motif conservé « Trp-Xaa-Gly » (WXG) formant le « coude » au niveau de la structure hélice-coude-hélice adoptée par cette famille de protéines. D'autre part, le système comprend des protéines de la machinerie de sécrétion dont une protéine de la famille des ATPases FtsK/SpoIIIE, responsables de la translocation ATP-dépendante des effecteurs dans le milieu extérieur (44,45). La majorité des protéines WXG100

décrites expérimentalement sont des protéines à motif unique qui forment des dimères obligatoires antiparallèles avec eux-mêmes (homodimères) ou avec un autre membre de la famille WXG100 (hétérodimères) (43). Il a été montré de même que des protéines appartenant à la famille des toxines LXG, possédant un motif Leu-Xaa-Gly (LXG) en N-terminal et possédant une structure hélicoïdale, étaient aussi sécrétées par le SST7b (43).

Au sein du *phylum* des Firmicutes, ce système a été particulièrement décrit chez *Staphylococcus aureus*. Le système de sécrétion de *S. aureus* est nommé système Ess dans la littérature (*ESAT-6 secretion system*) et celui-ci est codé par le *locus ess* qui comprend un *cluster* d'une dizaine de gènes (*esxA*, *esaA*, *essA*, *esaB*, *essB*, *essC*, *esxC* (anciennement *esaC*), *esxB*, *esaE*, *esxD*, *esaD* et *esaG*) (**Figure 7**) (46). D'après plusieurs études menées sur différentes souches de *S. aureus* (RN6390, Newman, COL et USA300), le SST7b comprend 4 protéines transmembranaires (*EsaA*, *EssA*, *EssB* et *EssC*), 2 protéines cytosoliques (*EsaB* et *EsaG*), 5 effecteurs sécrétés (*EsxA*, *EsxB*, *EsxC*, *EsxD* et *EsaD*) et la protéine *EsaE* qui est co-sécrétée avec la protéine *EsaD* (**Figure 8**) (47,48).

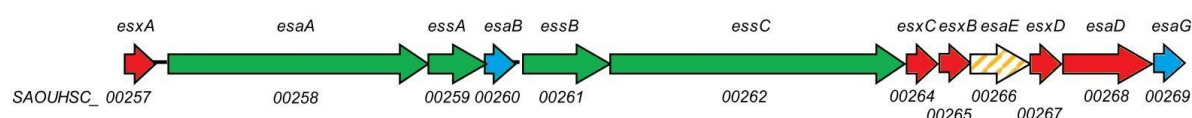


Figure 7 – Représentation schématique du *locus ess* de *Staphylococcus aureus*. Les séquences des différents gènes du *locus* sont issues de la souche NCTC8325. Les gènes codant les protéines membranaires de la machinerie de sécrétion sont représentés en vert, les effecteurs sécrétés en rouge, *EsaE* (qui est cosécrété avec *EsaD*) en hachuré jaune, et les protéines cytoplasmiques en bleu ; Figure modifiée et adaptée de Ulhuq *et al.*, 2020

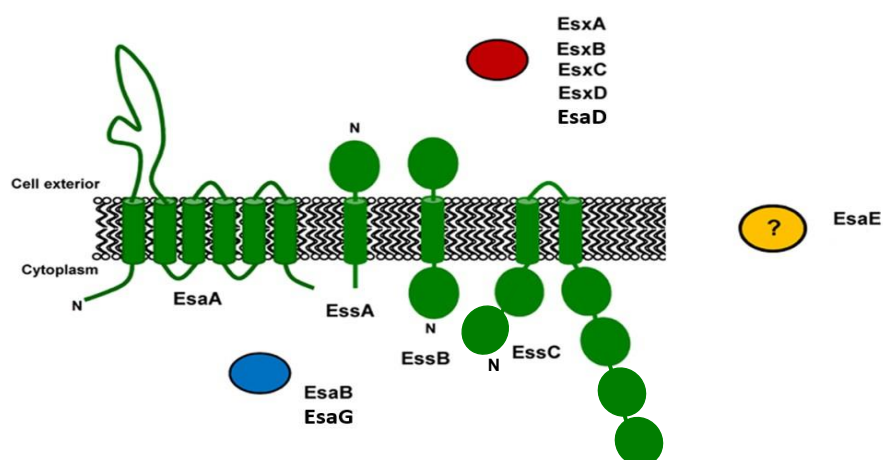


Figure 8 – Localisation subcellulaire et topologie prédite des différentes protéines constituant le SST7b de *Staphylococcus aureus* ; Figure modifiée et adaptée de Kneuper *et al.*, 2014

Les protéines EsaA, EssA et EssB appartenant à la machinerie de sécrétion, sont essentielles à la sécrétion des protéines effectrices Esx vers le milieu extérieur en parallèle de la protéine centrale EssC qui possède une structure de canal par lequel transloquent les effecteurs (**Figures 9**) (47,48). Chez *S. aureus*, deux protéines appartenant à la superfamille WXG100, EsxA et EsxB sont sécrétées *via* le SST7b et forment des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres effecteurs EsxC et EsxD ne possédant pas de motif WXG (49). Ces motifs particuliers (WXG, LXG) semblent jouer un rôle dans l'interaction protéine-protéine et l'adressage des effecteurs au niveau de la machinerie de sécrétion. En effet, les protéines EsxA et EsxB ne possèdent pas de peptide signal d'adressage à la membrane en N-terminal et ne sont pas clivées (50). D'après Warne *et al.*, les protéines WXG100 interagiraient avec le domaine DIII situé à l'extrémité C-terminale de la protéine membranaire EssC (**Figure 9**) pour activer leur sécrétion (51), comme il a été montré chez les mycobactéries où la protéine homologue EccC interagit *via* son domaine ATPasique C-terminal avec la protéine EsxB induisant la multimérisation de EccC (52).

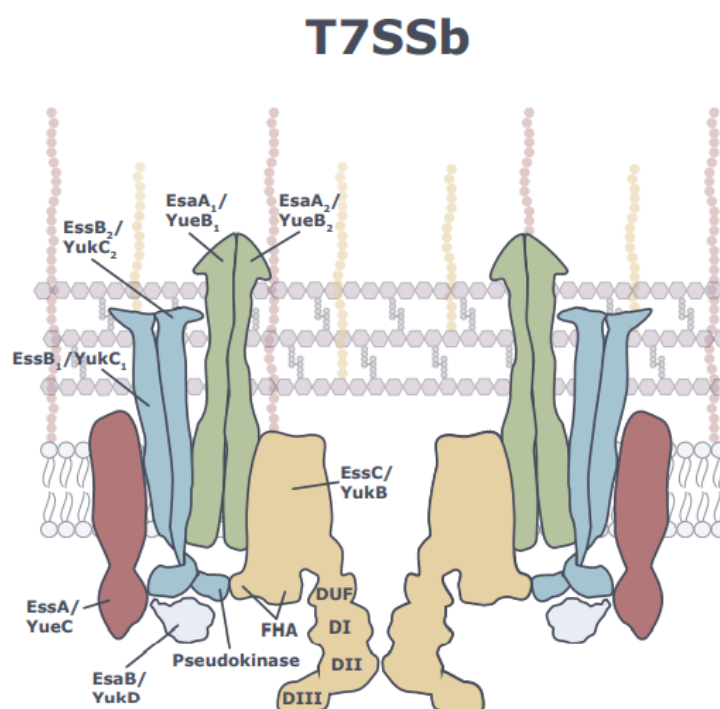


Figure 9 – Architecture de la machinerie de sécrétion du SST7b. Celle-ci est composée de cinq protéines membranaires et cytosoliques : EssA, EssB, EsaB, EssC et EsaA (*Staphylococcus aureus*) ; YueC, YukC, YukD, YukB et YueB (*Bacillus subtilis*). La protéine centrale EssC possède deux domaines N-terminaux (FHA : *forkhead-associated domains*) et trois domaines ATPasiques en C-terminal (DI, DII, DIII) ainsi qu'un domaine de fonction inconnue (DUF : *domain of unknown function*) ; Tran *et al.*, 2021

Plusieurs études plus récentes (51,53) ont montré une diversité génétique au sein du *locus ess* de plusieurs souches de référence de *S. aureus* (NCTC8325, ST398, MRSA252) avec à l'extrémité 5' un *cluster* de 5 gènes (*esxA* à *essB*) conservé entre les souches puis une région variable au niveau du gène *essC* avec 4 variants *essC1* à *essC4*, chacun étant associé à un *cluster* génique distinct de 4 à 6 gènes en aval codant des protéines prédites sécrétées et transmembranaires. Cette organisation génétique a été décrite également pour le SST7b de *Listeria monocytogenes* avec la présence de 7 variants *EssC1* à *EssC7* (54).

2.3. Rôles connus du SST7b au sein des Firmicutes

Chez *S. aureus*, le SST7b est impliqué dans l'interaction avec l'hôte et dans la virulence de la bactérie. En effet, Cruciani *et al.* (55) ont montré que la production de cytokines et le processus apoptotique étaient modulés par les protéines effectrices *EsxA* et *EsxB* indiquant ainsi un rôle possible de ces protéines dans la modulation de l'immunité, médiée par les cellules dendritiques, vis-à-vis de *S. aureus*. De plus, le système serait impliqué dans les processus de colonisation et de dissémination. Burts *et al.*, ont montré qu'une délétion des gènes *esxA*, *esxB* ou *essC* au niveau du *locus* codant le SST7b chez *S. aureus* affectait la capacité des mutants à développer des abcès rénaux et hépatiques dans un modèle murin et à persister dans l'organisme hôte (50,56).

Au sein du *phylum* des Firmicutes, ce système pourrait également être impliqué dans le phénomène de compétition entre bactéries. En effet, la plupart des bactéries évoluent dans des environnements largement colonisés où cohabitent de nombreuses bactéries au sein d'une flore microbienne, et dans lesquels elles doivent entrer en compétition avec les autres bactéries pour avoir suffisamment d'espace et de nutriments. Ce processus d'antagonisme bactérien serait médié par la sécrétion par le SST7b de protéines de la famille des toxines LXG (43,57). Whitney *et al.* (57) ont montré que des protéines de la famille des toxines LXG présentes chez *Streptococcus intermedius* étaient impliquées dans la communication cellulaire et l'inhibition de croissance de divers Firmicutes dépendante de la voie de sécrétion *Esx*. Chez *S. aureus*, Cao *et al.* (48) ont identifié une toxine à activité nucléasique, *EsaD*, sécrétée par le SST7b et inhibant la croissance des bactéries en compétition dans le milieu. De plus, il a été démontré que les souches de *S. aureus* produisaient une anti-toxine, *EsaG*, neutralisant la protéine *EsaD* afin de se protéger de leurs propres toxines. Il a été observé que des variants de *S. aureus* dépourvus du gène *esaD* codaient au moins deux copies de protéines de type *EsaG* (« *EsaG-like* ») très

probablement pour se protéger de l'activité toxinique de la protéine EsaD sécrétée par les souches *esaD*⁺.

De même, Ulhuq *et al.* (46) ont identifié chez *S. aureus* une protéine de la famille des toxines LXG, TspA, sécrétée par le SST7b et possédant une activité dépolarisante de membrane sur les bactéries en compétition. De récentes études indiquent que le SST7b de *Listeria monocytogenes* et de *Enterococcus faecalis* ont également une activité antibactérienne (54,58), suggérant que l'antagonisme bactérien est une caractéristique propre au SST7b des Firmicutes. Enfin, chez *Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus*, Taylor *et al.* (59) ont mis en évidence l'implication du SST7b dans la colonisation intestinale et le développement de tumeurs coliques.

Chez *S. agalactiae*, peu de données existent sur le système de sécrétion de type VIIb. L'objet de cette étude est de caractériser l'expression du système et de ses différents effecteurs chez *S. agalactiae* et à terme d'étudier le rôle de ce système dans la physiopathologie de la bactérie.

PARTIE II

MATERIEL ET METHODES

1. Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches et les plasmides utilisés dans cette étude sont listés en annexe 1. Les souches de *S. agalactiae* ont été cultivées sur gélose trypticase soja additionnées de 5% de sang de mouton (Biomérieux) incubées à 37°C. Des cultures liquides ont également été réalisées en bouillon TH (Todd Hewitt *broth*, BD Difco) à 37°C. De l'érythromycine à concentration finale 10 µg/mL a été ajouté pour la sélection des plasmides pTCV-*lac* et pG⁺host1^{ts}. La souche d'*Escherichia coli* a été cultivée sur gélose LB (Luria-Bertani *medium*, MP Biomedicals) ou en bouillon liquide LB à 37°C sous agitation (200 rpm), additionné d'érythromycine à concentration finale 150 µg/mL pour la sélection des plasmides pTCV-*lac* et pG⁺host1^{ts}.

2. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits à partir d'une culture en phase exponentielle (DO_{600 nm} de 0,5) en bouillon TH à 37°C. Les bactéries ont été lysées mécaniquement avec des billes de verre sur l'appareil FastPrep-24 5G (MP Biomedical) et les ARN totaux ont été extraits par la méthode de purification au phénol/TRIzol, comme décrit par Lamy *et al.* (60). La concentration en ARN et la pureté des extraits a été déterminée à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop Lite (Thermo Scientific) et du ratio des absorbances A₂₆₀/A₂₈₀. Un traitement des ARN extraits à la DNase (Turbo DNA-free DNase, Invitrogen) a ensuite été réalisé. Une PCR de contrôle a été effectuée pour vérifier l'absence de contamination des ARN extraits par de l'ADNg.

3. Purification d'ADN chromosomique et plasmidique

L'ADN chromosomique de *S. agalactiae* à partir d'une culture en bouillon TH à 37°C sur la nuit a été purifié par la méthode d'extraction au phénol/chloroforme (61). L'extraction des plasmides à partir du clonage dans la souche *E. coli* a été réalisée à l'aide du kit *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel) selon les instructions du fabricant. La concentration en ADN a été mesurée à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop Lite (Thermo Scientific). Le ratio des absorbances à 260 nm et 280 nm a été utilisé pour évaluer la pureté des extraits d'ADN.

4. PCR et RT-PCR

Les oligonucléotides utilisés dans cette étude sont listés en annexe 2. Les PCR analytiques ont été réalisées avec l'enzyme DreamTaq DNA polymérase (Thermo Scientific) ou OneTaq DNA polymérase (New England BioLabs) et les PCR pour le clonage ont été réalisées avec le

kit Platinum SuperFi PCR Master Mix (Invitrogen). La purification sur gel d'électrophorèse des produits PCR après amplification a été réalisée avec le kit *NucleoSpin Gel and PCR Cleanup* (Macherey-Nagel) selon les instructions du fabricant. Pour les RT-PCR, la transcription inverse a été réalisée avec 2 µg d'ARN avec le kit iScript cDNA synthesis (Biorad).

5. 5'-RACE PCR

La souche de *S. agalactiae* A909 a été cultivée en bouillon TH à 37°C sans agitation jusqu'à DO_{600 nm} 0,5 (phase exponentielle). Les ARN totaux ont été extraits comme décrit précédemment, et l'extrémité 5' des séquences ARN a été déterminée en utilisant le kit 5'/3' *rapid amplification of cDNA ends* (RACE) PCR (2^{ème} génération ; Roche Applied Science). Pour la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) à l'extrémité 5', les amorces antisens spécifiques (SP1) EM52, EM124, EM8 et EM65 ont été utilisées pour identifier les sites d'initiation de la transcription des promoteurs en amont de *SAK_1131*, *SAK_1129* (*esxA1*), *SAK_1128* (*esxA2*) et *SAK_1122* (*esxC*) respectivement, suivies d'une polyadénylation de l'ADNc par une transférase terminale et d'une ou de deux PCR subséquentes avec une amorce oligo-dT et une amorce antisens spécifique interne (SP2/SP3). Les amorces antisens utilisées pour l'étape de PCR et de séquençage sont EM50, EM125/EM126, EM44/EM6, et EM62 pour les promoteurs en amont de *SAK_1131*, *esxA1*, *esxA2* et *esxC* respectivement.

6. Electroporation

Des souches de *S. agalactiae* et de *E. coli* compétentes ont été préparées comme précédemment décrit par Ricci *et al.* (1994) et Dower *et al.* (1988) (62,63). Celles-ci ont ensuite été transformées par électroporation en utilisant l'électroporateur de cellules Micropulser (Bio-Rad) avec le programme Ec2 (2,5 kV) et 500 ng de plasmide. Les transformants ont été sélectionnés sur gélose LB (*E. coli*) ou sur gélose trypticase soja additionnée de 5% de sang de mouton (Biomérieux) (*S. agalactiae*), avec les concentrations d'érythromycine 150 µg/mL (*E.coli*) ou 10 µg/mL (*S. agalactiae*), après 1 à 2 heures d'incubation à 37°C en bouillon LB sous agitation à 200 rpm (*E. coli*) ou en bouillon TH (*S. agalactiae*) (expression phénotypique).

7. Construction des fusions transcriptionnelles *lacZ*

Le plasmide pTCV-*lac* qui contient la séquence codant le gène *lacZ* dépourvu de promoteur (64) a été utilisé pour construire les fusions transcriptionnelles. Les différentes

régions intergéniques au sein du *locus* codant le SST7b de la souche A909 ont été amplifiées par *polymerase chain reaction* (PCR) en utilisant les amorces listées en annexe 2. Les fragments amplifiés ont été clonés dans le plasmide pTCV-*lac* en utilisant les sites de restriction EcoRI/BamHI. Les enzymes de restriction BamHI Fast Digest et EcoRI Fast Digest (Thermo Scientific) ont été utilisées pour la digestion des produits PCR et du plasmide. La ligation a été réalisée avec la T4 DNA ligase (New England BioLabs) à 16°C sur la nuit. Le produit de ligation a été introduit par électroporation dans la souche *E. coli* XL1 blue pour amplification, et purification (kit *NucleoSpin Plasmid* ; Macherey-Nagel) avant électroporation dans les différentes souches A909 ou NEM316 de *S. agalactiae*.

8. Construction des fusions traductionnelles Flag au *locus*

S. agalactiae A909*esxA2-flag*, A909*esxC-flag*, A909*esaA-flag* et A909*essC-flag* sont des mutants de la souche A909 avec insertion au *locus* chromosomique d'une étiquette 3xflag en 3' (protéines EsxA2, EsxC, EsaA et EssC marquées en C-terminal) obtenus par double recombinaison entre l'ADN chromosomique de la souche A909 et l'ADN plasmidique du vecteur de clonage thermosensible pG⁺host1^{ts} (65). Pour l'obtention du mutant A909*esxA2-flag*, les régions en amont de l'étiquette à insérer (*esxA2*) et en aval (*esaA*), appelées *BoxA* et *BoxB* (boîtes de recombinaison), ont été amplifiées par PCR haute-fidélité avec les couples d'amorces EM102/EM74(**flag1**) et EM75(**flag3**)/EM103 respectivement (voir annexe 2). Une seconde PCR à partir des produits PCR purifiés a été réalisée avec les couples d'amorces EM102/EM81(**flag1-2**) et EM82(**flag2-3**)/EM103 respectivement. Une PCR d'extension par chevauchement (*overlap PCR*) a été effectuée à partir des *BoxA* et *BoxB* purifiées obtenues suivie d'une amplification du produit PCR obtenu avec les amorces EM102/EM103, et du clonage de celui-ci dans le plasmide pG⁺host1^{ts} en utilisant les enzymes de restriction EcoRI/BamHI.

La même stratégie de clonage a été appliquée afin d'obtenir les mutants A909*esxC-flag*, A909*esaA-flag* et A909*essC-flag*. Les régions équivalentes aux *BoxA* et *BoxB* ont été amplifiées avec les couples d'amorces EM109/EM110 puis EM109/EM81 et EM111/EM112 puis EM82/EM112 respectivement pour A909*esxC-flag*. Les régions équivalentes aux *BoxA* et *BoxB* ont été amplifiées avec les couples d'amorces EM97/EM129 puis EM97/EM81 et EM130/EM72 puis EM82/EM72 pour A909*esaA-flag*. Les régions équivalentes aux *BoxA* et *BoxB* ont été amplifiées avec les couples d'amorces EM115/EM113 puis EM115/EM81 et

EM114/EM92 puis EM82/EM92 respectivement pour A909*essC-flag*. Les fragments PCR obtenus après amplification de la fusion des *BoxA* et *BoxB* (*Overlap*) en utilisant les amorces EM109/EM112 (*esxC-flag*), EM97/EM72 (*esaA-flag*) et EM115/EM92 (*essC-flag*) ont été clonés de la même manière dans le plasmide pG⁺host1^{ts}.

Les différents plasmides ont été électroporés dans la souche *E. coli* XL1 blue puis purifiés et électroporés dans la souche A909. Les événements de recombinaison homologue ont été réalisés comme décrit précédemment par Biswas *et al.* (65).

L'insertion de l'étiquette 3xflag a été confirmée par PCR à partir de colonies bactériennes en utilisant les couples d'amorces EM73/EM81 et EM82/EM76 (*esxA2-flag*), EM63/EM81 et EM82/EM66 (*esxC-flag*), EM82/EM20 (*esaA-flag*) et EM82/EM112 (*essC-flag*), et par séquençage à partir des ADN génomiques (ADNg) extraits pour chaque mutant.

9. Séquençage d'ADN

Une PCR de séquençage a été effectuée avec le kit de séquençage BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) à partir du plasmide pTCV-*lac* purifié et des amorces Vlac1 ou Vlac2 pour les fusions transcriptionnelles ainsi qu'à partir du plasmide pG⁺host1^{ts} purifié et des amorces OPL110 ou OPL111 pour les mutants avec insertion d'une étiquette 3xflag.

De même, les mutants A909*esxA2-flag*, A909*esxC-flag*, A909*esaA-flag* et A909*essC-flag* ont été séquencés à partir de produits PCR haute-fidélité purifiés amplifiés de l'ADNg extrait de chaque souche. Chaque produit de PCR de séquençage a été purifié à l'aide du kit NucleoSEQ (Macherey-Nagel) et analysé sur le séquenceur d'ADN 16 capillaires 3130xl (Applied Biosystems).

10. Dosage de l'activité β -galactosidase

Les fusions transcriptionnelles pTCV-*lac* construites ont été cultivées sur gélose TH additionnée d'érythromycine (10 μ g/mL) et de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) à concentration 100 μ g/mL (X-Gal 5g, Euromedex) ou mises en culture en bouillon TH à 37°C jusqu'à obtenir une DO_{600 nm} de 0,5 (phase exponentielle). Les cultures (10 mL par échantillon) ont alors été centrifugées et les culots ont été repris dans 500 μ L de tampon réactionnel (Na₂HPO₄ 60 mmol/L (mM), NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM). Les bactéries ont été lysées mécaniquement avec des billes de verre sur l'appareil FastPrep-24 5G

(MP Biomedical). Le dosage de l'activité de la β -galactosidase a été réalisé par ajout du substrat ONPG à 4 mg/mL (O-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside, Sigma-Aldrich) aux extraits protéiques en tampon réactionnel/ DTT (Dithiothréitol) (concentration finale à 5 mM). Après incubation à 37°C, la réaction a été arrêtée par ajout de Na₂CO₃ (1M) lors du virage de couleur du milieu réactionnel, en comparaison avec un témoin (tampon réactionnel/DTT), et la DO_{420nm} a été mesurée. Les activités β -galactosidase ont été rapportées à la quantité de protéines extraites pour chaque échantillon. Le dosage des protéines a été effectué par la méthode de Bradford en mesurant la DO_{595nm} d'extraits protéiques incubés avec le réactif de Bradford (*Protein Assay*, Biorad). La concentration protéique des extraits (C_{prot}) en mg/mL a été calculée avec la formule suivante : $(DO_{595nm} \times 0,0543) \times (V_{total}/V_{extrait})$. L'activité spécifique de la β -galactosidase a été calculée à partir d'une adaptation du protocole de Miller *et al.* (66) où l'activité est définie par la formule suivante : $(1,5 \times 1000 \times DO_{420nm}) / (V \times T \times C_{prot})$ où V et T sont le volume extrait et le temps de réaction respectivement.

11. Western blot et préparation des échantillons

Les différentes souches de *S. agalactiae* construites ont été mises en culture en bouillon TH à 37°C jusqu'à obtenir une DO_{600 nm} de 0,5 (phase exponentielle) ou après une nuit de d'incubation (phase stationnaire tardive), et 15 mL de culture par échantillon ont été centrifugées. Les surnageants ont été filtrés à travers un filtre de 0,2 μ m et 12 mL ont été concentrés sur colonne Vivaspin 20 Centrifugal Concentrator (Sartorius) jusqu'à atteindre un volume final de 1 mL (facteur de concentration 12 fois). Pour la fraction cellulaire, les culots lavés en tampon puis repris dans 500 μ L de tampon réactionnel Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM et d'inhibiteur de protéase à concentration finale 25X (cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche) ont été traités par lyse mécanique avec des billes de verre sur l'appareil FastPrep-24 5G (MP Biomedical). Tous les échantillons (surnageants et fractions cellulaires) ont été mélangés volume à volume avec un tampon de charge de Laemmli 5X (67) et chauffés à 95°C pendant 5 min. Les protéines ont été séparées en SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) et transférées sur une membrane de nitrocellulose pour analyse en *immunoblot* ; 50 μ g de protéines totales ont été déposées par puit pour les fractions cellulaires, et 5 μ g pour les surnageants de culture concentrés mécaniquement (facteur de concentration 12 fois). L'anticorps primaire monoclonal murin anti-Flag (*Monoclonal ANTI-FLAG M2 antibody*, F1804, Sigma) a été incubé sur une nuit à 4°C (dilution 1/1000). L'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (*Anti-mouse IgG-*

peroxidase antibody produced in rabbit, A9044, Sigma) a été incubé durant 30 minutes à 4°C (dilution 1/5000). Les étapes de saturation et de lavages ont été réalisées à partir d'un mélange TBST 0,05% (*Tris-Buffered Saline with Tween 20*) - lait 3%. Le signal a été révélé par chimiluminescence en utilisant le coffret SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate ((Thermo Scientific) et l'imageur PXi Multi-Application Gel Imaging System (Syngene).

PARTIE III

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1. La comparaison des *loci* codant le SST7b au sein des souches de référence de *S. agalactiae* révèle une importante variabilité génétique

Les travaux précédents réalisés chez d'autres Firmicutes tels que *Staphylococcus aureus* ou encore *Listeria monocytogenes* ont mis en évidence une organisation génétique du *locus* codant le SST7b variable au sein de plusieurs souches de référence (47,54). Celle-ci se caractérise par une conservation des gènes codant la machinerie de sécrétion et une variabilité importante dans les régions situées en amont et en aval notamment au niveau des gènes codant les protéines effectrices du système.

Dans cette étude, les séquences des *loci* codant le SST7b chez différentes souches de référence de *Streptococcus agalactiae* (A909 de sérotype Ia, ST7 (68) ; NEM316 de sérotype III, ST23 (5) ; COH1 de sérotype III, ST17 (69)) ont été comparées à l'aide du logiciel Clustal OMEGA (EBI, European Bioinformatics Institute) (70) par homologie de séquences avec celles décrites chez *S. aureus*. Cette analyse a permis de révéler une conservation globale du système au sein des souches de *S. agalactiae* étudiées, en particulier des gènes codant la machinerie de sécrétion ou « translocon » (gènes *esaA*, *essA*, *esaB*, *essB*, *essC*) avec un pourcentage d'identité de 95 à 97% par comparaison des souches deux à deux (**Figure 10**). Une particularité est à noter chez la souche NEM316 qui présente une délétion de deux nucléotides dans la séquence codant la protéine EssC induisant un décalage de phase de lecture provoquant l'insertion d'un codon STOP en position 168 et la présence de deux cadres de lecture ouverts codant 2 protéines potentielles. La première serait codée par le gène *gbs1069* et donnerait un produit de 167 AA (19,3 kilodalton (kDa)) correspondant à la partie N-terminale (résidus 1 à 167) de l'homologue EssC retrouvé dans A909. La seconde serait codée par le gène *gbs1068* et donnerait un produit de grande taille (1291 AA, 147 kDa) correspondant aux résidus 179 à 1469.

Comme chez d'autres bactéries à Gram positif, une forte variabilité génétique est observée entre les souches pour les gènes situés de part et d'autre de ceux codant le translocon, codant notamment des protéines homologues à des effecteurs sécrétés Esx d'autres bactéries. En effet, la souche A909 présente une duplication du gène *esxA* avec une identité de 86% entre les deux versions nommées *esxA1* et *esxA2*. La souche NEM316 possède une seule version du gène *esxA* dite chimérique puisqu'elle correspond à une fusion de la région 5' du gène *esxA1* à

celle de la région 3' du gène *esxA2*. Chez la souche hypervirulente de ST17, COH1, les gènes codant les effecteurs *EsxA* sont absents. En effet, en considérant la souche A909 comme référence, on note une importante délétion de 1818 paires de bases au niveau de la région en amont du translocon modifiant le profil des régions codantes et/ou potentiellement régulatrices de l'expression de plusieurs protéines. En effet, d'une part, on observe une perte de la région 3' du gène *GBSCOH1_950*, codant une protéine de 156 AA (17,3 kDa). Cette protéine correspondrait à une version tronquée en son extrémité C-terminale d'une protéine homologue hypothétique conservée chez *S. agalactiae*. Chez A909, la version entière correspond à une protéine de 260 AA, présentant un domaine WxcM. D'autre part, cette délétion provoque la perte de la région 5' du gène codant l'homologue *EsaA* de A909 (1005 AA, 112,6 kDa) résultant en une version tronquée des résidus 1 à 180 dans sa partie N-terminale suggérant une perte d'expression probable de la protéine *EsaA*.

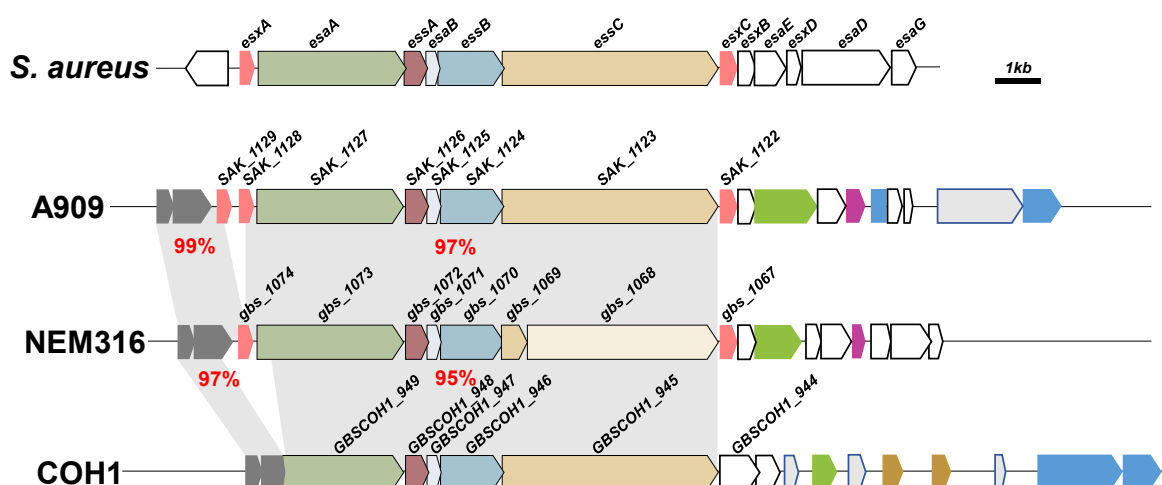


Figure 10 – Comparaison des loci codant le SST7b au sein de différentes souches de référence de *S. agalactiae*. Les séquences nucléotidiques des loci des souches A909 (sérototype Ia, ST7), NEM316 (sérototype III, ST23) et COH1 (sérototype III, ST17) ont été alignées à l'aide du logiciel Clustal OMEGA v.1.2.4 (EBI, European Bioinformatics Institute) disponible sur : <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (70) sur la base d'homologie de séquences avec celles décrites chez *S. aureus*. Les valeurs indiquées en rouge sont le pourcentage d'identité global des régions conservées (en gris sur le schéma) lors de la comparaison des séquences nucléotidiques des souches deux à deux.

Concernant la région située en aval des gènes codant la machinerie de sécrétion, hormis le gène *esxC* codant une protéine homologue à un des effecteurs sécrétés chez *S. aureus*, présent chez les souches A909 et NEM316 et absent chez COH1, aucune homologie de séquences avec *S. aureus* n'a été identifiée. De plus, des régions très variables entre les souches de *S. agalactiae* codant des protéines non caractérisées ont été mises en évidence codant uniquement des protéines hypothétiques de fonction inconnue.

2. L'expression des gènes codant le SST7b est hétérogène au sein des souches de référence de *S. agalactiae*

Nous avons évalué dans un premier temps la capacité de la souche de référence A909 de *S. agalactiae* à exprimer les gènes codant le translocon et les effecteurs sécrétés. Cette souche a été choisie du fait d'une organisation génétique au niveau de la machinerie de sécrétion SST7b la plus proche de celle de *Staphylococcus aureus*. L'analyse par RT-PCR réalisée à partir des ARN totaux extraits de la souche A909 ciblant les gènes du locus (gènes *esxA2*, *esaA*, *essA*, *essB*, *essC*, *esxC*) a mis en évidence une expression de l'ensemble des gènes du système chez A909 en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance bactérienne dans les conditions classiques de laboratoire (**Figure 11A et 11B**). Dans un deuxième temps, l'expression des gènes codant la machinerie de sécrétion (*esaA*, *essA*, *esaB*, *essB*, *essC*) a également été analysée en phase exponentielle de croissance de croissance au sein des souches de laboratoire NEM316 et COH1. Dans la souche NEM316, le seul signal détecté correspond à un transcrit portant le gène *essC*. Dans la souche COH1, un signal a été obtenu pour chaque gène (**Figure 11C**). Pour la suite de l'étude de caractérisation de l'expression, nous avons choisi prioritairement la souche A909 dont l'organisation génétique est la plus proche de celle de *S. aureus*.

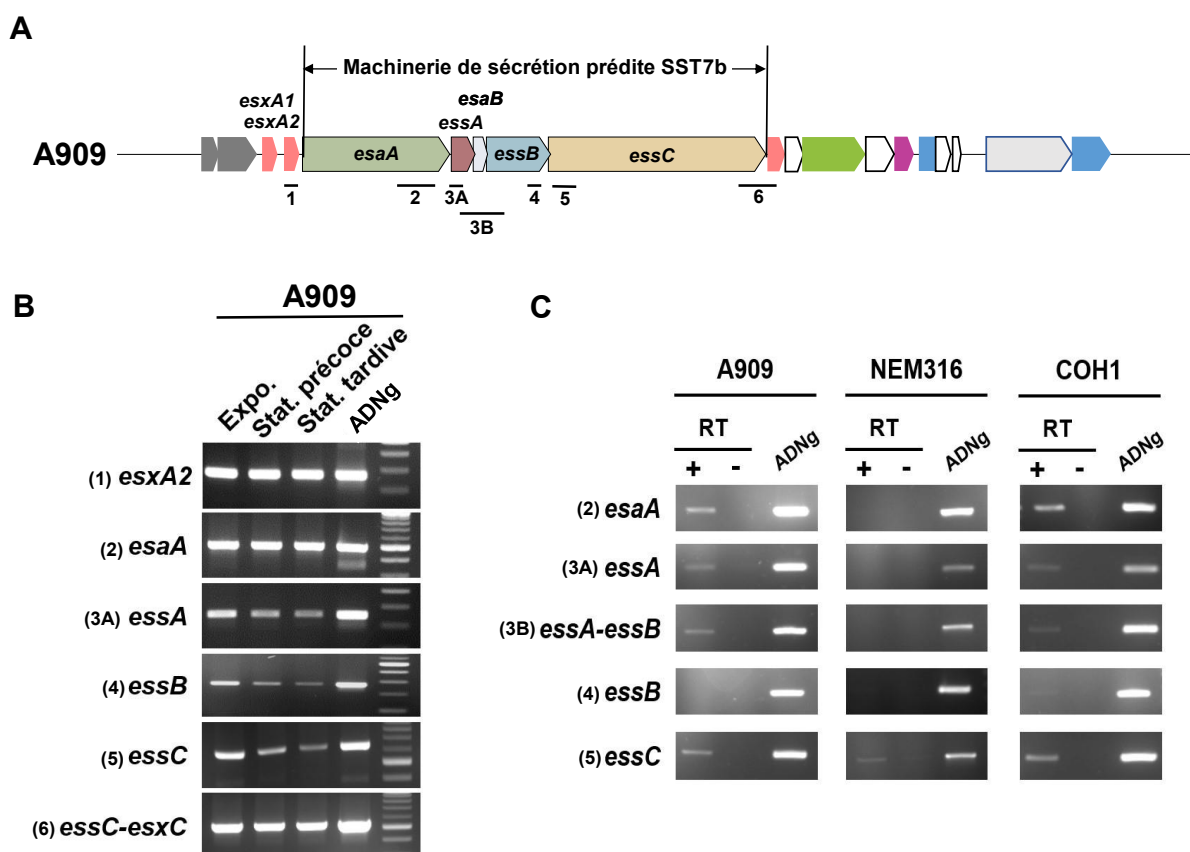


Figure 11 – Les gènes du locus codant le SST7b chez *S. agalactiae* sont exprimés chez les souches A909 et COH1 en conditions de laboratoire. (A) Régions géniques amplifiées par RT-PCR au niveau du locus codant le SST7b de la souche de *S. agalactiae* A909 (régions 2-3A-3B-4-5 homologues pour les loci de NEM316 et COH1). Les couples d'amorces utilisés sont (1) EM78-EM6 ; (2) EM57-EM14 ; (3A) EM70-EM56 ; (3B) EM55-EM20 ; (4) EM60-EM22 ; (5) EM25-EM28 ; (6) EM63-EM62. (B) Expression du SST7b de la souche A909 à différentes phases de croissance bactérienne. (C) Expression du SST7b des souches A909, NEM316 et COH1 en phase exponentielle de croissance. Les ARN totaux ont été extraits à partir d'une culture bactérienne en phase exponentielle (DO_{600nm} à 0,5), en phase stationnaire précoce (DO_{600nm} à 1,0) ou en phase stationnaire tardive (après une nuit d'incubation). Ces extraits ont été utilisés pour synthétiser les ADNc par transcription inverse. L'ADN génomique (ADNg) des différentes souches a été utilisé comme matrice comme contrôle pour chaque couple d'amorces. Aucun signal n'est révélé en absence de transcriptase inverse (RT-) (Figure B, résultats non montrés).

3. L'expression du SST7b est sous la dépendance d'un promoteur fort situé en amont du gène *esxA2* chez la souche A909

Chez *S. aureus*, Kneuper *et al.* (47) ont montré que les gènes du translocon étaient transcrits en opéron avec une variabilité au sein des souches quant à la co-transcription de l'effecteur *esxA* en amont du translocon. En effet, cette étude a mis en évidence la présence d'un promoteur au niveau de la région intergénique *esxA-esaA* et une transcription en opéron

des gènes *esaA* à *esaG* dans deux souches de laboratoire de *S. aureus* (RN6390 et Newman). Chez d'autres souches de *S. aureus* (USA300, SA113 et COL), les gènes du *locus ess* sont co-transcrits du gène *esxA* au gène *esaG*.

Nous avons recherché si une organisation comparable pouvait être retrouvée chez *S. agalactiae*. Une analyse par RT-PCR a été réalisée à partir des ARN totaux extraits de la souche de *S. agalactiae* A909 en amplifiant des régions chevauchantes sur des gènes adjacents sur le *locus* afin de montrer si les gènes étaient co-transcrits deux à deux et de cibler la ou les régions promotrices potentielles. Les régions en amont du gène *esxA1* (*SAK_1131-SAK_1130* et *SAK_1130-esxA1*) ont été amplifiées avec des fragments de taille attendue. Aucun signal n'a été détecté pour la région *esxA1-esxA2* indiquant que les gènes *esxA1* et *esxA2* ne sont pas co-transcrits (**Figure 12**). La région suivante *esxA2-esaA* a été amplifiée suggérant la présence d'un terminateur de transcription et d'un promoteur, situés dans la région intergénique *esxA1-esxA2*. Les différents couples d'amorces ciblant les régions en aval du gène *esxA2* jusqu'au gène *SAK_1120* ont amplifié des fragments de taille attendue, suggérant une transcription en opéron des gènes *esxA2* à *SAK_1120*.

Les gènes *esxC*, *SAK_1121* et *SAK_1120* en aval du translocon sont associés au *locus* codant le SST7b chez la souche A909, et un signal extrêmement faible pour les régions *SAK_1120-SAK_1119* et *SAK_1119-SAK_1118* suggère la présence d'un terminateur de transcription et /ou une transcription indépendante des gènes situés en aval du gène *SAK_1120*. Ces résultats ont été corrélés à des analyses de prédiction *in silico* de présence de terminateur identifiant des terminateurs prédits en amont des gènes *esxA2* et *SAK_1119*.

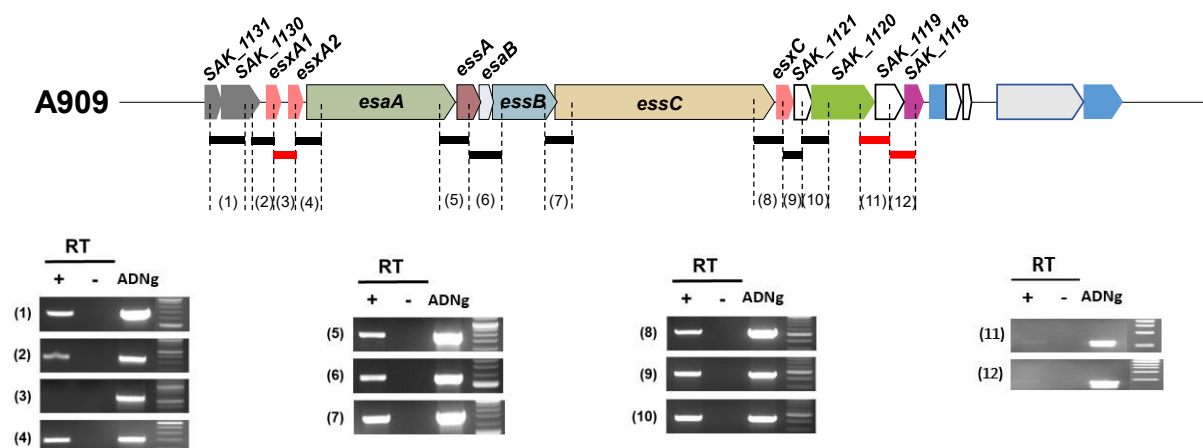


Figure 12 – Les gènes du translocon sont transcrits en opéron avec le gène *esxA2* en amont et les gènes *esxC*, *SAK_1121* et *SAK_1120* en aval chez la souche A909. Les ARN totaux ont été extraits à partir d’une culture bactérienne en phase exponentielle (DO_{600nm} à 0,5). Ces extraits ont été utilisés pour synthétiser les ADNc par transcription inverse (RT+). Différents couples d’amorces chevauchants sur les régions intergéniques des différents gènes ont été utilisés afin de mettre en évidence une co-transcription des gènes deux à deux. Les contrôles utilisés sont : absence de transcriptase inverse (RT-), ADNc de la souche A909 comme matrice. Les couples d’amorces utilisés sont (1) EM49-EM4 ; (2) EM73-EM54 ; (3) EM53-EM6 ; (4) EM5-EM8 ; (5) EM57-EM56 ; (6) EM55-EM20 ; (7) EM60-EM59 ; (8) EM63-EM62 ; (9) EM61-EM65 ; (10) EM64-EM66 ; (11) EM83-EM86 ; (12) EM85-EM88.

4. Un promoteur est présent au niveau de la région intergénique *SAK_1130-esxA1* chez la souche A909

Les résultats précédents suggèrent que les gènes du translocon sont transcrits en opéron avec le gène *esxA2* en amont et les gènes *esxC*, *SAK_1121* et *SAK_1120* en aval. Nous avons analysé la présence potentielle d’une région promotrice dans la région intergénique située directement en amont des gènes *esxA1* et *esxA2* et différentes régions intergéniques situées en aval afin d’identifier d’éventuels promoteurs alternatifs au sein de l’opéron potentiel. Pour cela, différentes régions intergéniques au sein du *locus* ont été amplifiées et sous-clonées dans le vecteur rapporteur pTCV-*lac*, en amont du gène de la β -galactosidase, pour réaliser des fusions transcriptionnelles (**Figure 13A**) et révéler une activité promotrice par dosage de l’activité de la β -galactosidase. Les résultats montrent une activité relativement importante pour les régions situées entre les gènes *SAK_1130-esxA1* et *esxA1-esxA2* confirmant la présence du promoteur situé au niveau de la région *esxA1-esxA2* et identifiant un deuxième promoteur de force promotrice équivalente et situé directement en amont du gène *esxA1* (**Figure 13B-C**). Aucune activité promotrice n’a été observée en amont des gènes *esaA*, *essA* et *essC*.

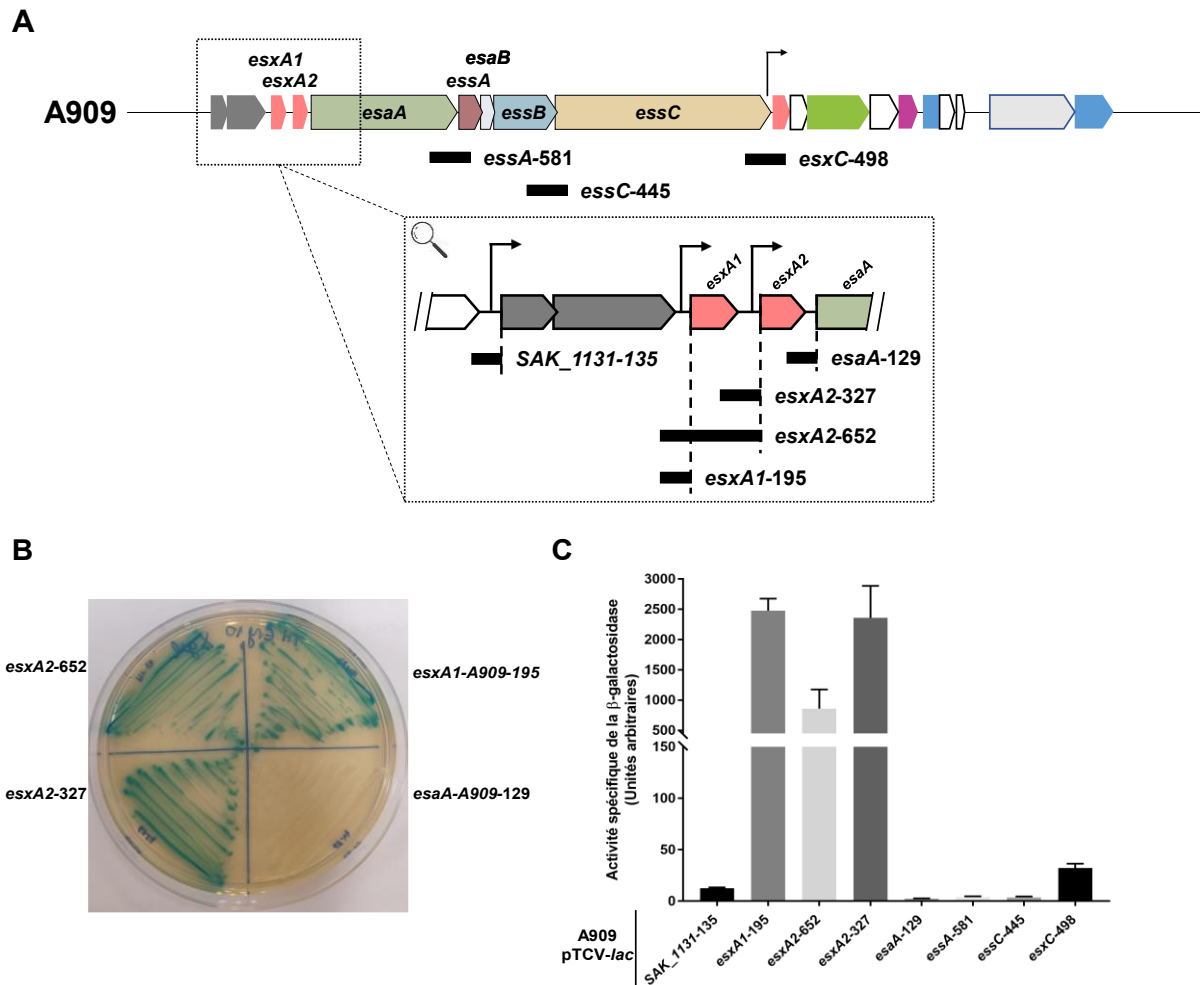


Figure 13 – Deux promoteurs forts P_{esxA1} et P_{esxA2} sont présents au niveau des régions intergéniques SAK_{1130} - $esxA1$ et $esxA1$ - $esxA2$ respectivement chez la souche A909. (A) Fusions transcriptionnelles construites. Les différents fragments d'ADN clonés dans le plasmide pTCV-*lac* sont représentés ci-dessus, dans chaque nom apparaît le gène testé et la taille de la région en amont clonée (en nombre de paires de bases). (B) Fusions transcriptionnelles chez la souche A909 isolées sur gélose TH additionnée d'érythromycine (10 μ g/mL) et de X-Gal à concentration 100 μ g/mL. (C) Dosage de la β -galactosidase des différentes fusions construites. L'activité des régions promotrices potentielles a été mesurée par dosage de l'activité de la β -galactosidase, exprimée en unités arbitraires, à partir des culots de cultures bactériennes en phase exponentielle (DO_{600nm} à 0,5) en bouillon TH additionné d'érythromycine à concentration finale de 10 μ g/mL. La construction pTCV-*lac*-*esaA*-129 possède une région intergénique dépourvue de promoteur (contrôle négatif) présentant une activité de la β -galactosidase équivalente à celle du plasmide pTCV-*lac* vide (résultats non montrés). L'ensemble des plasmides ci-dessus ont été clonés dans la souche A909. Les valeurs représentées sont exprimées par la moyenne \pm l'écart-type ($n = 3$ expériences indépendantes).

Enfin, une activité promotrice a été mise en évidence au niveau de la région intergénique *essC*-*esxC* avec une activité près de cinquante fois moins élevée que celle des deux promoteurs identifiés en amont de *esxA1* et *esxA2*. Enfin, en amont de l'opéron, une faible activité promotrice a été détectée en amont du gène *SAK_{1131}*. Les sites d'initiation de la transcription

(TSS, *transcription start site*) ont été déterminés par 5'RACE-PCR à partir des ARN totaux extraits de la souche A909 pour les 4 régions promotrices identifiées afin de confirmer les résultats observés avec les fusions transcriptionnelles. Deux sites d'initiation de la transcription ont été cartographiés, dans les régions *SAK_1130-esxA1* (P_{esxA1}) et *esxA1-esxA2* (P_{esxA2}) avec leur boîte -10 prédite (**Figure 14A**). Deux sites supplémentaires ont été identifiés plus en amont ainsi qu'en aval du translocon, dans les régions *SAK_1132-SAK_1131* (P_{SAK_1131}) et *essC-esxC* (P_{essC}) pour les deux promoteurs de plus faible activité (**Figures 14B-C**).

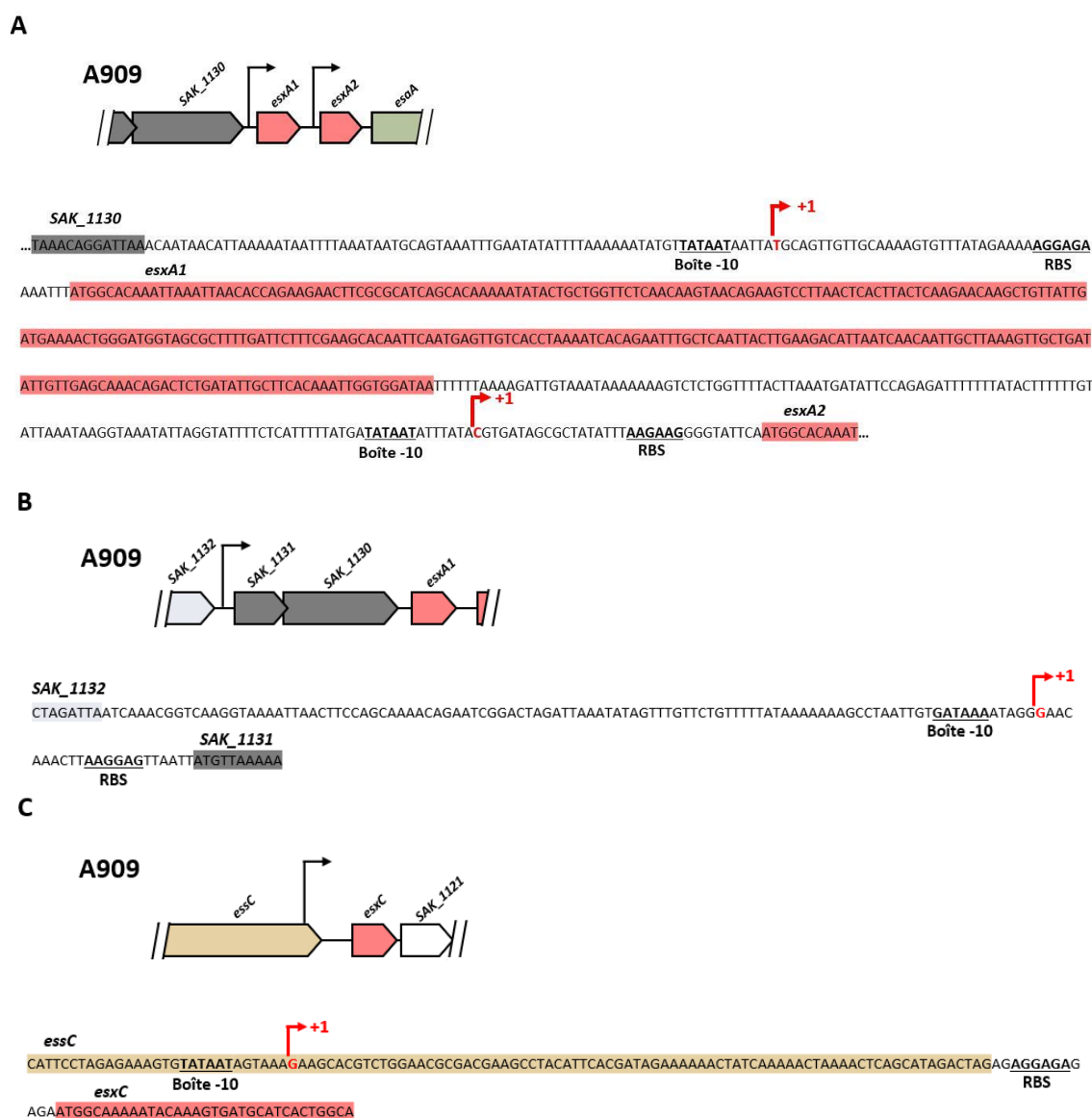


Figure 14 – Quatre sites d'initiation de la transcription (TSS, *transcription start site*) sont présents au niveau du locus codant le SST7b chez la souche A909. Les ARN totaux ont été extraits à partir d'une culture bactérienne en phase exponentielle et l'extrémité 5' des séquences d'ARN a été déterminée par 5' RACE-PCR. (A) TSS en amont des gènes *esxA1* et *esxA2*. (B) TSS en amont du gène *SAK_1131*. (C) TSS en amont du gène *esxC*. Les points +1 de transcription des promoteurs sont indiqués par une flèche rouge. Les boîtes -10 et les séquences Shine-Dalgarno (*Ribosome Binding Site*, RBS) supposées sont indiquées en gras et soulignées.

D'après l'ensemble de nos résultats, deux promoteurs forts sont présents en amont des gènes *esxA1* et *esxA2* suggérant deux unités transcriptionnelles avec d'une part la transcription du gène *esxA1* et d'autre part la transcription en opéron des gènes *esxA2-SAK_1120*. De plus, un promoteur en amont du gène *esxC* a été identifié suggérant que les gènes en aval du translocon peuvent être transcrits indépendamment des gènes du translocon avec une force relativement faible.

5. La substitution A→G au niveau de la boîte -10 prédite du promoteur en amont de *esxA* chez la souche NEM316 se traduit par une inactivation du promoteur

Nos résultats précédents ont montré qu'il existait une disparité entre les souches de référence de *S. agalactiae* quant à leur capacité à exprimer les gènes du SST7b. En effet, si une expression a pu être détectée au niveau transcriptionnel dans A909 par RT-PCR, un signal très faible voire inexistant a été détecté dans la souche NEM316.

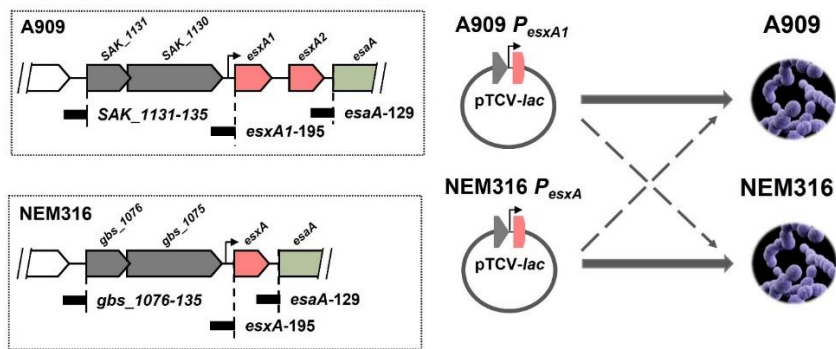
Nous avons alors comparé les niveaux de transcription des *loci* chez les souches A909 et NEM316 en ciblant les régions promotrices en amont du gène *esxA* (en deux exemplaires *esxA1* et *esxA2* chez A909). Pour cela, les régions intergéniques en amont des gènes *esxA1* et *esxA* des *loci* des souches A909 et NEM316 respectivement ont été amplifiées et sous-clonées dans le vecteur rapporteur pTCV-*lac*. Le dosage de l'activité de la β -galactosidase a montré une absence d'activité promotrice chez la souche NEM316 au niveau de la région intergénique *gbs_1075-esxA* (**Figures 16C**). De même, aucune activité promotrice n'a été détectée au niveau de la région intergénique en aval *esxA-esaA* et une faible activité promotrice a été observée au début du *locus*, en amont du gène *gbs_1076*. Nous avons alors comparé les séquences des régions intergéniques en amont du gène *esxA* chez les souches A909 et NEM316 à l'aide du logiciel Clustal OMEGA 4 (EBI, European Bioinformatics Institute) (70). Les séquences sont strictement identiques à l'exception d'une mutation ponctuelle. En effet, chez la souche NEM316, une substitution A→G est observée au niveau de la boîte -10 prédite du promoteur identifié situé en amont du gène *esxA* (**Figure 15**). Ces résultats suggèrent que la mutation ponctuelle observée au niveau de la boîte -10 du promoteur en amont du gène *esxA* chez la souche NEM316 entraîne une inactivation de celui-ci et une absence d'activité promotrice observée lors du dosage de l'activité de la β -galactosidase.



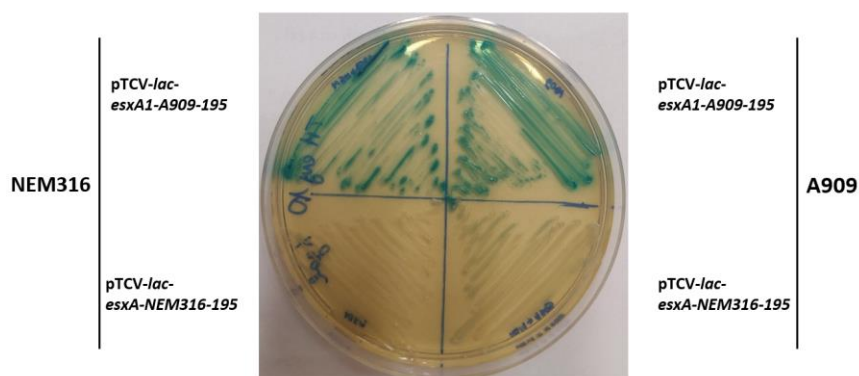
Figure 15 – La boîte -10 prédite du promoteur en amont du gène *esxA* présente une substitution A→G chez la souche NEM316. Les séquences ont été alignées à l'aide du logiciel Clustal OMEGA v.1.2.4 (EBI, European Bioinformatics Institute) disponible sur : <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (70). Le point +1 de transcription du promoteur est indiqué par une flèche rouge. La boîte -10 supposée du promoteur apparaît soulignée. Les mutations sont signalées par l'absence d'étoile sous les séquences alignées. La fin de la séquence chez NEM316 n'apparaît pas (tirets) étant donné que le gène *esxA* est une chimère entre les gènes *esxA1* et *esxA2* de la souche A909.

Nous avons recherché si l'apport de la séquence promotrice non mutée en amont de *esxA* dans la souche NEM316, permettait de mesurer une activité promotrice dans NEM316. Le plasmide pTCV-*lac* contenant la région promotrice *SAK_1130-esxA1* de la souche A909 a été utilisé pour transformer la souche NEM316. Une activité promotrice a alors été mise en évidence avec une activité près de 1000 fois supérieure, indiquant une restauration de l'activité du promoteur en amont du gène *esxA* (**Figures 16A-C**). De même, lorsque le plasmide pTCV-*lac* contenant la région promotrice *gbs_1075-esxA* de la souche NEM316 est utilisé pour transformer la souche A909, une perte de l'activité promotrice est observée. Nous avons confirmé que chez la souche NEM316, une mutation ponctuelle dans la boîte -10 prédite du promoteur du gène *esxA*, situé en amont du translocon, était responsable de l'inactivation de celui-ci et n'implique pas de régulateurs dont l'expression serait différente d'une souche à l'autre. Ces résultats mettent en évidence que chez *S.agalactiae*, il existe une variabilité dans la capacité à exprimer le SST7b en fonction des souches directement liée aux différences de séquences observées au niveau des *loci*.

A



B



C

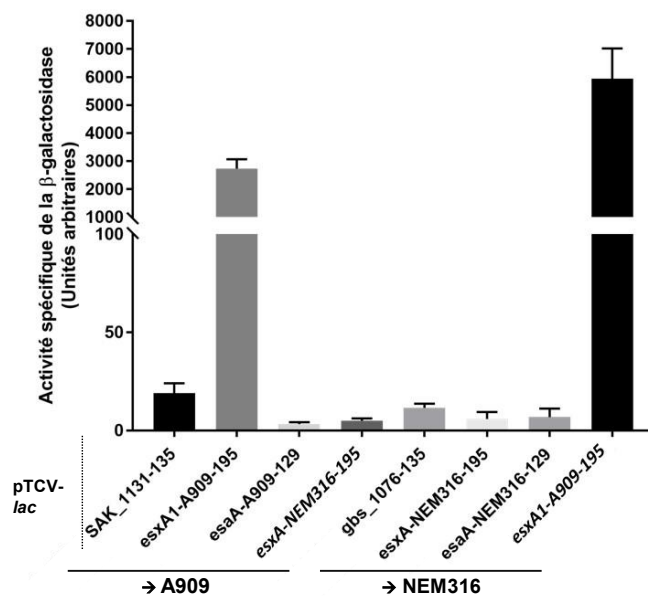


Figure 16 – La substitution A→G au niveau de la boîte -10 prédite du promoteur en amont de *esxA* chez la souche NEM316 se traduit par une inactivation du promoteur. (A) Fusions transcriptionnelles construites dans les souches A909 et NEM316. Les différents fragments d'ADN clonés dans le plasmide *pTCV-lac* sont représentés

ci-dessus. (B) Fusions transcriptionnelles dans les souches A909 et NEM316 isolées sur gélose TH additionnée d'érythromycine (10 µg/mL) et de X-Gal à concentration 100 µg/mL. (C) Dosage de la β-galactosidase des différentes fusions construites. L'activité des régions promotrices a été mesurée par dosage de l'activité de la β-galactosidase, exprimée en unités arbitraires, à partir des culots de cultures bactériennes en phase exponentielle (DO_{600nm} à 0,5) en bouillon TH additionné d'érythromycine à concentration finale de 10 µg/mL. Les plasmides contenant la région promotrice en amont de *esxA1* (A909) et de *esxA* (NEM316) ont été clonés dans NEM316 et A909. Les valeurs représentées sont exprimées par la moyenne +/- l'écart-type (n =3 expériences indépendantes).

6. Les protéines du translocon EsaA et EssC sont exprimées dans la souche A909 de *S. agalactiae*

L'ensemble de nos résultats montrent que les gènes codant le translocon et au moins 3 effecteurs prédits sont exprimés au niveau transcriptionnel. Pour montrer que le système est exprimé au niveau protéique chez A909, nous avons choisi de marquer plusieurs de ces protéines dans la souche A909 par fusion avec l'étiquette protéique 3xFlag. Pour chaque protéine du complexe de translocation, nous avons recherché la présence éventuelle d'un peptide signal de sécrétion dans la séquence et avons réalisé des prédictions *in silico* de localisation et topologie. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 - Prédictions *in silico* de localisation des protéines de la machinerie de sécrétion SST7b dans la souche de *S. agalactiae* A909

Protéines	N° Accession Genbank	Taille (AA)	Poids moléculaire	PS Sec ^a	Localisation ^b	Segments transmembranaires ^c
EsaA	ABA46234.1	1005	112 kDa	+ (0,636)	Membranaire	6
EssA	ABA45098.1	157	18,4 kDa	+ (0,573)	Membranaire	1
EsaB	ABA46306.1	80	9,3 kDa	-	Cytoplasmique	0
EssB	ABA45287.1	425	49 kDa	-	Sécrétée	1
EssC	ABA45888.1	1469	167,6 kDa	-	Membranaire	2

^a Serveur SignalP (v.5.0, DTU Bioinformatics) disponible sur <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (71)

(+) présence d'un peptide signal (PS) : le chiffre indiqué représente le score de probabilité compris entre 0 et 1, plus le chiffre est proche de 1 plus il est probable qu'il y ait un PS ; (-) absence de PS prédit

^b Serveur LOCTREE (ROSTLAB) disponible sur <https://roslab.org/services/loctree3/> (72)

^c Serveur TMHMM (v.2.0, DTU Bioinformatics) disponible sur <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> (73)

Un peptide signal de sécrétion N-terminal peut être ainsi prédit pour les protéines EsaA et EssA. En revanche, aucun peptide signal n'a été prédit pour les protéines EssB et EssC. L'analyse a révélé une organisation similaire à celle décrite chez *S. aureus* par Kneuper *et al.*

(47) avec une localisation transmembranaire des protéines EsaA, EssA, EssB et EssC, celles-ci possédant respectivement 6 domaines transmembranaires (EsaA), un seul domaine (EssA et EssB) et enfin deux domaines (EssC). Notons que selon les serveurs, la protéine EssB est prédite sécrétée ou membranaire (**Figures 17A-B**).

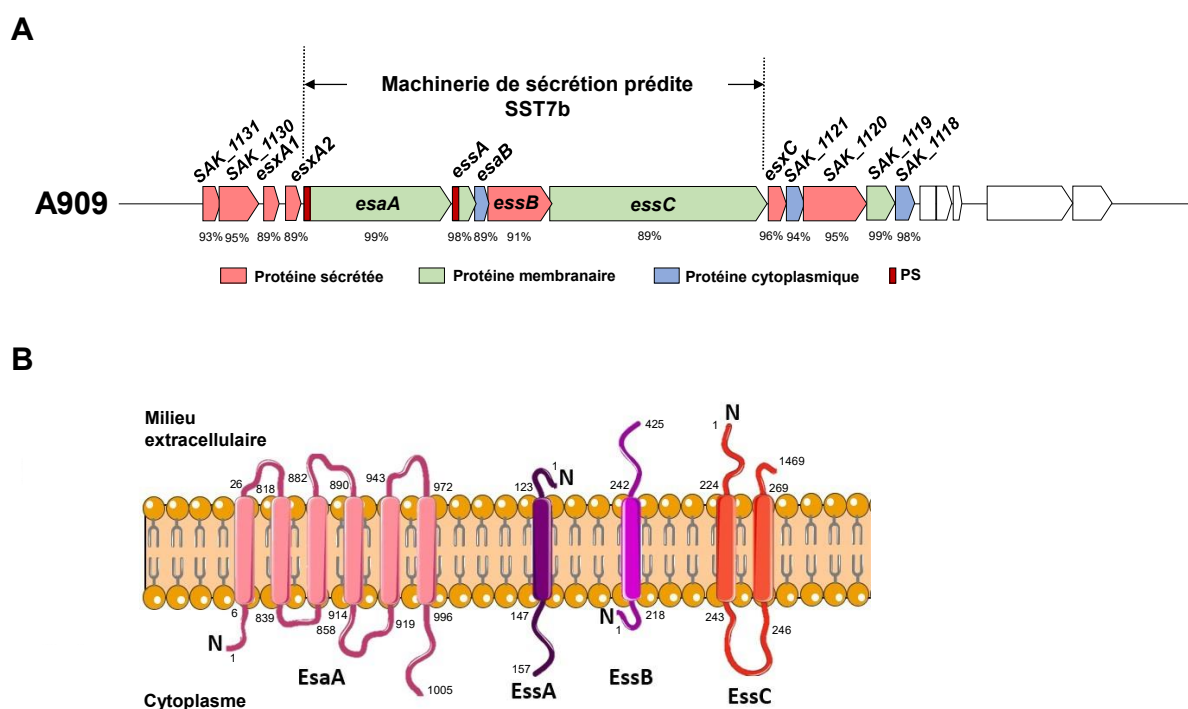


Figure 17– Localisation subcellulaire et topologie prédite des différentes protéines constituant le SST7b de *S. agalactiae*. Les prédictions informatiques ont été réalisées à partir des séquences protéiques issues du génome de la souche A909. (A) Représentation schématisée de la localisation subcellulaire des protéines codées par le SST7b (prédictions réalisées sur le serveur LOCTREE3 (ROSTLAB) disponible sur <https://roslab.org/services/loctree3/> (72) ; score de fiabilité en %). La présence d'un peptide signal (PS) N-terminal prédit est indiquée en rouge (Serveur SignalP (v.5.0, DTU Bioinformatics) disponible sur [http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/\(71\)](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/(71))). (B) Représentation schématisée de la topologie des protéines membranaires constituant la machinerie de sécrétion avec l'extrémité N-terminale indiquée par la lettre N et la position des différents résidus d'acides aminés notée (prédictions réalisées à partir du serveur TMHMM (v.2.0, DTU Bioinformatics) disponible sur [http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/\(73\)](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/(73))).

Chez *S. aureus*, les protéines EsaA et EssC sont essentielles dans la structure du complexe de translocation (43). Par ailleurs, leurs séquences codantes ne possèdent aucune région chevauchante sur les régions codantes des gènes situés en amont et en aval. Basés sur ces données, nous avons prioritairement construit les fusions traductionnelles au *locus* chromosomique de chacune de ces deux protéines pour obtenir les mutants A909esaA-3xflag et

A909*essC-3xflag*. L'analyse *western blot* anti-Flag a été réalisée sur des extraits cellulaires issus de cultures prélevées soit en phase exponentielle ($DO_{600nm} \sim 0,5$) soit en phase stationnaire de croissance, des conditions préalablement identifiées comme permettant l'expression de l'opéron SST7b. Comme montré dans la **Figure 18**, les protéines de la machinerie de sécrétion EsaA (112 kDa) et EssC (167,6 kDa) ont été uniquement détectées dans les extraits en phase stationnaire. Ces résultats montrent que la souche A909 de *S. agalactiae* exprime au moins deux protéines de structure du SST7b avec une influence de la phase de croissance, la phase stationnaire apparaissant comme la condition optimale pour l'expression de ces deux protéines dans la souche A909.

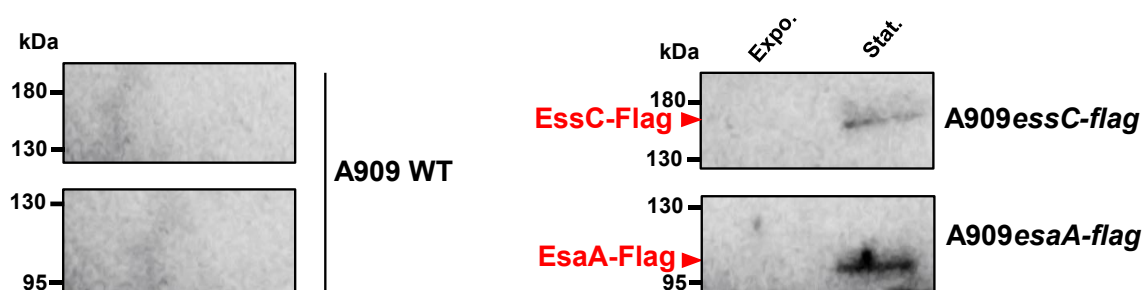


Figure 18 – La détection des fusions EsaA-Flag et EssC-Flag dans les fractions cellulaires de la souche A909 est dépendante de la phase de croissance bactérienne. Les différentes souches de *S. agalactiae* A909 ont été cultivées en milieu TH et les cultures ont été centrifugées une fois la DO_{600nm} de 0,5 atteinte (phase exponentielle ; Expo.) ou après une nuit d'incubation (phase stationnaire tardive ; Stat.) afin d'obtenir les fractions cellulaires. Les échantillons ont été séparés sur gel d'acrylamide 10% puis analysés en *western blot* en utilisant un anticorps anti-Flag.

7. La protéine effectrice EsxA2 est exprimée dans la souche A909 de *S. agalactiae*

L'ensemble de nos données suggèrent que la souche A909 de *S. agalactiae* pourrait produire un SST7b actif dans les conditions classiques de culture en laboratoire. Pour confirmer que le SST7b est fonctionnel dans la souche A909, nous avons choisi de détecter des effecteurs prédits au niveau protéique. Pour cela, nous avons employé une stratégie similaire à celle déployée pour les protéines EsaA et EssC. Bien qu'elles ne présentent pas de peptide signal N-terminal prédit par analyse *in silico*, les protéines EsxA1, EsxA2 et EsxC sont prédites comme sécrétées dans le milieu extérieur (serveur LOCTREE3, ROSTLAB (72)). Un motif WXG

central a été prédit pour les protéines EsxA1 et EsxA2 *via* le serveur KEGG Organisms (Kanehisa Laboratories) (74) de même qu'un motif central apparenté a été prédit pour la protéine EsxC avec remplacement de l'acide aminé Tryptophane par un autre acide aminé de même classe, une Tyrosine (YXG) (**Figure 19A**). Les fusions traductionnelles aux extrémités C-terminales ont été réalisées aux *loci* chromosomiques des protéines EsxA2 et EsxC afin d'obtenir les mutants A909*esxA2-flag* et A909*esxC-flag*. Les analyses en *western blot* réalisées sur les extraits protéiques cellulaires et de surnageants de culture nous ont permis de détecter l'effecteur EsxA2-flag dans la fraction cellulaire prélevée en phase stationnaire de croissance. En revanche, aucun signal n'a été obtenu pour la protéine EsxC-flag (**Figure 19B**). Ces résultats montrent que la souche A909 de *S. agalactiae* exprime la protéine EsxA2. A ce stade, la stratégie employée ne nous permet pas de montrer ni la sécrétion de cette protéine dans le surnageant de culture ni celle de EsxC.

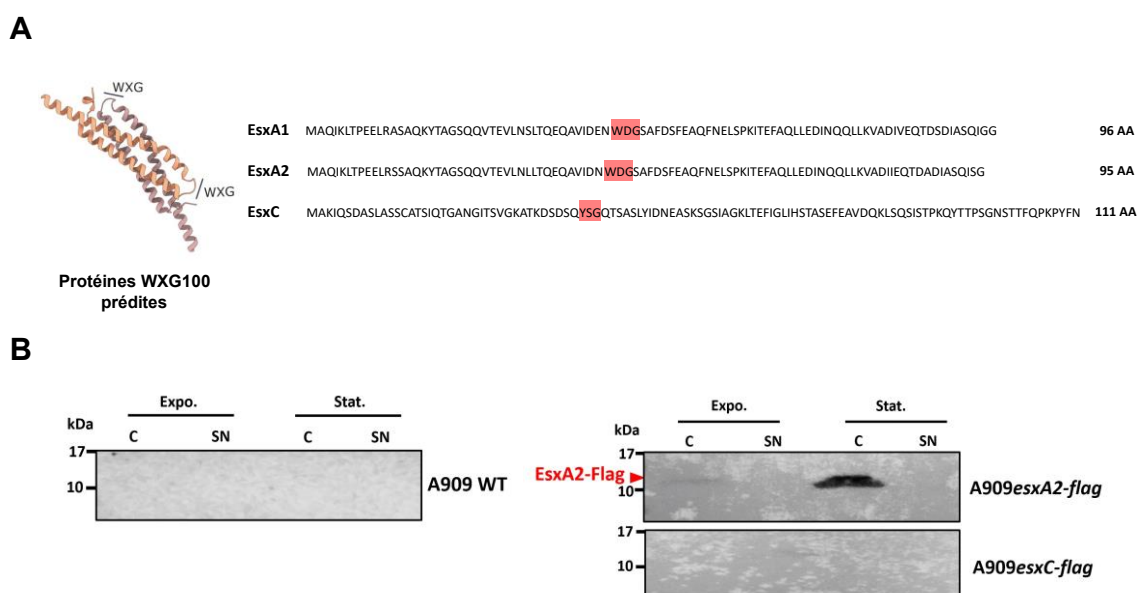


Figure 19 – La fusion EsxA2-Flag est uniquement détectée dans la fraction cellulaire dans la souche A909. (A) Protéines effectrices WXG100 prédites du SST7b de *S. agalactiae*. Superfamille des protéines WXG100 possédant un motif central WXG ou apparenté indiqué en surligné ainsi que leur longueur respective en acides aminés (AA) (prédictions réalisées sur le serveur KEGG Organisms (Kanehisa Laboratories) disponible sur https://www.genome.jp/kegg/catalog/org_list.html (74)) ; Figure modifiée et adaptée de Poulsen *et al.*, 2014. (B) Détection en *western blot* des fusions EsxA2-Flag et EsxC-Flag. Les souches de *S. agalactiae* A909 ont été cultivées en milieu TH et les cultures ont été centrifugées une fois la DO_{600nm} de 0,5 atteinte (phase exponentielle ; Expo.) ou après une nuit d'incubation (phase stationnaire tardive ; Stat.) afin d'obtenir les surnageants de culture (SN) et les fractions cellulaires (C). Les échantillons ont été séparés sur gel d'acrylamide 15% puis analysés en *western blot* en utilisant un anticorps anti-Flag.

PARTIE IV DISCUSSION

Le SST7 a été initialement décrit dans le *phylum* des actinobactéries et en particulier chez *Mycobacterium tuberculosis* où un rôle a été montré dans divers grands mécanismes tels que la conjugaison, la nutrition et la virulence (42,43). Plusieurs analyses génomiques montrent la présence d'un système équivalent, le SST7b, dans le *phylum* des Firmicutes et notamment chez plusieurs bactéries pathogènes opportunistes à Gram positif comme *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, et *Streptococcus suis* (43). Le but de cette étude était d'initier la caractérisation du SST7b de *Streptococcus agalactiae*. Comme décrit chez les Firmicutes dotés de ce système de sécrétion, nos analyses révèlent une organisation génétique complexe et variable au sein de différentes souches de référence au niveau des gènes prédits comme codant *i)* la machinerie de sécrétion et *ii)* les effecteurs potentiels. Les résultats obtenus montrent que cette variabilité a un impact important sur la capacité de ces souches à exprimer ce système. Enfin, ce travail montre pour la première fois que *S. agalactiae* exprime plusieurs protéines de ce système suggérant que ce dernier pourrait également avoir un rôle dans cette bactérie.

Dans cette étude, nous avons comparé les *loci* codant le système de sécrétion de type VIIb au sein des souches de référence de *S. agalactiae* A909, NEM316 et COH1 appartenant aux complexes clonaux CC10, CC23 et CC17 respectivement. Les résultats montrent une organisation génétique globale du système comparable à celle décrite chez *S. aureus*. En effet, les gènes *esaA*, *essA*, *esaB*, *essB* et *essC* codant les protéines du translocon sont retrouvés au sein de chaque souche de *S. agalactiae*. Seule la protéine essentielle EssC présente une variabilité dans sa séquence codante. En effet, en comparaison à la souche A909, la délétion des 2 bases (A et A) en position 500 du gène *gbs_1069* de la souche NEM316, laisse envisager un profil de production de la protéine EssC sous une forme unique tronquée dès la position 167 équivalent à une perte de pratiquement 90% de la protéine décrite fonctionnelle chez *S. aureus*. Etant donné l'importance majeure de cette protéine dans la formation du canal de translocation, on peut avancer que cette mutation altère grandement la fonctionnalité du système dans cette souche. Une autre possibilité serait la production de la partie manquante sous forme d'une deuxième sous-unité de 1291 AA (codée par le gène *gbs_1068*) s'associant à la première de 167 AA. Cependant, l'analyse de la séquence en amont de l'ATG du gène *gbs_1068* ne permet pas de révéler une séquence consensus de fixation de ribosome. L'expression d'une protéine EssC dans NEM316 et souches apparentées issues du même complexe clonal, reste à prouver.

En dehors des gènes codant le translocon, une forte variabilité génétique a été observée pour les gènes situés de part et d'autre du translocon, codant les effecteurs sécrétés Esx,

notamment concernant le gène *esxA*. En effet, en prenant comme référence la souche A909, une délétion au niveau de la région *esxA1-esxA2* a été observée chez la souche NEM316 conduisant à une protéine chimère EsxA, et une délétion plus large encore est observée chez la souche COH1 conduisant à la perte du gène *esxA* et à la fusion des gènes de part et d'autre. Ces trois souches appartiennent à différents complexes clonaux associés à certains contextes cliniques particuliers. De manière intéressante, lorsque nous avons comparé par bio-informatique la séquence nucléotidique du *locus* SST7b issue de la souche COH1 avec d'autres souches de référence de *S. agalactiae* dont les séquences sont disponibles dans les bases de données, nous avons mis en évidence une organisation génétique similaire à COH1, avec absence du gène *esxA* et fusion des gènes de part et d'autre, au sein de plusieurs souches appartenant au CC17 (32790-3A, B105, 874391, SG-M6, BM110, NGBS128, 2018-670). D'après nos analyses, cette délétion entraîne une perte du promoteur fort identifié dans la souche A909. Malgré cette délétion, une faible expression des gènes constituant la machinerie de sécrétion est détectée par RT-PCR, ce qui suggère l'existence d'un promoteur. L'analyse des séquences nucléotidiques situées en amont du gène *esxA* ne permettent pas de prédire la présence d'un terminateur et ouvre la possibilité d'une co-transcription avec l'opéron codant des protéines hypothétiques de fonction inconnue situé en amont.

Il est à noter que ce phénomène de délétion en amont du *locus* codant le SST7b chez la souche hypervirulente de ST17, COH1, a été aussi observé au niveau du *locus* *Cas* du système CRISPR-Cas9 de type II-A (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Caspase 9*) de *S. agalactiae*, qui est un système de défense bactérien contre l'infection par des phages. En effet, Pastuszka *et al.* (75) ont montré que chez la souche de ST17, BM110, une délétion de la région promotrice en amont du *locus* *Cas* était retrouvée. Malgré cette délétion, les analyses montrent que le promoteur d'un petit ARN situé en amont permet la transcription du système. Une configuration comparable est donc envisageable pour la transcription du SST7b dans les souches COH1 et BM110. Si une expression au niveau transcriptionnel reste envisageable, la question de l'expression protéique reste posée. En effet la délétion provoque la perte du promoteur mais également celle i) d'une importante région non codante du gène *esxA* qui porte les signaux d'initiation de la traduction et ii) d'une importante région codant la région N-terminale de la protéine EsaA portant le signal d'exportation à la membrane. Les expériences de fusions traductionnelles qui nous ont permis de montrer l'expression de la protéine EsaA dans la souche A909 sont en cours dans la souche COH1 et devraient nous permettre d'obtenir de nouveaux éléments. Le caractère essentiel de cette protéine dans le

SST7b montré chez *S. aureus* (47) laisse envisager un impact fortement délétère sur le fonctionnement global du système dans cette souche et les autres souches ST17. Cette réduction et simplification des génomes observées chez certaines souches pourraient potentiellement être un reflet de l'évolution et de l'adaptation des souches hypervirulentes ST17 à certaines niches écologiques et suggèrent un rôle plutôt accessoire du système de sécrétion de type VIIb dans la virulence (76).

Notre analyse de l'expression des gènes codant le SST7b dans la souche A909 a montré l'importance de cette région située en amont du ou des gènes *esxA* codant l'un des effecteurs prédits. En effet, dans la souche A909, nous avons identifié deux promoteurs situés en amont de chaque gène *esxA1* et *esxA2* qui conditionnent très probablement l'expression des autres gènes du système puisqu'ils sont co-transcrits. Dans la souche NEM316, nous avons montré qu'une mutation ponctuelle au niveau de la boîte -10 du promoteur en amont du gène *esxA* entraînait une altération de l'activité de ce promoteur et du niveau de transcription des gènes du système co-transcrits en aval. En effet, ceci est concordant avec nos résultats de RT-PCR qui ont montré l'absence de transcrit pour les gènes *esaA*, *essA*, *essB* et *essC* chez la souche NEM316 en conditions classiques de culture en laboratoire. Nos résultats suggèrent donc bien un impact majeur de cette région promotrice sur le niveau de transcription des autres gènes de l'opéron. Par ailleurs, si nos résultats n'ont pas permis de révéler une influence de la phase de croissance dans la souche A909, une potentielle régulation de l'expression du système reste à étudier. En effet, des analyses transcriptomiques réalisées au laboratoire ont montré une modulation de l'expression des gènes de l'opéron dans la souche NEM316 en fonction de la phase de croissance ou lors de croissance en fluides biologiques pertinents pour cette bactérie tels que le sang humain (33) et le liquide amniotique (35). Chez *S. aureus*, une mutation ponctuelle du gène codant la kinase SaeS du système à deux composants SaeRS, régulateur de l'expression d'exotoxines, module l'expression des gènes de l'opéron *ess* (49). Il est à noter que chez A909, un système à deux composants, le système LtdRS (gènes *SAK_1112* et *SAK_1111*) est situé directement en aval du *locus* codant le SST7b. Un rôle de ce système dans la régulation du SST7b de *S. agalactiae* n'a jamais été décrit.

L'analyse de l'expression de plusieurs acteurs du SST7b au niveau protéique a montré pour la première fois, à partir d'extraits cellulaires, que *S. agalactiae* produit des protéines du système. En effet, notre stratégie de fusions traductionnelles dans la souche A909 nous a permis de détecter deux protéines de la machinerie de sécrétion SST7b, EsaA et EssC. La localisation

membranaire prédite reste cependant à confirmer. Cette stratégie pourrait être envisagée pour montrer l'expression des autres composants de la machinerie EssA, EsaB et EssB. Cependant, le changement de séquence imposé par la stratégie de fusion au niveau des régions chevauchantes des séquences codantes entraînerait obligatoirement des modifications dans l'expression protéique d'autres composants de la machinerie avec un risque de perturbation dans le fonctionnement du système. A ce stade, ce travail ne permet pas d'affirmer que ces composants sont exprimés pour former un système fonctionnel. C'est dans ce but que nous avons cherché à détecter des effecteurs sécrétés par le SST7b. Notre choix s'est porté *i)* sur EsxA2 codé par le gène *SAK_1128* fortement exprimé au niveau transcriptionnel et situé directement en amont de *esaA* (*SAK_1127*), et *ii)* EsxC codé par le gène *SAK_1122* directement codé en aval du gène *essC* (*SAK_1123*) et pour lequel nous avons montré un niveau de transcription beaucoup plus faible. La stratégie de fusion protéique à l'extrémité C-terminale nous a permis de montrer une expression de l'effecteur EsxA2 en phase stationnaire. Cependant, cette méthode ne nous a pas permis de mettre en évidence sa sécrétion dans le milieu extérieur. Sur ce point, la stratégie de fusion traductionnelle utilisée présente potentiellement des limites. En effet, si l'exportation correcte des effecteurs repose sur des interactions protéine-protéine, il est envisageable que l'étiquette protéique puisse interférer dans ces interactions et le processus d'exportation. En effet, Poulsen *et al.* (45) ont montré qu'un motif conservé riche en résidus hydrophobes était retrouvé dans la région C-terminale des protéines de la famille WXG100 et que celui-ci serait impliqué dans la sécrétion des effecteurs. D'après Bowman *et al.* (77), le domaine ATPasique D3 de la protéine EssC, qui joue un rôle central dans la sécrétion des protéines effectrices, situé à l'extrémité C-terminale de celle-ci, est impliqué dans l'interaction avec les substrats par le biais d'une séquence signal située en C-terminal des protéines WXG100. Par ailleurs, une stratégie visant à exprimer ce même effecteur sur un plasmide en multicopie sous forme fusionnée à l'étiquette 3xflag en N-terminal, ne nous a pas permis de montrer sa sécrétion ni sa production (résultats non montrés), ne nous permettant pas de conclure sur ce point. Une alternative serait de produire des anticorps spécifiques des différentes protéines du SST7b de *S. agalactiae*, impliquant des processus davantage fastidieux de purification des diverses protéines et d'immunisation d'animaux.

Au cours de ces analyses protéiques, nous avons pu observer un effet phase de croissance-dépendant pour les fusions EsxA2-Flag, EsaA-Flag et EssC-Flag, détectées seulement en phase stationnaire tardive. Dans leurs travaux, Kneuper *et al.* (47) ont montré de même que la sécrétion des effecteurs EsxA2 et EsxC chez *S. aureus*, est dépendante de la phase de

croissance, avec une sécrétion observée à une phase précoce pour les souches COL et RN6390 et à l'inverse, en phase tardive pour les souches USA300 et SA113. Pour certaines souches, les effecteurs du SST7b sont détectés de façon transitoire dans les surnageants de culture et ne sont plus détectables en phase stationnaire tardive de croissance. Dans ces études, aucune régulation transcriptionnelle dépendante de la phase de croissance n'est montrée et la divergence entre niveau de transcription et détection au niveau protéique favorise l'hypothèse d'une régulation post-transcriptionnelle. Ainsi, il sera également intéressant d'analyser la production de ces protéines dans une gamme de phase de croissance plus large que celle qui a été testée. Aucune des conditions testées ne nous a permis de détecter la protéine EsxC. Ce résultat pourrait être expliqué par le faible niveau de transcrit lié à la position très éloignée du gène *esxC* situé 9,8 kb en aval du promoteur fort P_{esxA2} , qui d'après nos résultats précédents, serait important pour la transcription des gènes de l'opéron du SST7b. En effet, un transcrit de plus de 10 kb peut se révéler particulièrement instable et limiter l'efficacité de production des protéines dont il porte les séquences codantes. De plus, nous avons mis en évidence la présence d'un promoteur alternatif P_{esxC} d'activité relativement faible par rapport à celle de P_{esxA2} . Ainsi, une régulation indépendante des gènes codant des effecteurs situés en aval de ce promoteur par un mécanisme non élucidé peut être envisagée. Dans la souche Newman de *S. aureus*, la protéine EsxC reste indétectable (47,56) et Burts *et al.* (56) ont montré que chez cette même souche, la protéine cytosolique EsaB appartenant à la machinerie de sécrétion SST7b, semblait réprimer la production de l'effecteur EsxC par un mécanisme post-transcriptionnel. La protéine EsaB est exprimée de manière constitutive dans le cytoplasme de la bactérie et réprime l'expression de EsxC lorsque *S. aureus* est cultivé en milieu de laboratoire TSB (*tryptic soy broth*). En présence de sérum humain, soit durant le processus d'infection, la répression de l'effecteur EsxC par la protéine EsaB est levée. De même, il a été montré que les effecteurs EsxA et EsxB étaient produits et sécrétés avec des niveaux très faibles dans la souche Newman par comparaison avec d'autres souches comme USA300 (56) et que ceci s'expliquait par la régulation négative du *cluster ess* dans cette souche par le système à deux composants SaeRS (49).

A ce stade, l'ensemble de nos résultats ne nous permet pas de statuer quant à la fonctionnalité du SST7b dans la souche A909. Actuellement, une stratégie développée au laboratoire envisage une approche globale visant à comparer les profils des protéines sécrétées par la souche sauvage et par un mutant de délétion du système par spectrométrie de masse. Cette stratégie devrait nous permettre de confirmer ou non la sécrétion des effecteurs connus du système mais aussi d'identifier de nouveaux effecteurs sécrétés par le SST7b. En effet, la région

en aval du translocon chez *S. agalactiae* présente une très importante variabilité génétique au sein des souches étudiées. L'analyse des séquences codantes portées par cette région du *locus* révèle en grande majorité des protéines hypothétiques qui n'ont jamais été étudiées. Leur caractérisation pourrait orienter les recherches visant à identifier le rôle de ce système dans la physiologie de *S. agalactiae*. Chez d'autres Firmicutes comme *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus intermedius* ou encore *Staphylococcus aureus*, le SST7b a été démontré comme ayant un rôle dans la virulence, la communication cellulaire et l'antagonisme bactérien (46,48,54,57,58). Chez *Enterococcus faecalis*, Chatterjee *et al.* (58) ont récemment montré que l'exposition à différents stress (doses sub-létales d'antibiotiques ciblant la membrane bactérienne ou ciblant l'ADN, attaque de phage) induisaient l'expression des gènes du SST7b. Chez cette bactérie, l'expression du SST7b est impliqué dans la compétition inter-espèces notamment contre plusieurs bactéries à Gram positif. Chez d'autres Firmicutes, des protéines à domaine LXG dont les gènes sont situés en aval du translocon possèdent une activité toxinique et jouent un rôle dans l'antagonisme bactérien dans un même environnement (46,57). Aucune donnée fonctionnelle n'existe chez *S. agalactiae*. Sitkiewicz *et al.* (35) ont mis en évidence une surexpression des transcrits des gènes codant la machinerie de sécrétion et les effecteurs sécrétés prédits chez *S. agalactiae* lorsque la bactérie était cultivée en liquide amniotique par comparaison à une culture en milieu de laboratoire classique. Un mutant de délétion du système a été construit afin d'identifier un phénotype différent de la souche sauvage chez le mutant en conditions de croissance en fluides biologiques (sang, liquide amniotique) ou encore de stress induit par des antibiotiques. Il est à noter que des protéines effectrices à domaine LXG sont également prédites dans la région variable en aval du translocon chez *S. agalactiae*. Ces protéines constituent des candidats particulièrement intéressants pour étudier leur rôle potentiel dans la compétition avec les autres bactéries à Gram positif pouvant être rencontrées au sein de la flore microbienne vaginale où réside le streptocoque B, notamment avec les Lactobacilles.

L'ensemble de ces travaux a permis d'obtenir les premières données sur le SST7b chez *S. agalactiae*. Nos résultats ouvrent de nombreuses perspectives d'études sur la caractérisation de nouveaux facteurs qui devraient permettre de mieux appréhender le rôle de ce système chez cette bactérie. A terme, ils devraient contribuer à l'acquisition de nouvelles connaissances sur la capacité de cette bactérie à s'adapter, interagir, évoluer dans divers environnements et à éventuellement induire une pathologie chez l'hôte.

PARTIE V

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Lancefield RC, Freimer EH. Type-specific polysaccharide antigens of group B *Streptococci*. J Hyg (Lond). juin 1966;64(2):191-203.
2. Centre national de référence des Streptocoques [Internet]. [cité 5 févr 2021]. Disponible sur: <https://cnr-strep.fr/index.php/accueils/33-categories-france/telechargement-prive/infection-a-streptocoque-du-groupe-a>
3. Fry RM. Fatal infections by haemolytic *Streptococcus* group B. The Lancet. 22 janv 1938;231(5969):199-201.
4. Denis F. Bactériologie médicale : techniques usuelles. Elsevier/ Masson; 2016.
5. Glaser P, Rusniok C, Buchrieser C, Chevalier F, Frangeul L, Msadek T, et al. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. Mol Microbiol. sept 2002;45(6):1499-513.
6. Jones N, Bohnsack JF, Takahashi S, Oliver KA, Chan M-S, Kunst F, et al. Multilocus sequence typing system for group B *Streptococcus*. J Clin Microbiol. juin 2003;41(6):2530-6.
7. Lier C, Baticle E, Horvath P, Haguenoer E, Valentin A-S, Glaser P, et al. Analysis of the type II-A CRISPR-Cas system of *Streptococcus agalactiae* reveals distinctive features according to genetic lineages. Front Genet. 2015;6:214.
8. Poyart C, Réglier-Poupet H, Tazi A, Billoët A, Dmytruk N, Bidet P, et al. Invasive group B Streptococcal infections in infants, France. Emerg Infect Dis. oct 2008;14(10):1647-9.
9. Bohnsack JF, Whiting A, Gottschalk M, Dunn DM, Weiss R, Azimi PH, et al. Population structure of invasive and colonizing strains of *Streptococcus agalactiae* from neonates of six U.S. academic centers from 1995 to 1999. J Clin Microbiol. avr 2008;46(4):1285-91.
10. Quentin R, Morange-Saussier V, Watt S. Obstetrical management of *Streptococcus agalactiae*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). oct 2002;31(6 Suppl):4S65-73.
11. Santé publique France. Bulletin de santé publique EPIBAC : surveillance des infections invasives bactériennes 2018 [Internet]. [cité 5 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-et-infections-respiratoires/infections-a-pneumocoque/documents/bulletin-national/bulletin-de-sante-publique-epibac-surveillance-des-infections-invasives-bacteriennes-2018.-novembre-2019>
12. Joubrel C, Tazi A, Six A, Dmytruk N, Touak G, Bidet P, et al. Group B *Streptococcus* neonatal invasive infections, France 2007–2012. Clin Microbiol Infect. 1 oct 2015;21(10):910-6.
13. Winn HN. Group B *Streptococcus* infection in pregnancy. Clin Perinatol. 1 sept 2007;34(3):387-92.
14. Raabe VN, Shane AL. Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*). Microbiol Spectr. mars 2019;7(2).
15. Melin P. Neonatal group B Streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. sept 2011;17(9):1294-303.
16. Rajagopal L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. Future Microbiol. mars 2009;4(2):201-21.

17. Zimmermann P, Gwee A, Curtis N. The controversial role of breast milk in GBS late-onset disease. *J Infect.* 1 juin 2017;74:S34-40.
18. Tazi A, Disson O, Bellais S, Bouaboud A, Dmytruk N, Dramsi S, et al. The surface protein HvgA mediates group B *Streptococcus* hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *J Exp Med.* 25 oct 2010;207(11):2313-22.
19. Santé publique France. Bulletin de santé publique EPIBAC : surveillance des infections invasives bactériennes 2011 [Internet]. [cité 18 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-et-infections-respiratoires/infections-a-pneumocoque/documents/bulletin-national/bulletin-epibac-n-1-du-reseau-de-surveillance-des-infections-invasives-bacteriennes>
20. Sendi P, Johansson L, Norrby-Teglund A. Invasive group B Streptococcal disease in non-pregnant adults : a review with emphasis on skin and soft-tissue infections. *Infection.* mars 2008;36(2):100-11.
21. Edwards MS, Baker CJ. Group B Streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 sept 2005;41(6):839-47.
22. Six A, Joubrel C, Tazi A, Poyart C. Infections materno-fœtales à *Streptococcus agalactiae*. *Presse Médicale.* 1 juin 2014;43(6, Part 1):706-14.
23. Manning SD, Lewis MA, Springman AC, Lehotzky E, Whittam TS, Davies HD. Genotypic diversity and serotype distribution of group B *Streptococcus* isolated from women before and after delivery. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 juin 2008;46(12):1829-37.
24. Boyer KM, Gadzala CA, Kelly PD, Burd LI, Gotoff SP. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B Streptococcal early-onset disease. II. Predictive value of prenatal cultures. *J Infect Dis.* nov 1983;148(5):802-9.
25. Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ONERBA) : rapport d'activité 2017 [Internet]. [cité 26 févr 2021]. Disponible sur: <http://onerba.org/publications/rapports-onerba/>
26. Vachée A, Varon E, Jouy E, Meunier D. Sensibilité aux antibiotiques chez les streptocoques (hors pneumocoque) et les entérocoques : données Onerba. *Pathol Biol.* 1 mai 2009;57(3):240-4.
27. Absalon J, Segall N, Block SL, Center KJ, Scully IL, Giardina PC, et al. Safety and immunogenicity of a novel hexavalent group B *Streptococcus* conjugate vaccine in healthy, non-pregnant adults: a phase 1/2, randomised, placebo-controlled, observer-blinded, dose-escalation trial. *Lancet Infect Dis.* 1 févr 2021;21(2):263-74.
28. Madhi SA, Koen A, Cutland CL, Jose L, Govender N, Wittke F, et al. Antibody kinetics and response to routine vaccinations in infants born to women who received an investigational trivalent group B *Streptococcus* polysaccharide CRM197-conjugate vaccine during pregnancy. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 déc 2017;65(11):1897-904.
29. Bellais S, Six A, Fouet A, Longo M, Dmytruk N, Glaser P, et al. Capsular switching in group B *Streptococcus* CC17 hypervirulent clone: a future challenge for polysaccharide vaccine development. *J Infect Dis.* 1 déc 2012;206(11):1745-52.
30. Brodeur BR, Boyer M, Charlebois I, Hamel J, Couture F, Rioux CR, et al. Identification of

group B Streptococcal Sip protein, which elicits cross-protective immunity. *Infect Immun.* oct 2000;68(10):5610-8.

31. Margarit I, Rinaudo CD, Galeotti CL, Maione D, Ghezzi C, Buttazzoni E, et al. Preventing bacterial infections with pilus-based vaccines: the group B *Streptococcus* paradigm. *J Infect Dis.* 1 janv 2009;199(1):108-15.
32. Vornhagen J, Adams Waldorf KM, Rajagopal L. Perinatal group B Streptococcal infections: virulence factors, immunity, and prevention strategies. *Trends Microbiol.* nov 2017;25(11):919-31.
33. Mereghetti L, Sitkiewicz I, Green NM, Musser JM. Extensive adaptive changes occur in the transcriptome of *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) in response to incubation with human blood. *PloS One.* 4 sept 2008;3(9):e3143.
34. Mereghetti L, Sitkiewicz I, Green NM, Musser JM. Identification of an unusual pattern of global gene expression in group B *Streptococcus* grown in human blood. *PloS One.* 23 sept 2009;4(9):e7145.
35. Sitkiewicz I, Green NM, Guo N, Bongiovanni AM, Witkin SS, Musser JM. Transcriptome adaptation of group B *Streptococcus* to growth in human amniotic fluid. *PloS One.* 1 juill 2009;4(7):e6114.
36. Herbert MA, Beveridge CJE, McCormick D, Aten E, Jones N, Snyder LAS, et al. Genetic islands of *Streptococcus agalactiae* strains NEM316 and 2603VR and their presence in other Group B streptococcal strains. *BMC Microbiol.* 24 mai 2005;5:31.
37. Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PAD, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CMJE, et al. Type VII secretion-mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(11):883-91.
38. Abby SS, Cury J, Guglielmini J, Néron B, Touchon M, Rocha EPC. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. *Sci Rep.* 16 mars 2016;6:23080.
39. Palmer T, Finney AJ, Saha CK, Atkinson GC, Sargent F. A holin/peptidoglycan hydrolase-dependent protein secretion system. *Mol Microbiol.* mars 2021;115(3):345-55.
40. Green ER, Meccas J. Bacterial secretion Ssystems: an overview. *Microbiol Spectr.* févr 2016;4(1).
41. Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol.* nov 2002;46(3):709-17.
42. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell.* 29 juin 2007;129(7):1287-98.
43. Tran H-KR, Grebenc DW, Klein TA, Whitney JC. Bacterial type VII secretion: an important player in host-microbe and microbe-microbe interactions. *Mol Microbiol.* 7 janv 2021;
44. Bottai D, Gröschel MI, Brosch R. Type VII secretion systems in gram-positive bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;404:235-65.

45. Poulsen C, Panjikar S, Holton SJ, Wilmanns M, Song Y-H. WXG100 protein superfamily consists of three subfamilies and exhibits an α -helical C-terminal conserved residue pattern. *PloS One*. 2014;9(2):e89313.
46. Ulhuq FR, Gomes MC, Duggan GM, Guo M, Mendonca C, Buchanan G, et al. A membrane-depolarizing toxin substrate of the *Staphylococcus aureus* type VII secretion system mediates intraspecies competition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 août 2020;117(34):20836-47.
47. Kneuper H, Cao ZP, Twomey KB, Zoltner M, Jäger F, Cargill JS, et al. Heterogeneity in ess transcriptional organization and variable contribution of the Ess/Type VII protein secretion system to virulence across closely related *Staphylococcus aureus* strains. *Mol Microbiol*. sept 2014;93(5):928-43.
48. Cao Z, Casabona MG, Kneuper H, Chalmers JD, Palmer T. The type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* secretes a nuclease toxin that targets competitor bacteria. *Nat Microbiol*. 10 oct 2016;2(1):1-11.
49. Anderson M, Aly KA, Chen Y-H, Missiakas D. Secretion of atypical protein substrates by the ESAT-6 secretion system of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. nov 2013;90(4):734-43.
50. Burts ML, Williams WA, DeBord K, Missiakas DM. EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 janv 2005;102(4):1169-74.
51. Warne B, Harkins CP, Harris SR, Vatsiou A, Stanley-Wall N, Parkhill J, et al. The Ess/Type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* shows unexpected genetic diversity. *BMC Genomics*. 11 mars 2016;17:222.
52. Rosenberg OS, Dovala D, Li X, Connolly L, Bendebury A, Finer-Moore J, et al. Substrates control multimerization and activation of the multi-domain ATPase motor of type VII secretion. *Cell*. 23 avr 2015;161(3):501-12.
53. Jäger F, Kneuper H, Palmer T. EssC is a specificity determinant for *Staphylococcus aureus* type VII secretion. *Microbiol Read Engl*. mai 2018;164(5):816-20.
54. Bowran K, Palmer T. Extreme genetic diversity in the type VII secretion system of *Listeria monocytogenes* suggests a role in bacterial antagonism. *Microbiol Read Engl*. mars 2021;167(3).
55. Cruciani M, Etna MP, Camilli R, Giacomini E, Percario ZA, Severa M, et al. *Staphylococcus aureus* Esx Factors Control Human Dendritic Cell Functions Conditioning Th1/Th17 Response. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:330.
56. Burts ML, DeDent AC, Missiakas DM. EsaC substrate for the ESAT-6 secretion pathway and its role in persistent infections of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. août 2008;69(3):736-46.
57. Whitney JC, Peterson SB, Kim J, Pazos M, Verster AJ, Radey MC, et al. A broadly distributed toxin family mediates contact-dependent antagonism between gram-positive bacteria. *Laub MT, éditeur. eLife*. 11 juill 2017;6:e26938.
58. Chatterjee A, Willett JLE, Dunny GM, Duerkop BA. Phage infection and sub-lethal antibiotic exposure mediate *Enterococcus faecalis* type VII secretion system dependent inhibition of bystander bacteria. *PLoS Genet*. janv 2021;17(1):e1009204.

59. Taylor JC, Gao X, Xu J, Holder M, Petrosino J, Kumar R, et al. A type VII secretion system of *Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus* contributes to gut colonization and the development of colon tumors. *PLoS Pathog.* janv 2021;17(1):e1009182.
60. Lamy M-C, Zouine M, Fert J, Vergassola M, Couve E, Pellegrini E, et al. CovS/CovR of group B *Streptococcus*: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol Microbiol.* déc 2004;54(5):1250-68.
61. Green MR, Sambrook J. Isolation of high-molecular-weight DNA using organic solvents. *Cold Spring Harb Protoc.* 3 avr 2017;2017(4):pdb.prot093450.
62. Ricci ML, Manganelli R, Berneri C, Orefici G, Pozzi G. Electrotransformation of *Streptococcus agalactiae* with plasmid DNA. *FEMS Microbiol Lett.* 1 juin 1994;119(1-2):47-52.
63. Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 11 juill 1988;16(13):6127-45.
64. Poyart C, Trieu-Cuot P. A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to beta-galactosidase in gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 15 nov 1997;156(2):193-8.
65. Biswas I, Gruss A, Ehrlich SD, Maguin E. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J Bacteriol.* juin 1993;175(11):3628-35.
66. Miller JH, Miller JB. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory; 1972. 494 p.
67. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 15 août 1970;227(5259):680-5.
68. Lancefield RC, McCarty M, Everly WN. Multiple mouse-protective antibodies directed against group B *Streptococci*. Special reference to antibodies effective against protein antigens. *J Exp Med.* 1 juill 1975;142(1):165-79.
69. Martin TR, Rubens CE, Wilson CB. Lung antibacterial defense mechanisms in infant and adult rats: implications for the pathogenesis of group B Streptococcal infections in the neonatal lung. *J Infect Dis.* janv 1988;157(1):91-100.
70. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 11 oct 2011;7:539.
71. Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol.* avr 2019;37(4):420-3.
72. Goldberg T, Hecht M, Hamp T, Karl T, Yachdav G, Ahmed N, et al. LocTree3 prediction of localization. *Nucleic Acids Res.* juill 2014;42(Web Server issue):W350-355.
73. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* 19 janv 2001;305(3):567-80.

74. Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Ishiguro-Watanabe M, Tanabe M. KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Res.* 8 janv 2021;49(D1):D545-51.
75. Pastuszka A, Beauruelle C, Camiade E, Rousseau GM, Moineau S, Mereghetti L, et al. Functional study of the type II-A CRISPR-Cas system of *Streptococcus agalactiae* hypervirulent strains. *CRISPR J.* avr 2021;4(2):233-42.
76. Wolf YI, Koonin EV. Genome reduction as the dominant mode of evolution. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* sept 2013;35(9):829-37.
77. Bowman L, Palmer T. The type VII secretion system of *Staphylococcus*. *Annu Rev Microbiol.* 3 août 2021;

Annexe 1 - Souches bactériennes et plasmides utilisés pour cette étude

Souche ou plasmide	Génotype ou Description	Source ou référence
<u>Souche <i>E. coli</i></u>		
XL1 blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(rk ⁻ mk ⁺)	Stratagene
<u>Souches <i>S. agalactiae</i></u>		
A909 (WT)	Sérotype Ia, ST7, isolé en 1934 d'un nouveau-né septicémique	Lancefield <i>et al.</i> , 1975
NEM316 (WT)	Sérotype III, ST23, isolé d'un nouveau-né septicémique	Glaser <i>et al.</i> , 2002
COH1 (WT)	Sérotype III, ST17, isolé d'un nouveau-né septicémique	Martin <i>et al.</i> , 1988
A909<i>esxA2-flag</i>	Mutant A909 avec insertion au <i>locus</i> chromosomique d'une étiquette 3xflag en aval du gène <i>esxA2</i>	Cette étude
A909<i>esxC-flag</i>	Mutant A909 avec insertion au <i>locus</i> chromosomique d'une étiquette 3xflag en aval du gène <i>esxC</i>	Cette étude
A909<i>esxA-flag</i>	Mutant A909 avec insertion au <i>locus</i> chromosomique d'une étiquette 3xflag en aval du gène <i>esxA</i>	Cette étude
A909<i>essC-flag</i>	Mutant A909 avec insertion au <i>locus</i> chromosomique d'une étiquette 3xflag en aval du gène <i>essC</i>	Cette étude
<u>Plasmides</u>		
pTCV-<i>lac</i>	Plasmide pour la construction des fusions transcriptionnelles avec le gène rapporteur <i>lacZ</i> , Ery ^R	Poyart <i>et al.</i> , 1997
pG⁺host1^{ts}	Plasmide avec origine de réplication thermosensible ; Ery ^R	Biswas <i>et al.</i> , 1993
pTCV-<i>lac-SAK_1131-135</i>	pTCV- <i>lac</i> contenant la région de 135 pb en amont du gène <i>SAK_1131</i> de la souche A909; obtenu avec les amorces EM43/EM41	Cette étude
pTCV-<i>lac-esxA1-A909-195</i>	pTCV- <i>lac</i> contenant la région de 195 pb en amont du gène <i>esxA1</i> de la souche A909; obtenu avec les amorces EM73/RevBamHI	Cette étude
pTCV-<i>lac-esxA2-652</i>	pTCV- <i>lac</i> contenant la région de 652 pb en amont du gène <i>esxA2</i> de la souche A909; obtenu avec les amorces EM73/EM121	Cette étude
pTCV-<i>lac-esxA2-327</i>	pTCV- <i>lac</i> contenant la région de 327 pb en amont du gène <i>esxA2</i> de la souche A909; obtenu avec les amorces EM69/EM121	Cette étude
pTCV-<i>lac-esaA-A909-129</i>	pTCV- <i>lac</i> contenant la région de 129 pb en amont du gène <i>esaA</i> de la souche A909; obtenu avec les amorces EM68/EM44	Cette étude
pTCV-<i>lac-essA-581</i>	pTCV- <i>lac</i> contenant la région de 581 pb en amont du gène <i>essA</i> de la souche A909; obtenu avec les amorces EM97/EM96	Cette étude

Annexe 1 - Souches bactériennes et plasmides utilisés pour cette étude (suite)

Souche ou plasmide	Génotype ou Description	Source ou référence
pTCV-<i>lac-essC</i>-445	pTCV- <i>lac</i> contenant la région de 445 pb en amont du gène <i>essC</i> de la souche A909; obtenu avec les amorces EM99/EM98	Cette étude
pTCV-<i>lac-essC</i>-498	pTCV- <i>lac</i> contenant la région de 498 pb en amont du gène <i>essC</i> de la souche A909; obtenu avec les amorces EM101/EM100	Cette étude
pTCV-<i>lac-gbs_1076</i>-135	pTCV- <i>lac</i> contenant la région de 135 pb en amont du gène <i>gbs_1076</i> de la souche NEM316; obtenu avec les amorces EM43/EM41	Cette étude
pTCV-<i>lac-essA</i>-NEM316-195	pTCV- <i>lac</i> contenant la région de 195 pb en amont du gène <i>essA</i> de la souche NEM316; obtenu avec les amorces EM73/RevBamHI	Cette étude
pTCV-<i>lac-esaA</i>-NEM316-129	pTCV- <i>lac</i> contenant la région de 129 pb en amont du gène <i>esaA</i> de la souche NEM316; obtenu avec les amorces EM68/EM44	Cette étude

Annexe 2 - Amorces utilisées pour cette étude

Amorce	Séquence (5'-3') ^a
Fusions transcriptionnelles	
EM41	GCGCCGGATCCTTACATAATTAACCTCTTAAGTTTG
EM43	GCGCCGAATTCGATTAATCAAACGATCAAGGT
EM44	GCGCCGGATCCTTACATAATTCTTCCTAAAATAT
EM68	GCGCCGAATTCATTGAGCAGACGGATGCAG
EM69	GCGCCGAATTCGTAGCGCTTTTGATTCTT
EM73	GCGCCGAATTCCTTTACGAATTGACACGA
EM96	GCGCCGGATCCTTACATCAACAACCTCACTCTTTTAC
EM97	GCGCCGAATTCGCCCATTCACTTGGATA
EM98	GCGCCGGATCCTTACATATCCACCTACCTACTTTTAG
EM99	GCGCCGAATTCGTACGAGTTGGCCTATTCC
EM100	GCGCCGGATCCTTACATTCTCTCTCCTCTCTAGTCTATGC
EM101	GCGCCGAATTCGTGCCAGAATACAGCACC
EM121	GCGCCGGATCCTTACATTGAATACCCCTTCTTAAAT
RevBamHI	GCGCGCGGATCCTTACATAAAATTTTCTCCTTTTCTAT
Vlac1	GTTGAATAACACTTATTCCTATC
Vlac2	CTTCCACAGTAGTTCACCACC
PCR, RT-PCR et 5'RACE-PCR	
EM4	ACCAGAGGGTTGCATCAGG
EM5	ATTGAGCAGACGGATGCAG
EM6	CTGCATCCGTCTGCTCAAT
EM8	AGGCCAGCAATAGCTACT
EM14	GCAACATCCACAAGAAGT
EM20	CGCTTAAGAGATAACTGCC
EM22	GAAGATGTACTTGCTGTAG
EM25	TTACGAAGGCTATCCTGA
EM28	ACCTCGTGGTCTATATA
EM44	GCGCCGGATCCTTACATAATTCTTCCTAAAATAT
EM49	TTCATCTCAGACCTAGAG
EM50	CTCTAGGTCTGAGATGAA
EM52	ATGCCATCCTCTCTC AGG
EM53	GTAGCGCTTTTGATTCTT
EM54	AAGAATCAAAAGCGCTAC
EM55	TCTAAAGTCTCACTCCAG
EM56	CTGGAGTGAGACTTTAGA
EM57	CGCCCATCACTTGGATA
EM59	AGGTAAGTGTGCTGACTAC
EM60	GATGCTATTGATGCTGCC
EM61	TCAGGTCAGACGAGTGCC
EM62	GGCACTCGTCTGACCTGA
EM63	CCTATGTGCGTGCTGATA
EM64	CGACAGTCAAGAATCGTTG
EM65	CAACGATTCTTGACTGTCG
EM66	CTAGACTTTCACCTCCA
EM70	AGGAAGAATTATGTGAGGTTGTTGATG
EM73	GCGCCGAATTCCTTTACGAATTGACACGA
EM76	GCG CCGGATCCATGCTATCTTGATGGCGCTG
EM78	GCGCCCCATGGCACAATTAATTAAC
EM83	GATGATTCTGAGGAGTAG
EM85	CTACCTATCGTAAGATGG

Annexe 2 - Amorces utilisées pour cette étude (suite)

Amorce	Séquence (5'-3') ^a
PCR, RT-PCR et 5'RACE-PCR	
EM86	CCATCTTACGATAGGTAG
EM88	TAACCTGTAAACCACACC
EM93	TATGTGAGGTTGTTGATGTAAAGCATAGACTAGAGA
EM124	AATAATTCGCGTCTGGCC
EM125	GGTCACGTTGGTGTAGAT
EM126	ATTCAGGCTGCGCAACTGTT
Fusions traductionnelles Flag	
EM72	GCGCCG GATCC GTTGTTACTGGATGGTGCGCT
EM74	CCGTCATGGTCTTTGTAGTC TCCACTAATTTGAGAAGCAAT
EM75	AAAGATGACGACGATTAA TATCGTATCATAGTCTAT
EM81	ATCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTC
EM82	GATTATAAAGATCATGATATCGACTACAAAGATGACGACGATTAA
EM92	CGCGCG GAATTC GCTGTAACACGTGAAGCA
EM97	GCGCC GAATTC CGCCCATTCACCTGGATA
EM102	CGCGCG GATCC TCTGATATTGCTTCACAAATTG
EM103	GCGCC GAATTC CCCCCTTGGCATTAAACCTT
EM109	CGCGCG GATCC CGGCTTACACCTGATCATTG
EM110	CCGTCATGGTCTTTGTAGTC GTAAAAATACGGTTTTGGTTG
EM111	AAAGATGACGACGATTAA GAGTCTTTATGAATGATAAACAG
EM112	GCGCC GAATTC GTTTCTAATACACCTGTGGC
EM113	ACCGTCATGGTCTTTGTAGTC GTCTATGCTGAGTTTGTAGTT
EM114	AAGATGACGACGATTAA AGAGGAGAGAGAATGGCAAAAATAC
EM115	CGCGCG GATCC TTGAAGTGTTACAAGTGGCC
EM129	GTCAATGGTCTTTGTAGTC CTCTTTTACTTTAGCTTC
EM130	AAAGATGACGACGATTAA GGTTGTTGATGAAGTTGA
OPL110	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
OPL111	AGCGGATAACAATTCACACAGGA

^a Les sites de restriction sont indiqués en gras et les séquences relatives à l'étiquette 3xFlag en bleu

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) Camille PETILLON

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 : 21809432

N° Thèse : 85

Nom et Prénom : Camille Petillon

Sujet : Expression du système de sécrétion de type VIIb de *Streptococcus agalactiae*

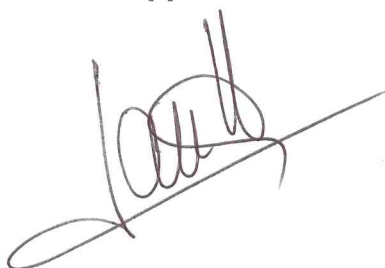
Tours, le : 8/10/2021

Le(s) Directeur(s) de Thèse :

Eric Morello

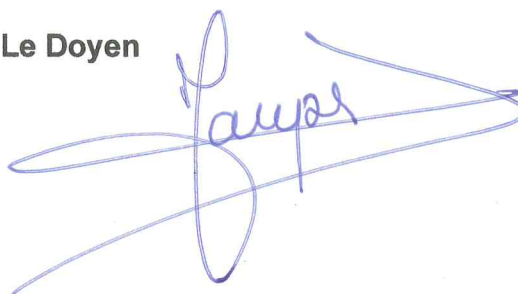


Philippe Lanotte



Vu et Transmis :

Le Doyen



PETILLON Camille

N° 85

Expression du système de sécrétion de type VIIb de *Streptococcus agalactiae*

RESUME DE LA THESE

Streptococcus agalactiae est une bactérie initialement décrite comme responsable de mammites bovines. Il a été montré ensuite que ce pathogène était capable d'infecter de nombreux autres hôtes, dont l'Humain et plus particulièrement les nouveau-nés. C'est à l'heure actuelle, l'une des premières causes de mortalité d'origine infectieuse des nourrissons. Pour survivre, se propager et induire une pathologie chez l'hôte, *S. agalactiae* met en place des mécanismes lui permettant d'interagir et de s'adapter à son environnement. Une étude transcriptomique visant à identifier des facteurs de colonisation ou d'infection de l'hôte, a montré une forte régulation des gènes codant un potentiel système de sécrétion de type VII (SST7) lorsque les bactéries sont placées dans des fluides biologiques humains. La fonction de ce système de sécrétion n'est pas connue chez *S. agalactiae* mais chez d'autres bactéries il permet de libérer des molécules actives dans l'environnement et est ainsi impliqué dans le métabolisme, la compétition inter-espèces ou la virulence.

L'objectif de cette thèse est de caractériser l'expression du système au sein de différentes souches de référence de *S. agalactiae*. Les résultats obtenus ont montré que l'organisation génétique du système est variable selon les souches de *S. agalactiae* considérées et que cette variabilité a un impact important sur la capacité de ces souches à exprimer ce système. Ce travail montre pour la première fois que *S. agalactiae* exprime plusieurs protéines appartenant au système de sécrétion de type VIIb suggérant que ce dernier pourrait également jouer un rôle dans la physiologie de la bactérie.

MOTS CLES

Streptococcus agalactiae, système de sécrétion de type VIIb, machinerie de sécrétion, effecteurs, virulence, antagonisme bactérien

JURY

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

Membres : M. le Docteur Eric MORELLO, MCU, Université de TOURS

M. le Professeur Laurent MEREGHETTI, PU-PH, Faculté de Médecine et CHRU de TOURS

Mme le Docteur Isabelle VIRLOGEUX-PAYANT, Directrice de recherche, INRAE de Nouzilly

Mme le Docteur Adeline PASTUSZKA, AHU, Faculté de Médecine et CHRU de TOURS

Soutenue publiquement le 8 octobre 2021 à la faculté de pharmacie de Tours