HAL
open science

Caractérisation des fonctions codées par les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) intégrés dans un gène codant un ARNt lysine chez Streptococcus agalactiae : rôle dans le maintien des ICE, l'adaptation et la virulence de l'hôte

Sarah Chuzeville

To cite this version:

Sarah Chuzeville. Caractérisation des fonctions codées par les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) intégrés dans un gène codant un ARNt lysine chez Streptococcus agalactiae : rôle dans le maintien des ICE, l'adaptation et la virulence de l'hôte. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0261 . tel-01749643

HAL Id: tel-01749643

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749643v1

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole doctorale RP2E (Ressources, Procédés, Produits, Environnement)
Collegium Sciences et Technologie

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention « Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystème »

par **Sarah CHUZEVILLE**

Caractérisation des fonctions codées par les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) intégrés dans un gène codant un ARNt lysine chez *Streptococcus agalactiae* : rôle dans le maintien des ICE, l'adaptation et la virulence de l'hôte

---

Le 18 décembre 2012

Membres du jury :

Rapporteurs : M. Laurent MEREGHETTI, Professeur des Universités-Praticien hospitalier, Université François-Rabelais, Tours

M. Patrick TRIEU-CUOT, Professeur à l'Institut Pasteur, Paris

Présidente du jury de thèse :

Mme Nathalie LEBLOND, Professeur des Universités, Université de Lorraine, Nancy

Examinateurs : Mme Alexandra GRUSS, Directrice de recherche, INRA, Jouy-en-Josas

Mme Sophie PAYOT LACROIX, Chargée de recherche (HDR), INRA, Nancy, **directeur de thèse**

M. Jean-Yves MADEC, Directeur de recherche, ANSES, Lyon, **co-directeur de thèse**

---

[1]Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, ANSES, 31, Avenue Tony Garnier, 69362 Lyon Cedex 07,
[2]UMR1128 Génétique et Microbiologie, INRA-Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, Boulevard des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy cedex.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en tout premier lieu Sophie Payot qui a dirigé de manière très avisée cette thèse. Je la remercie de m'avoir confié ce travail de recherche, pour sa disponibilité indéfectible et son aide ainsi que pour ses précieux conseils tout au long de ces trois années. Merci également de m'avoir fait autant évoluer dans le monde de la Recherche.

Je remercie également Jean-Yves Madec qui a co-dirigé cette thèse. Merci de m'avoir accueillie au sein de son unité et de m'avoir accordé sa confiance dans ce projet. Merci également pour sa sympathie et ses encouragements.

Un remerciement particulier va à Marisa Haenni qui a également participé fortement à l'encadrement de cette thèse. Merci pour son soutien. Merci également pour sa disponibilité, son aide et sa gentillesse constante.

Merci à Pierre Leblond, Didier Calavas et Paul Martin de m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires et fourni les moyens de réaliser cette thèse.

Je tiens à remercier Laurent Mereghetti et Patrick Trieu-Cuot qui ont accepté de rapporter mon manuscrit de thèse. Merci pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci également pour leur participation au jury de thèse.

Merci à Alexandra Gruss et Nathalie Leblond de s'être interessées à mon travail et de me faire l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Merci à Thierry Meylheuc (plateforme MIMA2 de l'INRA) et Shaynoor Dramsi (Unité de Biologie des Bactéries Pathogènes à Gram positif de l'Institut Pasteur) pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail par le biais de collaborations. Merci également à Jean-Baptiste Vincourt (plateforme de protéomique de la Fédération de Recherche FR3209) pour son aide et sa réactivité.

Merci à toute l'unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes de Lyon ainsi que toutes les autres personnes des autres unités du laboratoire de l'ANSES de Lyon qui ont contribué à rendre ce travail agréable et qui se reconnaîtront. Merci pour leur accueil, leur sympathie, leur soutien et leurs conseils.

Je pense en particulier à Pierre pour sa bonne humeur, son aide et son soutien et à Florence avec qui j'ai eu le grand plaisir de partager le bureau mais également de nombreuses discussions fructueuses.

Merci à l'ensemble du personnel de l'UMR1128 Génétique et Microbiologie de Nancy pour leur accueil et les échanges fructueux qui ont jalonné ce travail. Je remercie tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : aussi bien par les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux ou leurs contributions.

Merci particulièrement à Aurore, Emilie, Janek, Max, Manu, Nico, PV et Romain pour leurs conseils, leur aide, leur solidarité mais également de leur amitié si chère à mes yeux. Je tiens à remercier particulièrement Nico pour sa précieuse contribution.

Je tiens à remercier tout mes amis, proches et tous ceux qui se reconnaîtront qui de par leur amitié, leurs encouragements et leur soutien ont également permis de rendre ce travail possible.

Un vif remerciement va à l'ensemble de ma famille, et en particulier à mes parents et à mon frère, qui ont été pour moi d'un soutien sans faille toutes les années durant et sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Merci à vous !

Je pense aussi en particulier à Véro que je ne remercierais jamais assez d'être constamment présente pour moi, et ce malgré la distance, et d'avoir pour moi une amitié aussi fidèle et à toutes épreuves.

Je pense aussi fortement à Floriane qui a été toujours présente dans les moments difficiles et dont l'amitié m'est aussi indispensable.

Merci à Lysiane d'avoir partagé avec moi autant de moments agréables.

Je pense également, sans ordre particulier d'importance et sans que ceci ne soit une liste exhaustive, à Corinne, Saliha, Kahina, Pierrick, Elizabeth, Yoan, Gaétan, Paméla, Heber, Cemile, Carine, Yann, Franck, Natasha, Safia, Rawda, Séverine, Laëtitia, Pauline, Florent, Claire, Cyril, Stéphane, Virginie (x2), Alban, Nathalie, Vahid, Julien, Loïc, Lauriane, Marine et Youssef.

Merci à tous !

SOMMAIRE

PREAMBULE **1**

ETAT DE L'ART **5**

I. Eléments génétiques mobiles et apports de fonctions exogènes **7**
1. Le transfert horizontal 7
1.1. Le transfert horizontal, la clé de l'évolution bactérienne 7
1.2. Les mécanismes impliqués dans le transfert horizontal 9
1.2.1. La transformation 11
1.2.2. La transduction 11
1.2.3. La conjugaison 12
1.2.4. Les nanotubes 13
1.3. Les barrières au transfert horizontal 14
1.3.1. Les barrières liées au mécanisme de transfert 14
1.3.2. Acquisition, intégration et maintien de l'ADN exogène 14
1.3.3. Les systèmes CRISPR : protection contre l'ADN exogène 16
1.4. Les éléments génétiques mobiles : acteurs majeurs de l'évolution bactérienne 17
1.5. Les ICE, des partenaires incontournables du transfert horizontal 19
1.5.1. Caractéristiques des ICE, structure modulaire et dynamique évolutive 19
1.5.2. Mécanismes de transfert des ICE 20
1.5.3. Mobilisation d'ADN par les ICE 23
2. Acquisition de nouvelles fonctions adaptatives par le transfert des ICE 24
2.1. Apport de nouvelles fonctions par les ICE: un phénomène de grande ampleur 24
2.2. Importance des échanges génétiques chez les streptocoques par le biais des ICE : exemples déjà décrits 26
2.2.1. ICE*St1* et ICE*St3* de *S. thermophilus* 26
2.2.2. ICE*Sde3396* de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 27
2.2.3. Région de différence 2 (RD2) chez *S. pyogenes* 29
2.2.4. ICE*Se2* chez *S. equi* 31
2.2.5. L'ICE 89 K chez *S. suis* 31
2.2.6. ICE*Sp2905* chez *S. pyogenes* 31

II. *S. agalactiae* : un modèle d'étude des ICE chez les streptocoques **32**
1. *Streptococcus agalactiae* 32
1.1. Généralités 32
1.2.* S. agalactiae: *une bactérie pathogène chez l'Homme 34
1.2.1. Portage 34
1.2.2. Infections chez les nouveaux nés 35
1.2.3. Infections chez les adultes 36
1.3.* S. agalactiae*: une bactérie pathogène vétérinaire 36
1.4. Relations entre souches d'origine humaine et vétérinaire 37
1.5. Manifestations des infections au niveau cellulaire 38
2. Caractéristiques génomiques de *S. agalactiae* 39
***2.1. Avancées sur l'acquisition de données génomiques de* S. agalactiae** 39
***2.2. Flexibilité du génome de* S. agalactiae** 41
***2.3. Diversité des ICE chez* S. agalactiae** 43

III. Diversité des facteurs de virulence codés par le « core génome » de *S. agalactiae*. **47**
1. Prévalence et régulation des facteurs de virulence 47

1.1. Diversité des facteurs de virulence 47
1.2. Pouvoir adaptatif de **S. agalactiae** 48
2. Etape clé de l'infection : l'adhésion à l'hôte 54
2.1. Propriétés adhésives de **S. agalactiae** 54
2.1.1. Mécanisme d'adhésion et forces impliquées 54
2.1.2. Un cas particulier : la formation de biofilm 58
2.2. Diversité des protéines de surface produites par **S. agalactiae** 63
2.2.1. Généralités 63
2.2.2. Antigènes I/II 65
2.2.3. Famille Alp 67
2.2.4. Pili 68
2.2.5. Famille des protéines à séquences répétées riches en sérine (protéines Srr) 69
2.2.6. Famille des protéines à séquences répétées riches en leucine (protéines LRR) 70
2.2.7. Protéines liant la fibronectine 70
2.2.9. Protéines liant le fibrinogène 71
2.2.10. Protéines liant le plasminogène 72
2.2.11. Protéines liant les immunoglobulines 73
2.2.12. Protéines liant les protéines du complément 74
2.2.13. Protéines liant les cellules de l'hôte 74
2.3. Les sortases : acteurs de l'ancrage des protéines de surface dans la paroi bactérienne 75
3. Le facteur CAMP : une hémolysine ubiquiste chez *S. agalactiae* 79
3.1. Composition de la paroi des érythrocytes mammifères 79
3.2. Action des sphingomyélinases sur la paroi des érythrocytes 79
3.3. Description et caractérisation de la réaction synergique hémolytique induite par **S. aureus** *et* **S. agalactiae** 80
3.4. Des niches écologiques communes entre **S. aureus** *et les streptocoques* 81
3.5. Caractéristiques du facteur CAMP 81
3.6. Mécanistique du facteur CAMP 82
3.7. Présence ubiquiste d'un facteur CAMP chez **S. agalactiae** 85
3.8. Le facteur CAMP, un facteur de virulence ? 85
3.9. Présence de facteurs co-hémolytiques chez d'autres streptocoques et bactéries à coloration Gram positive 86
3.9.1. Facteur Uberis 87
3.9.2. Facteur CAMP de *S. pyogenes* 88
3.9.3. Facteur CAMP de *Propionibacterium acnes* 89
3.9.4. Réaction CAMP chez *Actinobacillus pleuropneumoniae* 90
3.9.5. Le test CAMP comme moyen d'identification d'espèces d'Aeromonas Sp. 90

OBJECTIFS DES TRAVAUX ET STRATEGIE MISE EN PLACE **91**

MATERIEL ET METHODES **97**

I. Souches et conditions de croissance **99**

II. Manipulations génétiques, biochimiques et de biologie moléculaire **104**
1. Extraction d'ADN 104
1.1. ADN génomique 104
1.2. ADN plasmidique 105
2. Réactions d'amplifications en chaine par polymérase 105

2.1. PCR standards et séquençage 105
2.2. PCR long range et PCR nichées 106
3. Etude de l'expression des gènes d'intérêt par RT-PCR 109
4. Electroporation des bactéries 109
4.1. Electroporation des bactéries à coloration Gram négative 109
4.2. Electroporation des bactéries à coloration Gram positive 110
5. Stratégie développée pour la mutagénèse chez *S. agalactiae* 111
5.1. Construction des plasmides pUC19 contenant les cassettes d'interruption 112
5.2. Construction des plasmides pG+host9 contenant les cassettes d'interruption 113
5.3. Mutagenèse chez S. agalactiae 113
6. Marquage des ICE et construction du transconjugant NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}). 116
7. Construction des plasmides pOri23-camp^{515} et pOri23-SAL_2056 117
8. Analyse des surnageants par SDS-PAGE 118
9. Spectrométrie de masse sur des surnageants précipités 119

III. Analyses phénotypiques **120**
1. Analyse *in silico* et recherche de fonctions putatives des gènes d'intérêt 120
2. Test de résistance au stress oxydant 120
3. Analyse des propriétés antimicrobiennes 121
4. Mesure de l'activité co-hémolytique 121
4.1. Test CAMP 121
4.2. Suivi hémolytique de la réaction synergique CAMP 122
5. Analyse des propriétés adhésives 123
5.1. Etude de la formation de biofilm sur polystyrène 123
5.2. Etude de l'architecture des biofilms par microscopie confocale 124
5.3. Etude de l'adhésion à des protéines salivaires 125
5.3.1. Collecte de salive 125
5.3.2. Test d'adhésion aux protéines salivaires 125
5.4. Test d'adhésion à des protéines humaines 126
6. Analyse statistique des données 127

RESULTATS **129**

I. Analyse *in silico* des fonctions putatives portées par ICE_*515_tRNA*^{Lys} **132**
1. Système de maintien de l'ICE 132
2. Réponse au stress oxydant 136
2.1. Protéine de type NRAMP 136
2.2. Glutarédoxine 137
3. Signalisation / compétition 138
4. Protéines de surface codées par ICE_*515_tRNA*^{Lys} 140
4.1. Identification des protéines de surface **in silico** 140
4.2. Prévalence et fonctions de ces protéines chez les streptocoques 141
*4.3. Domaines fonctionnels des protéines de surface codées par ICE*_**515_tRNA^{Lys}.** 143
5. Propriétés hémolytiques 147

II. Analyse de l'expression des gènes d'intérêt **149**
1. Analyse des régions promotrices 149
2. Analyse de la fonctionnalité des promoteurs 151

III. Fonctions impliquées dans l'adaptation des souches **153**

1. **Adaptation face à un stress oxydant** 153
2. **Bactériocine** 155
3. **Système toxine/antitoxine** 156

IV. Propriétés d'adhésion conférées par *ICE_515_tRNA^{Lys}* aux souches bactériennes **157**
1. **Implication d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* dans la capacité d'adhésion des souches.** 157
1.1. Implication dans la formation de biofilm. 157
1.1.1. Implication dans la biomasse des biofilms formés 157
1.1.2. Implication dans l'architecture des biofilms 158
1.2. Implication dans l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire. 161
1.2.1. Adhésion au fibrinogène 161
1.2.2. Adhésion à la fibronectine 162
1.3. Implication dans l'adhésion à une agglutinine. 163
2. **Implication spécifique de l'antigène I/II SAL_2056 dans l'adhésion.** 164
2.1. Implication de SAL_2056 dans la formation de biofilm 165
2.2. Implication de SAL_2056 dans l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire 167
2.2.1. Adhésion au fibrinogène 167
2.2.2. Adhésion à la fibronectine 168
2.3. Implication dans l'adhésion aux protéines salivaires 169

V. Propriétés hémolytiques conférées par ICE_*515_tRNA^{Lys}* aux souches **172**
1. **Production du facteur CAMP II par ICE_*515_tRNA^{Lys}* *chez* S. agalactiae** 172
2. **Sécrétion du facteur CAMP II chez *S. agalactiae*** 175
3. **Fonctions hémolytiques conférées par le facteur CAMP II à des souches non pathogènes** 177

VI. Dissémination des fonctions codées par les ICE de la famille d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* **181**
1. **Transmission de fonctions codées par les ICE de la famille d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* à *S. uberis*** 181
2. **Recherche de réaction synergique type CAMP II chez des souches de streptocoques d'origine vétérinaire** 185
3. **Détection du gène codant le facteur CAMP II chez les souches de terrain** 187
4. **Fonctionnalité du facteur CAMP II chez des streptocoques de terrain** 188
5. **Présence d'éléments intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARNt Lysine chez les souches de terrain CAMP positives** 190
*5.1. Recherche de l'intégrase des ICE de la famille d'ICE_*515_tRNA^{Lys} 190
*5.2. Recherche du site de recombinaison droit (*attR*) des ICE de la famille d'ICE_*515_tRNA^{Lys} 192
6. **Corrélation entre la présence du gène codant le facteur CAMP II et la présence d'ICE ou d'éléments similaires chez les souches de terrain** 196
7. **Recherche d'autres fonctions disséminées par ICE_*515_tRNA^{Lys}* chez les streptocoques** 197

DISCUSSION ET PERSPECTIVES **199**

I. ICE_*515_tRNA^{Lys}*, vecteur de virulence ? **201**
1. **Rôle des protéines de surface codées par ICE_*515_tRNA^{Lys}*** 201
*1.1. Présence de plusieurs gènes portés par ICE_*515_tRNA^{Lys} *codant des protéines de surface* 201
*1.2. Répartition des gènes d'ICE_*515_tRNA^{Lys} *codant des protéines de surface chez les autres souches de* S. agalactiae 202
*1.3. Rôle d'ICE_*515_tRNA^{Lys} *et SAL_2056 dans l'agrégation cellulaire ?* 202
*1.4. ICE_*515_tRNA^{Lys} *et l'adhésion à des composants de la matrice extracellulaire* 203
*1.5. Rôle des autres protéines de surface codées par ICE_*515_tRNA^{Lys} *: implication dans l'adhésion et le transfert conjugatif?* 206

2. ICE_*515_tRNA*^{Lys} et compétitivité de *S. agalactiae* 207
2.1. Survie face à un stress oxydant 207
2.2. Compétition inter-espèces 208
2.3. Survie en biofilm 210
3. Le facteur CAMP II : un nouveau facteur co-hémolytique 211
3.1. Le facteur CAMP II, un facteur de virulence ? 211
3.2. Lien entre l'isolement et la dissémination de gènes codant les facteurs CAMP 214
3.3. Le facteur CAMP comme moyen d'identification de S. agalactiae *?* 216

II. ICE_*515_tRNA*^{Lys}, élément clé dans la dissémination de fonctions chez les streptocoques 218
1. Importance des échanges de matériel génétique entre streptocoques : ICE_*515_tRNA*^{Lys}, un partenaire important. 218
*1.1. Ubiquité d'ICE*_515_tRNA^{Lys} *chez* S. agalactiae *et dynamisme génomique* 218
*1.2. Dissémination des fonctions d'ICE*_515_tRNA^{Lys} *parmi différentes espèces de bactéries* 220
*1.3. Mode de transfert d'ICE*_515_tRNA^{Lys} 222
2. Les barrières au transfert d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} 223

CONCLUSION ET PERSPECTIVES GENERALES 229

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 233

ANNEXES 261

I. Liste des communications 263

II. Article PlosOne 265

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique des mécanismes impliqués dans le transfert d'ADN.

Figure 2. Nanotubes entre cellules voisines appartenant à la même espèce ou à différentes espèces.

Figure 3. Schéma du processus de transfert par conjugaison d'un ICE d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse.

Figure 4. Carte présentant le pourcentage d'identité de gènes présents chez diverses souches de streptocoques par rapport aux gènes portés par ICE*Sde3396* de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* en utilisant BLASTP.

Figure 5. Arbre phylogénétique chez les streptocoques basé sur la comparaison des séquences du gène codant l'ARN ribosomique 16S.

Figure 6. Etapes d'infection de *S. agalactiae* chez les nouveaux nés.

Figure 7. Alignement des pan génomes des souches de *S. agalactiae* d'origine humaine séquencées.

Figure 8. Carte génomique indiquant les positions des ICE ou éléments en dérivant chez les 8 souches séquencées de *S. agalactiae.*

Figure 9. Schéma représentant la diversité et la plasticité des éléments intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARNt Lysine chez 7 des souches séquencées de *S. agalactiae.*

Figure 10. Profil d'hybridation sur puce à ADN de l'ADN génomique de 36 isolats bovins et humains de *Streptococcus agalactiae*.

Figure 11. Etapes des infections par *S. agalactiae* chez les nouveaux nés au niveau moléculaire et cellulaire.

Figure 12. Régulation des facteurs de virulence importants pour la virulence de *S. agalactiae.*

Figure 13. Exemples d'interactions streptocoques / hôte.

Figure 14. Structure de l'enveloppe des bactéries à coloration Gram positive (ex de *Bacillus cereus* et *B. anthracis*).

Figure 15. Schéma représentant le modèle en deux étapes de l'adhésion des streptocoques à des substrats.

Figure 16. Analyse morphologique des biofilms de *S. agalactiae* par microscopie électronique à transmission.

Figure 17. Schéma modélisant le développement d'un biofilm bactérien.

Figure 18. Identité de séquences entre des protéines appartenant à la famille des antigènes I/II chez les streptocoques.

Figure 19. Arbre phylogénétique des six classes de sortases des bactéries à coloration Gram positive.

Figure 20. Rôle de la sortase A dans l'ancrage des protéines à la paroi cellulaire des bactéries à coloration Gram positive.

Figure 21. Lyse d'érythrocytes de mouton par le facteur CAMP dans différentes conditions.

Figure 22. Visualisation par microscopie électronique des pores formés dans la membrane d'érythrocytes de moutons sous l'action du facteur CAMP.

Figure 23. Test CAMP sur gélose au sang de *S. uberis* et des transformants d'*E. coli* exprimant le facteur Uberis.

Figure 24. Alignement de séquences de différents facteurs CAMP.

Figure 25. Analys de l'activité co-hémolytique de *P. acnes* sauvage et de deux souches mutantes Δ*camp2* et Δ*camp4*.

Figure 26. Représentation schématique des différentes étapes de la construction d'un mutant chez *S. agalactiae*.

Figure 27. Schéma de la réalisation d'un test CAMP.

Figure 28. Représentation schématique de l'élément ICE_*515_tRNA*^{Lys} de *S. agalactiae* 515.

Figure 29. Représentation de l'opéron *yyFGHIJ* de *B. subtilis* et pourcentages d'identité de séquence avec l'opéron présent chez *S. agalactiae.*

Figure 30. Séquence de la protéine SAL_2056 et schématisation des domaines fonctionnels importants.

Figure 31. Domaines conservés de la protéine SAL_2057.

Figure 32. Comparaison des facteurs de streptocoques avec le facteur CAMP II de *S. agalactiae*.

Figure 33. Promoteurs putatifs des gènes d'intérêt situés sur ICE_*515_tRNA*^{Lys}.

Figure 34. Analyse de l'expression des gènes d'intérêt d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} par RT-PCR.

Figure 35. Taux de survie face à un stress oxydant d'une souche de *S. agalactiae* ayant acquis ICE_*515_tRNA*^{Lys}.

Figure 36. Test antimicrobien en utilisant différentes souches de *S. agalactiae.*

Figure 37. Evaluation de l'implication dans la formation de biofilm d'ICE_*515_tRNA*^{Lys}.

Figure 38. Observation par microscopie confocale à balayage des biofilms formés par *S. agalactiae*.

Figure 39. Evaluation de l'implication d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} dans l'adhésion au fibrinogène.

Figure 40. Evaluation de l'implication d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} dans l'adhésion à la fibronectine.

Figure 41. Evaluation de l'implication d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} dans l'adhésion à de la salive clarifiée.

Figure 42. Evaluation de l'implication dans la formation de biofilm de SAL_2056.

Figure 43. Evaluation de l'implication de SAL_2056 dans l'adhésion au fibrinogène.

Figure 44. Evaluation de l'implication de SAL_2056 dans l'adhésion à la fibronectine.

Figure 45. Evaluation de l'implication de SAL_2056 dans l'adhésion à de la salive clarifiée.

Figure 46. Test CAMP sur les souches de *S. agalactiae.*

Figure 47. Mesure de l'activité co-hémolytique du (des) facteur(s) CAMP chez *S. agalactiae*.

Figure 48. Séparation électrophorétique des protéines sécrétées des souches de *S. agalactiae* par SDS-PAGE.

Figure 49. Analyse de l'expression de SAL_2074 par le vecteur pOri23 chez *L. lactis.*

Figure 50. Test CAMP à partir des souches de *Lactococcus lactis* exprimant ou non le facteur CAMP II.

Figure 51. Mesure de l'activité co-hémolytique du facteur CAMP II chez *L. lactis*.

Figure 52. Schéma de l'élément intégré à l'extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Lys} chez *S. uberis* 19608.

Figure 53. Origine des isolements en France des streptocoques présentant une réaction synergique co-hémolytique de type CAMP.

Figure 54. Expression du facteur CAMP II chez des streptocoques pathogènes.

Figure 55. Emplacement sur ICE_*515_tRNA*^{Lys} des amorces utilisées dans la détection des sites de recombinaison *attR* des éléments intégrés chez les souches de terrain, des PCR « long range » et des PCR nichées.

Figure 56. Alignement avec le site *attR* d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} des séquences des sites *attR* présents à l'extrémité 3' des gènes codant des ARNt Lysine chez les souches de streptocoques isolés du RESAPATH présentant un phénotype CAMP positif.

Liste des tableaux

Tableau 1. Exemples de gènes codant des fonctions avantageuses acquis par des bactéries par transfert horizontal et intégrés au niveau d'un gène codant un ARNt.

Tableau 2. Répartition des sérotypes capsulaires de *S. agalactiae* en fonction du lieu, des années d'isolement et des patients.

Tableau 3. Sérotypes capsulaires, complexes clonaux et numéros d'accession des souches séquencées de *S. agalactiae*.

Tableau 4. Protéines de surface impliquées dans l'adhésion aux composants de l'hôte déjà décrites chez *S. agalactiae*.

Tableau 5. Listes des souches et des plasmides utilisés.

Tableau 6. Liste des amorces utilisées.

Tableau 7. Caractéristiques de systèmes toxine-antitoxine par rapport aux protéines SAL_2044 et SAL_2045.

Tableau 8. Caractéristiques d'homologues des protéines de surface codées par ICE_*515_tRNA*^{Lys}.

Tableau 9. Gènes codant les protéines de la famille ESAT-6 chez des souches séquencées de *S. agalactiae.*

Tableau 10. Résultats des amplifications par polymérase en chaine obtenus en vue de l'évaluation de la dissémination des fonctions conférées par ICE_*515_tRNA*^{Lys}.

Tableau 11. Identité de séquences entre les sites de recombinaison *attR* des souches de terrain et celui d'ICE_*515_tRNA*^{Lys}.

Liste des abréviations

µF : microfarad

µg : microgramme

µl : microlitre

aa : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire résultant de la rétro-transcription d'un ARN

ADNg : ADN génomique

ARN : acide ribonucléique

ARNt : ARN de transfert

attL : site de recombinaison *att* gauche (Left)

attR : site de recombinaison *att* droit (Right)

BHI : milieu de culture cœur-cerveau (Brain Hearth Infusion)

CAMP : Christie Atkins Munch Peterson

CIME : élément intégratif mobilisable en *cis* (Cis Mobilizable Element)

DO : densité optique

h : heure

CRISPR : ensemble de répétitions palindromiques de petite taille régulièrement espacées (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

GTA : agent de transfert de gènes (Gene Transfer Agent)

Hfr : haute fréquence de recombinaison (High Frequency of Recombination)

ICE : élément intégratif et conjugatif (Integrative and Conjugative Element)

Ig : Immunoglubuline

IME : élément intégratif mobilisable en *trans* (Integrative Mobilizable Element)

Kb : kilobase

kDa : kiloDalton

M : mole par litre

Mb : mégabase

MCD : Milieu Chimiquement Défini

ml : millitre

min : minute

MLST : Multi Locus Sequencing Typing

ng : nanogramme

nm : nanomètre

oriT : origine de transfert permettant l'initiation de la conjugaison d'un élément génétique mobile

pb : paire de bases

PBS : tampon phosphate saline

PCR : réaction de polymérisation en chaine

pI : point isoélectrique

rbs : site de fixation ribosomique

RESAPATH : Réseau national d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales en France

rpm : tour par minute

RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR

SDS-PAGE : gel de sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide

Tm : température d'hybridation

U : unité

V : volt

PREAMBULE

Depuis l'Antiquité, la théorie de la génération spontanée développée par Aristote prédominait. Cette théorie voulait que de la matière inerte pouvait spontanément donner naissance à un organisme vivant. Avant l'apparition des premiers microscopes, l'existence d'êtres vivants invisibles à l'œil nu était peu soupçonnée. Malgré l'observation des premiers microorganismes au microscope, la théorie de la génération spontanée fut encore soutenue pendant longtemps. L'abbé Lazzaro Spallanzani (1729-1799) fut l'un des premiers savants à remettre en cause expérimentalement cette théorie.

Près d'un siècle plus tard, Robert Koch (1843-1910), l'un des fondateurs de la bactériologie, énonça les postulats de Koch qui sont, selon lui, nécessaires pour établir un lien entre une maladie et un microorganisme. Ce lien doit être soutenu par le fait que le microorganisme doit être présent dans tous les organismes malades et absent des organismes sains, qu'il doit être cultivé en culture pure à l'extérieur des organismes malades, qu'un organisme sain inoculé avec cette culture pure doit développer la maladie avec tous ses symptômes et enfin que le microorganisme isolé de cet organisme doit être identique à celui précédemment isolé.

Soutenu par des travaux d'autres savants et notamment ceux du médecin allemand Robert Koch, Louis Pasteur (1822-1895) était convaincu qu'aucun microorganisme ne pouvait être présent dans un milieu sans y avoir été apporté au préalable et réfutait la théorie de la génération spontanée. Il parvint à mettre fin à la controverse au niveau de l'Académie des sciences et plaça les vraies bases de la microbiologie, mis en évidence l'implication des microorganismes dans la propagation de maladies infectieuses et mis au point des vaccins contre plusieurs microorganismes. Ces travaux permirent d'ouvrir la voie à la pratique de l'asepsie dans les milieux de la santé et de l'agro-alimentaire.

En 1928, Alexander Fleming (1881-1955) fut le chercheur qui a découvert le premier antibiotique décrit, la pénicilline. Les antibiotiques ont permis pendant longtemps de fournir un traitement efficace contre de nombreuses infections bactériennes. Néanmoins, l'utilisation des antibiotiques a conduit très rapidement à l'émergence de résistances chez les bactéries selon un processus accéléré de l'évolution tel que décrit par Charles Darwin. En effet, trois années seulement après l'introduction de l'utilisation de la pénicilline G à titre

sanitaire, des résistances aux antibiotiques par les bactéries ont été observées. L'apport de la génétique et de la biologie moléculaire ont permis de définir les bases moléculaires de cette résistance et des mécanismes impliqués dans le transfert rapide de ces fonctions adaptatives chez les bactéries. Le transfert horizontal de gènes entre bactéries non descendantes est le mécanisme par lequel les bactéries peuvent acquérir très rapidement l'information génétique pouvant être essentielle à leur survie. Actuellement, le phénomène d'apparition constant de mécanismes de résistance par les bactéries suite à l'utilisation de nouveaux antibiotiques constitue l'un des enjeux sanitaires humains et vétérinaires prioritaire mondial. L'avenir d'une antibiothérapie efficace repose alors sur une utilisation raisonnée des antibiotiques mais également sur la recherche de nouvelles cibles bactériennes et molécules pharmacologiques associées. Des crises sanitaires actuelles, notamment celle de 2003 due au coronavirus SRAS (Syndrome Respiratoire Aigu Sévère) et celle de 2011 due à la souche *E. coli* O104-H4, sont provoquées par des agents microbiens considérés jusque-là comme ayant un pouvoir pathogène limité ou ne provoquant pas d'épidémies. Ceci souligne également la nécessité d'approfondir nos connaissances actuelles sur l'acquisition par les microorganismes de nouvelles fonctions pouvant modifier leur pouvoir pathogène ou conduire à l'émergence d'un nouveau pathogène et de mettre en place de nouvelles stratégies prophylactiques et thérapeutiques.

ETAT DE L'ART

I. Eléments génétiques mobiles et apports de fonctions exogènes

1. Le transfert horizontal

1.1. Le transfert horizontal, la clé de l'évolution bactérienne

Le transfert horizontal correspond à l'acquisition d'information génétique provenant d'un organisme pouvant être éloigné phylogénétiquement, sans en être le descendant direct, par opposition au transfert vertical qui correspond à l'héritage de l'ensemble de l'information génétique de la cellule mère. Chez les bactéries, ce phénomène constitue un mécanisme rapide d'évolution et d'innovation génomique permettant d'acquérir des fonctions adaptatives et peut être impliqué dans la spéciation [71, 90, 100, 148, 215, 408].

La dissémination des gènes de résistance parmi la population bactérienne est l'exemple le plus connu d'acquisition rapide d'ADN exogène par les bactéries [417]. Les bactéries ont également la capacité d'acquérir par transfert horizontal des fonctions leur permettant de métaboliser de nouveaux nutriments, de dégrader des polluants ou encore d'acquérir de nouveaux facteurs de virulence (Tableau 1) [137]. Il a été montré que 18% du génome de *E. coli* avait été ainsi acquis par transfert horizontal durant les 100 derniers millions d'années, permettant à cette espèce de coloniser de nouvelles niches écologiques [228]. Un concept plus large voudrait que le transfert horizontal offre aux bactéries une capacité illimitée à s'adapter aux modifications de leur environnement et d'en changer [98, 290].

Tableau 1. Exemples de gènes codant des fonctions avantageuses acquis par des bactéries par transfert horizontal et intégrés au niveau d'un gène codant un ARNt (tiré de [290]).

Locus ARNt	Organisme	ADN acquis horizontalement	Trait phénotypique	Taille (kb)
selC	*Escherichia coli*	Phage θR73	Génome de phage	13
selC	*E. coli* uropathogène	PAI-1	Hémolysine	70
selC	*E. coli* entéropathogène	LEE	Système de sécrétion de type III, intimine, récepteur de protéine Tir	35
selC	*Salmonella enterica*	SPI-3	Protéine de survie aux macrophages MgtC, transporteur de Mg^{2+} MgtB	17
selC	*Shigella flexneri*	SHI-2	Transport d'ion aérobactine	24
leuX	*E. coli* uropathogène	PAI-2	Hémolysine, fimbriae	190
leuX	*E. coli*	Phage P4	Génome de phage	
Leu	*Haemophilus influenzae*	Phage HPI	Génome de phage	
Leu	*E. coli* uropathogène	PAI-5	Hémolysine, fimbriae, facteur de type 1 nécrosant et cytotoxique	110
pheV	*E. coli* uropathogène	PAI-4	Hémolysine, fimbriae	170
pheV	*E. coli*	CTn*scr94*	Utilisation du sucrose	100
pheV	*Mesorhizobium loti*	Ilôt symbiotique	Fixation de l'azote et nodulation	500
asnT	*Yersinia enterocolitica*	HPI	Yersiniabactine	45
asnT	*Y. pseudotuberculosis*	HPI		
valV	*S. enterica*	SPI-2	Système de sécrétion de type III	40
serT	*S. enterica*	SPI-5	Phosphatase phosphate inositol	7
serV	*Dichelobacter nodosus*	Region *vap*	Toxine putative	12
metV	*E. coli* uropathogène		Hémolysine	50
ssrA	*D. nodosus*	Région *vrt*		27
ssrA	*Vibrio cholerae*	VP1	Facteur de colonisation TcpA et récepteur du phage CTX	45
Thr	*S. enterica*	Phage P22	Génome phagique	44
Thr	*Listeria ivanovi*	Région *inl*	Internalines C et D	5
Arg	*Corynebacterium diphtheriae*	Corynephages	Génome phagique, toxine	36
glyV	*Pseudomonas sp.*	Elément *clc*	Dégradation du chlorocatéchol	105

Le génome bactérien complet ou « pan » génome peut ainsi être décomposé en « core » génome qui contient les informations génétiques vitales pour la fonction cellulaire et en génome « flexible », acquis par transfert horizontal et qui contient des informations génétiques supplémentaires permettant le plus souvent d'augmenter la valeur sélective de l'hôte [98]. Les régions génomiques appartenant au génome flexible peuvent être détectées *in silico* puisqu'elles présentent des caractéristiques telles qu'un pourcentage en G+C et une utilisation des codons qui divergent de ceux du « core » génome et peuvent être comprises entre des séquences d'ADN répétées [98].

Initialement, le séquençage était une technique coûteuse donc son utilisation était limitée. Le séquençage à haut débit, devenu depuis quelques années beaucoup plus abordable, permet d'accéder à un nombre de séquences de génomes bactériens croissant. Le développement de cette technique a révolutionné la recherche fondamentale et appliquée en ce qui concerne la connaissance des bactéries d'intérêt. Il a permis notamment de promouvoir le développement de mise au point de vaccins. Le séquençage à haut débit a également permis d'améliorer la détection des évènements de transfert horizontal de gènes par le développement de la génomique comparée de souches. En effet, la détection de régions génomiques acquises par transfert horizontal est rendue possible par la comparaison du génome de différentes souches d'une même espèce. Par conséquent, avec les connaissances actuelles en ce qui concerne le transfert horizontal, le séquençage d'une seule souche bactérienne par espèce paraît obsolète pour une interprétation générale des mécanismes étudiés [400].

1.2. Les mécanismes impliqués dans le transfert horizontal

Les trois mécanismes de transfert horizontal habituellement décrits sont la transformation naturelle, la transduction et la conjugaison entre une bactérie donneuse et une bactérie receveuse (Figure 1). Récemment, un autre mode de transfert horizontal par le biais de prolongements cytoplasmiques, également appelés nanotubes, a été mis en évidence chez les bactéries.

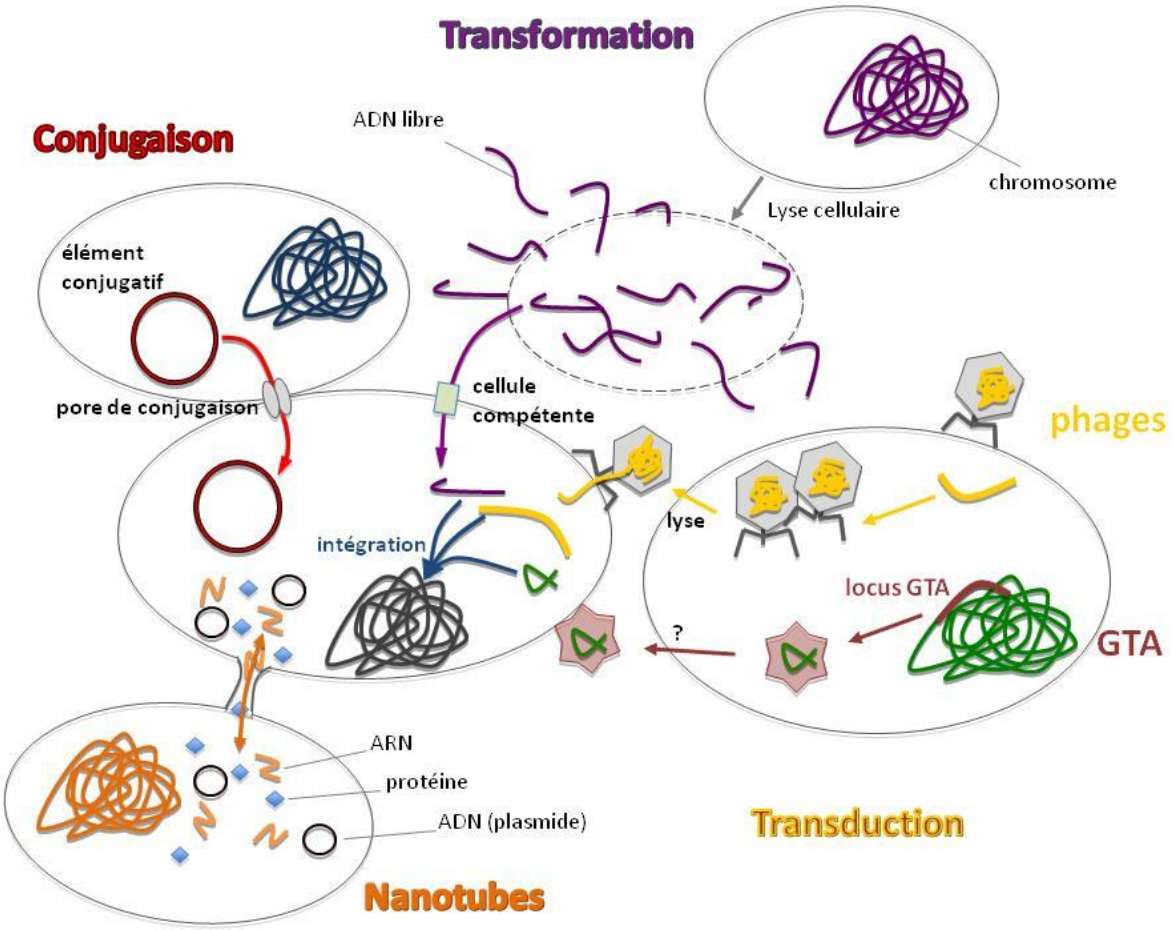


Figure 1. Représentation schématique des mécanismes impliqués dans le transfert d'ADN (tiré de [60]).

Les principales étapes des différents mécanismes impliqués dans le transfert de séquences d'ADN sont illustrées. La transduction correspond au transfert d'ADN d'une cellule à l'autre par une capside codée par un bactériophage virulent, un bactériophage tempéré ou par les systèmes de type GTA (Gene Transfer Agent). La conjugaison permet le passage d'une molécule d'ADN d'une cellule à une autre au travers d'un pore de conjugaison reliant deux cellules. La transformation d'une cellule compétente implique l'internalisation active de fragments d'ADN libres. Les nanotubes permettent le passage d'ARN et de protéines mais également de molécules d'ADN comme les plasmides d'une cellule à une autre.

1.2.1. La transformation

La transformation naturelle correspond à l'acquisition d'ADN exogène sous forme libre dans le milieu extracellulaire par une bactérie et à son incorporation dans le réplicon de la cellule bactérienne compétente (Figure 1) [247]. Les bactéries peuvent se trouver dans un état physiologique dit de compétence, dans lequel elles sont capables d'internaliser de l'ADN dans l'environnement suite à la lyse cellulaire ou à la sécrétion active d'ADN [163, 247]. La transformation implique une machinerie d'acquisition d'ADN qui comprend des protéines impliquées dans l'assemblage des pili de type IV et des systèmes de sécrétion de type II [67]. Chez *Streptococcus pneumoniae*, la compétence est induite par un mécanisme de communication cellulaire appelé quorum sensing, lequel implique une phéromone correspondant à un peptide de 17 acides aminés [168]. Le peptide est produit sous une forme non active, maturé et exporté par un système de sécrétion de type ABC. Un système à deux composants détecte la présence de la phéromone et entraîne l'activation de la machinerie permettant la compétence chez *S. pneumoniae*. Des orthologues d'éléments de cette machinerie de compétence pouvant également être impliqués dans la transformation naturelle ont été mis en évidence dans tous les génomes des streptocoques séquencés, dont *Streptococcus agalactiae* [146, 262]. D'autre part, la microbiologie fondamentale a tiré profit de cette capacité naturelle bactérienne pour en faire un outil de biologie moléculaire très efficace.

1.2.2. La transduction

La transduction correspond à l'acquisition d'ADN par les bactéries par l'intermédiaire d'un bactériophage. Les bactériophages représentent des éléments majeurs dans la composition de la biosphère [214]. La plupart de ces virus sont tempérés et leur style de développement leur permet de cohabiter avec leur hôte. La majorité des bactériophages sont intégrés sous forme de prophage dans un réplicon bactérien. Pratiquement tous les génomes bactériens, quels que soit leur origine environnementale, contiennent au moins un prophage ou ses vestiges. La quantité d'ADN d'origine virale peut représenter jusqu'à 20% du génome bactérien [65]. La structure génétique des phages est composée de modules

fonctionnels dans lesquels sont regroupés un ensemble de gènes impliqués dans une même fonction [214]. L'intégration du phage dans le génome bactérien peut avoir des répercussions sur l'évolution bactérienne puisque, lors de l'excision et de l'encapsidation du virus, des fragments d'ADN de l'hôte peuvent être emportés aléatoirement et être transférés vers d'autres cellules bactériennes par le mécanisme de transfert horizontal dit de transduction (Figure 1) [387, 443].

Chez les protéobactéries, un nouveau mode de transfert horizontal par transduction a été mis en évidence. Celui-ci n'implique pas de phages mais s'effectue via la production d'une structure semblable aux capsides virales appelée GTA (pour Gene Transfer Agent). Des fragments aléatoires d'ADN bactérien sont transportés via la capside et peuvent être transférés à d'autres cellules bactériennes [23, 222, 261, 269].

1.2.3. La conjugaison

La conjugaison correspond au mécanisme qui permet l'échange d'ADN entre deux bactéries de manière directe. Les partenaires du transfert par conjugaison sont les plasmides conjugatifs et les éléments intégratifs et conjugatifs (parfois appelés transposons conjugatifs). Le transfert conjugatif nécessite un contact physique entre deux bactéries par le biais de protéines de surface ou par d'autres mécanismes. Les éléments conjugatifs codent des protéines permettant la formation d'un pore de conjugaison, un système de sécrétion de type IV, par lequel l'ADN de l'élément mobile est transféré d'une cellule donneuse vers une bactérie receveuse (Figure 1) [198]. Pour la majorité des éléments conjugatifs, le transfert s'effectue sous forme simple brin et est associé à une réplication en cercle roulant [66, 373].

Un complexe nucléoprotéique appelé relaxosome composé d'une relaxase et d'autres protéines associées permet l'initiation de la conjugaison au niveau d'une séquence spécifique appelée origine de transfert (*oriT*). La relaxase reconnaît l'*oriT* de l'élément mobile sous forme double brin et provoque la coupure de l'ADN à ce site, entraînant la réplication intercellulaire de l'élément, son transfert sous forme simple brin, et la ligation finale permettant de reconstituer l'élément sous forme circulaire [136, 373].

1.2.4. Les nanotubes

Une étude récente a mis en évidence un nouveau mécanisme de communication cellulaire entre bactéries impliquant des prolongements cytoplasmiques, également appelés nanotubes, qui pourraient permettre le passage d'ADN d'une bactérie à une autre et ainsi constituer de nouveaux acteurs impliqués dans le transfert horizontal (Figures 1 et 2) [107].

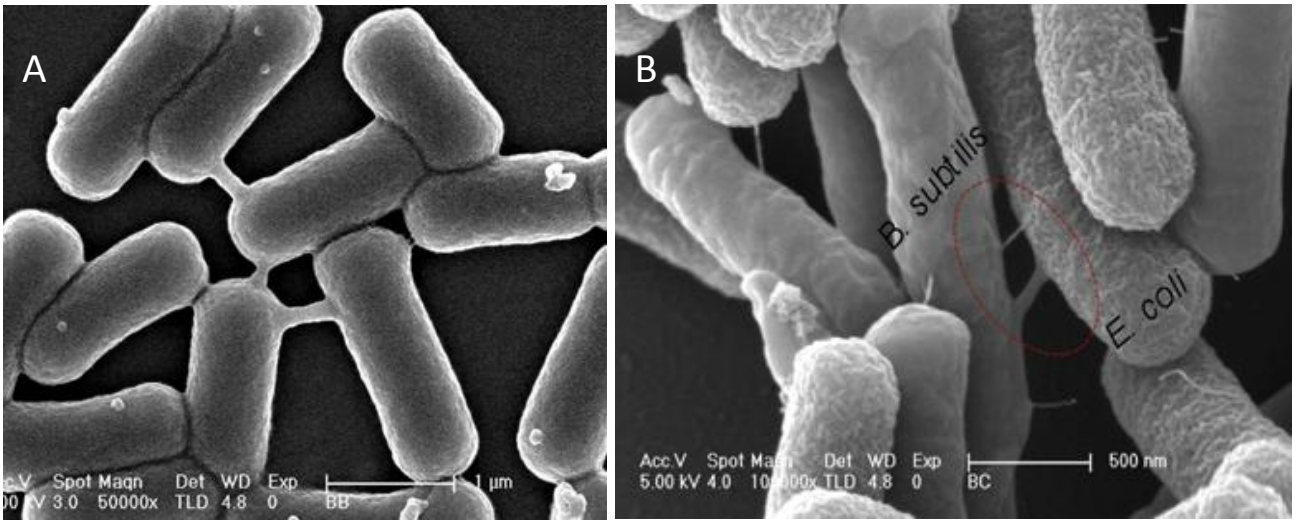


Figure 2. Nanotubes entre cellules voisines appartenant à la même espèce ou à différentes espèces (tiré de [107]).

Visualisation de nanotubes (A) au sein d'une population de cellules de Bacillus subtilis *et (B) entre* B. subtilis *et* Escherichia coli*.*

1.3. Les barrières au transfert horizontal

1.3.1. Les barrières liées au mécanisme de transfert

En fonction du mécanisme de transfert impliqué, la taille des fragments d'ADN transférés varie. Par exemple, les molécules d'ADN acquises par transformation naturelle n'excèdent généralement pas une dizaine de kb, alors que celles transférées par transduction ont une taille pouvant mesurer jusqu'à une centaine de kb. Les plus gros fragments d'ADN sont transférables par conjugaison puisque des milliers de kb peuvent être échangés par ce mécanisme [268].

Beaucoup d'autres facteurs influencent le transfert horizontal. Par exemple, le transfert d'ADN par transformation dépend entre autre de la persistance de l'ADN sous forme libre dans l'environnement et de la concordance entre l'état physiologique des bactéries et la présence d'ADN libre tandis que les bactériophages sont souvent plus stables dans l'environnement [78, 284].

De plus, le transfert par transduction reste souvent limité à des échanges entre quelques espèces proches en raison de la spécificité d'hôte des bactériophages. Il en est de même pour la conjugaison puisque certains plasmides possèdent également un spectre d'hôte limité [78].

1.3.2. Acquisition, intégration et maintien de l'ADN exogène

Le processus de spéciation peut commencer uniquement quand l'échange de matériel génétique est interrompu entre des populations d'une même espèce. Le degré d'isolement génétique entre espèces dépend de différents facteurs comme leur microenvironnement et l'utilisation des codons. Ces facteurs sont autant de barrières à l'acquisition de matériel génétique exogène chez les bactéries [403].

La cause majeure de la limitation des échanges inter-espèces reste l'intégration et la conservation de l'information génétique acquise. En effet, le degré de similarité des séquences va influencer l'activité de l'enzyme qui contrôle la fidélité de la recombinaison et par conséquent le taux de transfert [268, 284]. La recombinaison homologue est un mécanisme d'intégration qui nécessite une grande homologie de séquences mais peut s'effectuer entre des séquences d'ADN présentant jusqu'à 25 % de divergences [78]. Afin de franchir cette barrière, beaucoup d'éléments génétiques mobiles s'intègrent par d'autres mécanismes tels que la recombinaison hétérologue, l'intégration site spécifique ou encore par l'intermédiaire de séquences d'insertion répétées conservées. Par ailleurs, les éléments génétiques mobiles sont fréquemment retrouvés au niveau de gènes de ménage conservés chez les bactéries et au niveau de sites qui ont peu ou pas d'influence sur la physiologie de l'hôte.

Dans des conditions environnementales où l'ADN subit des dommages et/ou la réplication est perturbée, le système SOS est induit ce qui augmente la capacité de réparation de l'ADN tout en induisant des variations génétiques [268, 284]. Le substrat pour l'activation de RecA et du système SOS est l'ADN simple brin. Ces systèmes sont ainsi induit lors des transferts d'ADN impliquant un ADN simple brin, ce qui favorise les échanges génétiques [268].

Une fois l'ADN intégré, pour que le transfert soit considéré comme efficace, les gènes acquis doivent pouvoir s'exprimer correctement chez son hôte et ne pas coder de composés néfastes pour celui-ci. En effet, il a été mis en évidence des gènes considérés comme inclonables. Ce phénomène pourrait être lié à une toxicité conférée par les gènes acquis vis à vis de la souche hôte [378].

Récemment, une étude a mis en évidence que l'utilisation différente des codons selon les espèces bactériennes constituait une autre barrière aux évènements de transferts horizontaux. En effet, les échanges de gènes entre organismes sont positivement corrélés avec leurs éventails d'ARN de transfert (ARNt). De plus, les organismes qui évoluent dans les mêmes niches écologiques possèdent un éventail d'ARNt similaire et ceci augmente la probabilité d'échanges génétiques stables [412].

D'autre part, afin de se maintenir après acquisition, les éléments génétiques mobiles ont développé des systèmes d'addiction (systèmes de restriction-modification ou des systèmes impliquant une toxine et une antitoxine) qui entraînent la mort, ou un ralentissement significatif de la croissance de la cellule qui le perd. Un système toxine-antitoxine peut être défini comme un système d'addiction puisqu'il code un système protéique où l'antitoxine instable neutraliserait la toxicité de la toxine stable.

1.3.3. Les systèmes CRISPR : protection contre l'ADN exogène

Une infime partie seulement de l'ADN acquis par les bactéries va leur conférer un avantage sélectif tout en n'altérant pas la physiologie cellulaire. Pour cette raison, les bactéries ont développé des mécanismes leur permettant de limiter le transfert horizontal [260]. Les bactéries possèdent ainsi des systèmes de restriction-modification et des systèmes d'exclusion de surface limitant l'entrée d'ADN étranger. Par ailleurs, un système génétique de défense contre l'intégration d'éléments mobiles et l'ADN étranger issu de phages et de plasmides, le système CRISPR-Cas (CRISPR pour Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats et Cas pour CRISPR associated proteins), a été mis en évidence et est présent chez environ 40 % des espèces bactériennes [22, 180, 203, 245]. Ce système fonctionne par l'intermédiaire de petits ARN non codants de manière similaire aux ARN interférants chez les eucaryotes. Initialement décrit comme ayant un rôle dans la réparation de l'ADN, le système de défense CRISPR-Cas a, en plus, la capacité d'incorporer de courtes séquences de matériel génétique étranger nommées espaceurs (« spacers »). Les espaceurs s'intègrent au niveau de loci au sein des CRISPR qui sont composés de séquences répétées palindromiques [180]. La longueur des répétitions peut varier de 21 pb à 48 pb tandis que les espaceurs ont une taille 26 pb à 72 pb [22, 180, 203].

Chez la plupart des organismes possédant ce système, les espaceurs sont transcrits constitutivement à faible niveau et transformés en petits ARN non codants. En collaboration avec les protéines Cas, codées par des gènes qui sont situés à proximité immédiate des loci CRISPR, les ARN non codants peuvent se lier à l'ADN ou à l'ARN étranger et entraîner leur

dégradation [180]. Les loci CRISPR constituent ainsi une mémoire génétique qui permet le rejet ou la dégradation de molécules d'ADN [260]. Lorsqu'une infection par un phage se produit, la transcription des CRISPR est induite [22]. Le système CRISPR qui est composé de séquences hypervariables, confère une immunité contre l'ADN viral et plasmidique. Les protéines du complexe Cas sont impliquées dans l'acquisition de nouveaux espaceurs, dans la transformation des transcrits primaires des CRISPR, voire dans la reconnaissance et la dégradation du matériel génétique étranger.

Des loci CRISPR sont présents sur toutes les familles des éléments génétiques mobiles décrits. Ceci suggère fortement que les systèmes CRISPR-Cas sont capables de se transférer horizontalement [22, 203]. L'impact de la présence des loci CRISPR sur des éléments mobiles reste mal compris mais ils pourraient leur conférer un avantage face à l'invasion d'autres éléments [203]. Beaucoup de facteurs de virulence et de facteurs apportant un avantage sélectif aux bactéries sont portés par des éléments génétiques mobiles. En conclusion, les CRISPR pourraient limiter la dissémination de tels facteurs au sein des populations bactériennes [260].

1.4. Les éléments génétiques mobiles : acteurs majeurs de l'évolution bactérienne

Les éléments génétiques mobiles ont une taille variable pouvant aller de 1 kb à plusieurs centaines de kb et tous sont caractérisés par une structure modulaire [214, 406]. Les plasmides conjugatifs ont été les premiers éléments décrits comme acteurs du mécanisme de conjugaison. Les éléments génétiques mobiles codent souvent des fonctions pouvant apporter un avantage sélectif à l'hôte telles que la virulence, de nouvelles interactions écologiques, la résistance à des antibiotiques ou toutes autres fonctions susceptibles d'augmenter la compétitivité de son hôte.

Les séquences d'insertion sont les plus petits éléments mobiles connus à ce jour. Ils sont capables de se déplacer de manière autonome vers un ou plusieurs sites d'intégration

de façon intramoléculaire. On parle dans ce cas de transposition. Beaucoup ne possèdent que le module permettant leur excision et leur intégration (recombinase à tyrosine ou sérine, ou transposase à DDE). Les séquences d'insertion ont été identifiées dans de très nombreux génomes procaryotes mais également eucaryotes.

Les transposons composites sont des éléments bordés par des séquences d'insertion. Ils peuvent ainsi se déplacer intracellulairement de façon site spécifique ou préférentielle par l'intermédiaire de la transposase qu'ils codent. Les transposons possèdent en plus des séquences d'insertion, des gènes qui peuvent coder des fonctions accessoires (résistance aux antibiotiques, gène de métabolisme, de virulence…). **Les transposons conjugatifs** sont en plus capables de se transférer par conjugaison d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse plus ou moins éloignée phylogénétiquement sur le même modèle que les plasmides conjugatifs [407].

Les plasmides font partie des principaux acteurs de la dissémination de résistance aux antibiotiques dans la population bactérienne entraînant ainsi d'importants problèmes sanitaires [153]. Les plasmides sont des éléments pouvant se maintenir de façon autonome sous forme extrachromosomique, la plupart du temps sous forme circulaire.

Les plasmides conjugatifs codent toutes les fonctions impliquées dans leur transfert par conjugaison, le plus souvent sur le modèle du cercle roulant. A la fin du transfert, chacune des bactéries impliquées possédera une copie du plasmide.

Certains plasmides ne possèdent pas les fonctions leur permettant de former le pore de conjugaison. Ces plasmides sont dits mobilisables puisqu'ils peuvent utiliser la machinerie d'autres éléments mobiles pour se disséminer.

La dernière classe de plasmides regroupe les plasmides qui ne sont ni conjugatifs ni mobilisables. Ces plasmides peuvent se transférer d'une bactérie hôte à une bactérie receveuse par d'autres mécanismes de transferts horizontaux (transduction ou transformation naturelle).

De manière intéressante, le transfert de certains plasmides chez *Enterococcus faecalis* répond à la présence de phéromones. Ces phéromones induisent la

production d'une protéine nommée substance d'agrégation. La production de phéromones par ces plasmides augmente le transfert de 5 à 6 fois [153].

Les îlots génomiques, tels que les îlots de virulence ou de métabolisme, pourraient provenir de plasmides intégratifs ou de transposons conjugatifs ayant perdu leur capacité à recombiner. Un îlot génomique est défini comme une région chromosomique de plus de 10 kb dont les propriétés suggèrent son acquisition par un ou plusieurs évènements de tranfert horizontal [159, 160]. Un faisceau d'hypothèses peut permettre de suggèrer un tel type d'acquisition : absence ou présence de l'îlot au sein d'une même espèce, pourcentage en G+C divergeant par rapport au reste du génome, utilisation différente des codons, localisation entre des séquences répétées et à proximité de sites privilégiés pour l'intégration des éléments génétiques mobiles comme les loci en amont des gènes codant des ARNt [98, 199].

Le maintien d'un élément mobile dans une population dépendra de manière importante de son succès évolutif. Si celui-ci n'est pas essentiel ou qu'il apporte en compétitivité à la bactérie hôte moins que le prix métabolique qu'il coûte à être conservé, l'élément génétique mobile peut être perdu par la population.

1.5. Les ICE, des partenaires incontournables du transfert horizontal

1.5.1. Caractéristiques des ICE, structure modulaire et dynamique évolutive

De nombreux éléments chromosomiques se répliquent en même temps que le chromosome bactérien mais possèdent toutes les fonctions permettant leur excision et leur transfert inter- et intra-espèce par conjugaison. La dénomination « Integrative and Conjugative Element » (ICE) a été proposée pour identifier ce type d'élément quelle que soit la recombinase impliquée dans l'excision et l'intégration (recombinase à tyrosine ou à sérine

ou transposase à DDE) [53, 56, 437]. Les ICE sont très répandus aussi bien chez les bactéries à coloration Gram négative que celles à Gram positive [156].

Les ICE ont une structure modulaire, regroupant dans une localisation proche un ensemble de gènes impliqués dans une même fonction [407]. On peut ainsi distinguer un module de recombinaison, un module de conjugaison et un module de régulation. Si ces modules sont fonctionnels, l'élément génétique mobile a la capacité de s'exciser, de se transférer via un pore de conjugaison et de s'intégrer par recombinaison spécifique de site dans le chromosome d'une bactérie receveuse [53]. L'évolution des ICE se déroulerait par échange, délétion et acquisition de modules fonctionnels [53, 140, 407]. De façon remarquable, l'échange de modules a également été montré entre différents types d'éléments mobiles : ICE*St1* de *Streptococcus thermophilus* code un système de restriction-modification proche de celui porté par le plasmide pKR223 de *Lactococcus lactis* [52] et le module de conjugaison de l'élément conjugatif intégratif EfaC2 chez *E. faecalis* V583 porte cinq ORF présentant une forte identité de séquence par rapport aux gènes de conjugaison portés par le plasmide pAD1 d'*E. faecalis* [53].

1.5.2. Mécanismes de transfert des ICE

Le premier élément génomique intégratif et conjugatif décrit est Tn*916* [344]. Le mécanisme de conjugaison de cet élément reste inconnu. Tn*916* code une intégrase appartenant à la famille des recombinases à tyrosine. A ce jour, trois principales familles de recombinases sont connues : les recombinases à sérine et à tyrosine et les transposases à DDE [53]. Il est à noter que la plupart des intégrases catalysant l'intégration spécifique de site des ICE sont des intégrases à tyrosine. De plus, les éléments mobiles sont intégrés de manière prédominante à l'extrémité 3' de gènes codant pour des ARNt et des protéines ribosomiques. Une raison pouvant expliquer ce phénomène est que la conservation des séquences de ces gènes est élevée parmi les genres bactériens ce qui facilite l'intégration de l'élément mobile [433].

La première étape du transfert conjugatif correspond à l'excision de l'ICE sous l'action de la recombinase et parfois d'une excisionase de façon similaire au processus d'excision utilisé par les prophages (Figure 3). Une fois sous forme circulaire, comme pour les plasmides conjugatifs, une relaxase va initier le transfert, dans la majorité des cas sous forme simple brin, en clivant l'ICE circularisé au niveau du site *nic* de l'origine de transfert (*oriT*) [53, 187, 318].

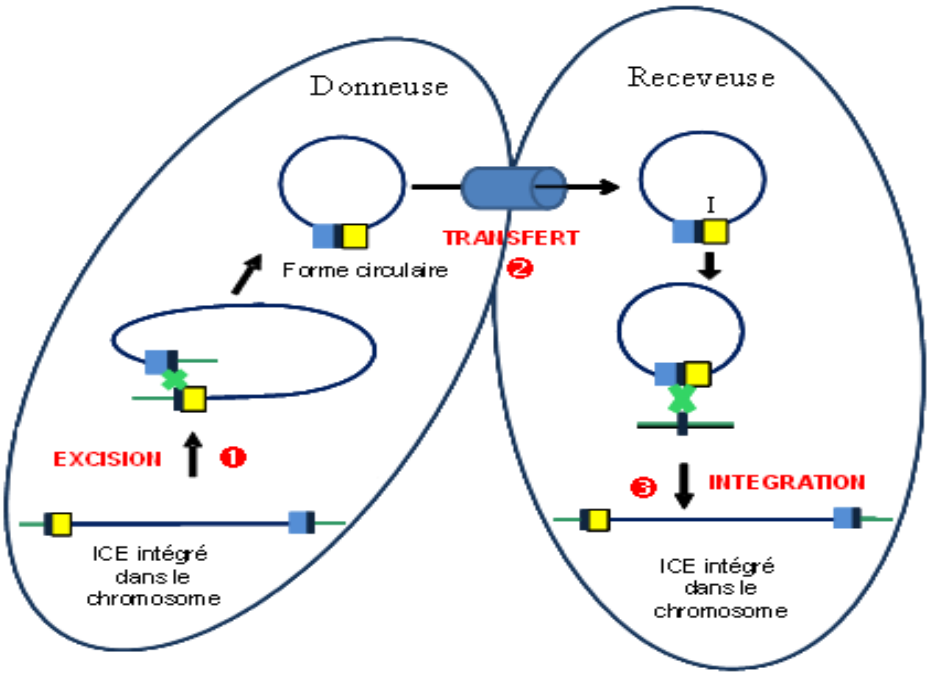


Figure 3. Schéma du processus de transfert par conjugaison d'un ICE d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse.

Pour les éléments se transférant sous forme simple brin, le transfert de la cellule donneuse à la cellule receveuse pourrait s'établir sur le modèle du cercle roulant. Ce modèle est largement décrit chez les plasmides conjugatifs et s'effectue via un pore de conjugaison mais peu de données concernant le mécanisme du transfert conjugatif des ICE sont disponibles (Figure 3) [6, 19]. Néanmoins, chez *Bacillus subtilis*, il est connu qu'ICE*Bs1* est transféré soit au niveau du pôle cellulaire soit au niveau de la face latérale de chacune des

deux cellules impliquées dans la conjugaison [6]. Par ailleurs, l'une des protéines essentielles au transfert conjugatif d'ICE*Bs1*, la protéine ConE, est associée à la membrane essentiellement au niveau des pôles cellulaires [19]. Durant ce phénomène, les bactéries sont toujours en contact ce qui indique que la conjugaison n'est pas réalisée par un pilus prolongé. De manière importante, une fois que l'ADN a été transféré à une bactérie d'une chaine, l'ADN est rapidement transféré à toutes les autres bactéries de la chaine [6]. De plus, chez *Vibrio cholerae*, l'ICE SXT code une protéine de surface qui pourrait être impliquée dans le processus de conjugaison [10]. Pour finir, l'ICE réplicatif pRS01 de *L. lactis* code une protéine de surface présentant des similarités avec le facteur d'agrégation cellulaire Asa1 du plasmide pAD1 d'*Enterococcus faecalis* [109] et des phéromones de plasmides conjugatifs impliquées dans le contact entre les cellules donneuses et receveuses durant la phase de transfert d'ADN par conjugaison [147, 427].

Chez les éléments codant une recombinase à tyrosine ou à sérine, la recombinase va catalyser la recombinaison entre un site de recombinaison nommé *attI* présent sur la forme circulaire de l'ICE et un site nommé *attB* présent sur le génome bactérien (Figure 3). A la fin du transfert, chaque cellule va posséder une copie de l'élément intégré bordé des sites *attL* et *attR* (L pour Left, R pour Right). Les sites *att* comprennent les séquences répétées impliquées dans la recombinaison ainsi que des fragments flanquants de taille variable impliqués dans la reconnaissance par la recombinase. Bien que ce type de recombinaison soit le plus souvent de haute spécificité, certains éléments, tels que l'ICE Tn*916*, possèdent une faible spécificité d'intégration [53].

Récemment, il a été montré que les ICE peuvent se répliquer de façon extrachromosomique [61, 230, 371]. Des éléments retrouvés sous forme circulaire pourraient ainsi avoir été classifiés en tant que plasmides conjugatifs alors que ceux-ci sont des éléments intégratifs. Le cas s'est produit pour l'élément pRSO1 de *L. lactis* qui avait été classifié en tant que plasmide puisqu'une forme circulaire de l'ICE avait été initialement détectée [109].

1.5.3. Mobilisation d'ADN par les ICE

La mobilisation d'ADN correspond au transfert par conjugaison de cet ADN par l'intermédiaire d'éléments génétiques conjugatifs (plasmides ou ICE).

Certains éléments possèdent les fonctions d'excision, d'intégration et de régulation mais ont perdu la capacité de transfert conjugatif. Ces éléments intégratifs mobilisables (IME pour Integrative and Mobilizable Elements) peuvent utiliser le système de conjugaison d'autres éléments génétiques mobiles pour se disséminer [40, 54]. Ils sont dits mobilisables en *trans*.

Les CIME (pour Cis-Mobilizable Elements) sont des éléments bordés de sites de recombinaison où peuvent venir s'intégrer des ICE apparentés (phénomène d'accrétion). Ces éléments peuvent ainsi être mobilisés en *cis* (par opposition à la mobilisation en *trans* des IME) dans une autre cellule [13, 54].

Il existe par ailleurs des éléments bordés de sites de recombinaison et possédant un module de recombinaison mais pas de gène permettant la conjugaison. Ces éléments sont donc capables de s'exciser et de s'intégrer dans un autre élément génétique mobile [40, 318].

D'autre part, un ICE présent chez *B. subtilis*, ICE*Bs1*, est capable de mobiliser des plasmides initialement décrits comme non mobilisables puisqu'ils ne possèdent ni origine de transfert ni relaxase spécifique au transfert par conjugaison [231]. Les plasmides utilisent la machinerie de conjugaison d'ICE*Bs1* et la relaxase nécessaire à l'initiation du transfert conjugatif serait la relaxase plasmidique de réplication.

De plus, les ICE de la famille SXT/R391 sont capables de mobiliser divers plasmides et de l'ADN chromosomique en *cis* de la même manière que le plasmide F de type Hfr (High frequency of recombination) [174]. En particulier, chez *Vibrio* spp., des îlots génomiques possèdent une origine de transfert identique à 63 % à celle de la famille des ICE SXT/R391 présente au sein de la même espèce. Cette séquence est reconnue par la relaxase codée par l'ICE co-résident ce qui permet le transfert par mobilisation en *trans*. Les îlots peuvent s'exciser grâce à la recombinase qu'ils codent mais l'expression de celle-ci est dépendante

de régulateurs de l'ICE. La relaxase des ICE SXT/R391 peut également reconnaître l'*oriT* d'éléments intégrés et conduire à la mobilisation en *cis* de ces éléments [87].

De même, chez *S. agalactiae*, des fragments d'ADN, pouvant atteindre 334 kb et adjacents à des éléments génétiques mobiles peuvent être transférés en même temps que ces éléments de manière similaire au type Hfr [42].

Ces données suggèrent un potentiel de transfert horizontal, pour les éléments décrits comme non mobilisables et pour l'ADN chromosomique natif, plus élevé que les prédictions initiales l'estimaient. Ainsi, les ICE ont une influence sur la dynamique génomique bactérienne extrêmement importante et complexe [231].

2. Acquisition de nouvelles fonctions adaptatives par le transfert des ICE

2.1. Apport de nouvelles fonctions par les ICE: un phénomène de grande ampleur

En plus des fonctions nécessaires au transfert de l'ICE, celui-ci peut également porter des gènes codant des fonctions pouvant conférer un avantage sélectif à l'hôte, tels que des gènes de résistance à des antibiotiques ou des gènes permettant la colonisation de nouvelles niches écologiques. Ces gènes seront alors transférés par le mécanisme de conjugaison et les fonctions codées par ces gènes pourront se disséminer dans la population. De nombreux exemples ont déjà été décrits concernant l'apport des ICE en termes de virulence à la bactérie hôte.

L'ICE fonctionnel SPI-7 de *Salmonella enterica* serovar Typhi code de nombreux facteurs de pathogénicité, notamment le pili de type IV permettant l'adhésion aux cellules de l'hôte [50].

L'élément ICE*Ec2*, présent chez des souches pathogènes d'*Escherichia coli*, est capable de transférer *in vitro* chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium et

Yersinia pseudotuberculosis. ICE*Ec2* porte 3 gènes de résistance à des antibiotiques ainsi que le gène *Iha* codant un sidérophore qui est impliqué dans l'adhésion d'une souche entéro-hémorragique à des cellules eucaryotes [333]. La production d'un sidérophore, facteur essentiel à la virulence de *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*, mais également produit par *E. coli* et une variété d'Entérobactéries, est également codée par un ICE [356].

Un ICE d'*Enterococcus faecalis* de 150 kb, transférable de manière intra- et inter-espèce est impliqué dans la virulence de la souche hôte puisqu'il porte des gènes codant des toxines, des cytolysines, des protéines de surface, et des gènes améliorant sa capacité de colonisation du tractus gastro-intestinal [77, 227, 257].

Les ICE appartenant à la famille SXT/R391, largement transmissibles chez les bactéries à coloration Gram négative, représentent une famille d'ICE qui code de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds et aux désinfectants. SXT est présent notamment chez des souches de *Vibrio cholerae* épidémiques, *Providencia rettgeri*, *Photobacterium damselae* et *Proteus mirabilis* [10, 335, 436].

De plus, la famille des ICE Tn*916*/Tn*1545* est responsable de la dissémination de gènes pouvant conférer des résistances au mercure et à des antibiotiques (à la tétracycline, au chloramphénicol, à la vancomycine, à la kanamycine, à la famille des macrolides, des lincosamides et des streptogramines) [76, 332]. Les membres de la famille des Tn*916*/Tn*1545* sont les principaux responsables de la résistance à la tétracycline des espèces appartenant à la famille des Firmicutes [76]. Des ICE appartenant à la famille de Tn*916* sont transférables parmi 35 genres bactériens différents évoluant dans différents environnements dont de nombreux entérocoques, *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae* et *Clostridium difficile*. Tn*1545* est identique à Tn*916* mais possède en plus des insertions d'autres gènes comme notamment le gène *erm*(B) conférant une résistance à l'érythromycine [332]. En plus de coder des fonctions avantageuses, certains événements liés à l'intégration des ICE peuvent conduire à l'émergence d'un nouveau phénotype. Ainsi, l'insertion de Tn*916* en amont d'un gène codant un activateur d'une protéine lytique chez *E. faecalis* a pour conséquence d'engendrer un clone hyper hémolytique [185].

Une analyse bioinformatique a montré que les souches de *Clostridium difficile* possèdent de nombreux ICE putatifs [46]. Ces éléments génétiques ont une localisation proche ce qui suggère des évènements de transferts horizontaux récents [46]. Des analyses bioinformatiques des éléments de *C. difficile* ont montré que la plupart des gènes accessoires codent des transporteurs de type ABC ou des pompes à efflux qui pourraient conférer des résistances aux antibiotiques. D'autres gènes codent des protéines de surface qui pourraient permettre des interactions avec des composants de l'hôte [46].

De plus, de nombreux ICE (CTn) sont disséminés chez *Bacteroïdes* spp. La plupart de ces éléments confèrent la résistance à la tétracycline et sont transférables à *E. coli*. De plus, un des ICE est capable de mobiliser le transposon non conjugatif Tn*4555*, également présent chez *Bacteroïdes* spp., qui code une β-lactamase à spectre étendu conférant ainsi une résistance aux β-lactamines [318].

Les exemples indiquant que les ICE jouent un rôle important en tant que vecteurs de gènes de virulence et résistance aux antibiotiques se multiplient, ce qui ouvre un champ d'exploration intéressant concernant la compréhension des mécanismes adaptatifs et la dynamique génomique des bactéries pathogènes.

2.2. Importance des échanges génétiques chez les streptocoques par le biais des ICE : exemples déjà décrits

2.2.1. ICE*St1* et ICE*St3* de *S. thermophilus*

ICE*St1* et ICE*St3*, des éléments conjugatifs respectivement de 35,5 kb et 28 kb, sont intégrés à l'extrémité 3' du gène *fda* chez les souches CNRZ368 et CNRZ385 de *S. thermophilus* [55, 307]. ICE*St1* et ICE*St3* sont bordés de séquences répétées de 27 pb. Ces éléments portent des modules de conjugaison et de recombinaison quasiment identiques et des modules de régulation apparentés [307]. ICE*St1* et ICE*St3* sont capables de transférer

entre souches de *S. thermophilus* [14]. Par ailleurs, ICE*St3* est capable de disséminer vers des Firmicutes pathogènes ou non pathogènes (*L. lactis*, *S. pyogenes* et *E. faecalis*) [14]. Le transfert conjugatif est fortement induit en conditions de stress, comme en cas de dommages à l'ADN (traitement à la mitomycine C) ou durant la phase stationnaire de croissance où les conditions de croissance ne sont plus optimales [14, 61]. Enfin, il a été montré qu'ICE*St3* est capable de se répliquer de manière extrachromosomique [61].

S. thermophilus est une bactérie utilisée dans la production de produits laitiers. La prolifération de bactériophages est un des facteurs pouvant gêner les processus de fermentation et entraîner des problèmes majeurs dans les usines de fabrication et transformation laitières. ICE*St1* et ICE*St3* codent chacun un système de restriction-modification spécifique qui confère des propriétés endonucléasiques et une résistance aux phages. Ces fonctions peuvent être ainsi acquises par d'autres espèces via le transfert des ICE [52].

2.2.2. ICE*Sde3396* de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

ICE*Sde3396* est un ICE fonctionnel retrouvé chez *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, et capable de transférer chez *S. agalactiae* et *S. pyogenes*. Cet élément a une taille de 64 kb et possède 66 ORF putatives. Il est intégré de façon adjacente au gène *rplL* codant une protéine ribosomique [89]. Trente-huit de ces ORF sont également codées par ICE_*2603V/R_rplL* présent chez la souche 2603 V/R de *S. agalactiae*, parmi lesquels on retrouve les gènes nécessaires au transfert des ICE mais également des facteurs de virulence putatifs dont des protéines de surface et des gènes conférant une résistance au cadmium et au cuivre. ICE_*2603V/R_rplL* et les autres ICE similaires détectés chez *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* sont également intégrés à proximité du gène *rplL*. La différence entre les éléments ICE_*2603V/R_rplL* et ICE*Sde3396* est une région de 18kb supplémentaire présente sur ICE*Sde3396*. Cette région porte 21 ORF réunies en 4 clusters présentant une homologie avec des gènes d'autres streptocoques pathogènes (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*) ou non

(*S. thermophilus S. gordonii*, *S. parasanguinis)* et d'autres souches n'appartenant pas à la famille des streptocoques *(E. faecalis*, *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae, Listeria innocua* et *L. lactis)*. L'environnement génétique de ces homologues inclut des gènes associés à des éléments mobiles suggérant que la structure en mosaïque d'ICE*Sde3396* provient de multiples phénomènes de transferts horizontaux [89].

Un travail récent a montré qu'une nouvelle souche de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (notée SDE1 sur la figure 4) possède un ICE similaire à ICE*Sde3396* et que des gènes homologues à ceux portés par ICE*Sde3396* sont répandus chez les streptocoques [391] (Figure 4). De plus, un ICE similaire à ICE*_2603V/R_rplL*, nommé ICE*Su32457* a également été détecté chez *S. suis* et confère une résistance à la tétracycline, à la streptomycine, à la kanamycine et aux macrolides [296].

En conséquence, la famille des ICE similaires à ICE*Sde3396* a disséminé parmi les streptocoques et serait donc un des éléments majeurs contribuant à la dynamique des génomes des streptocoques capable de conférer de multiples avantages sélectifs.

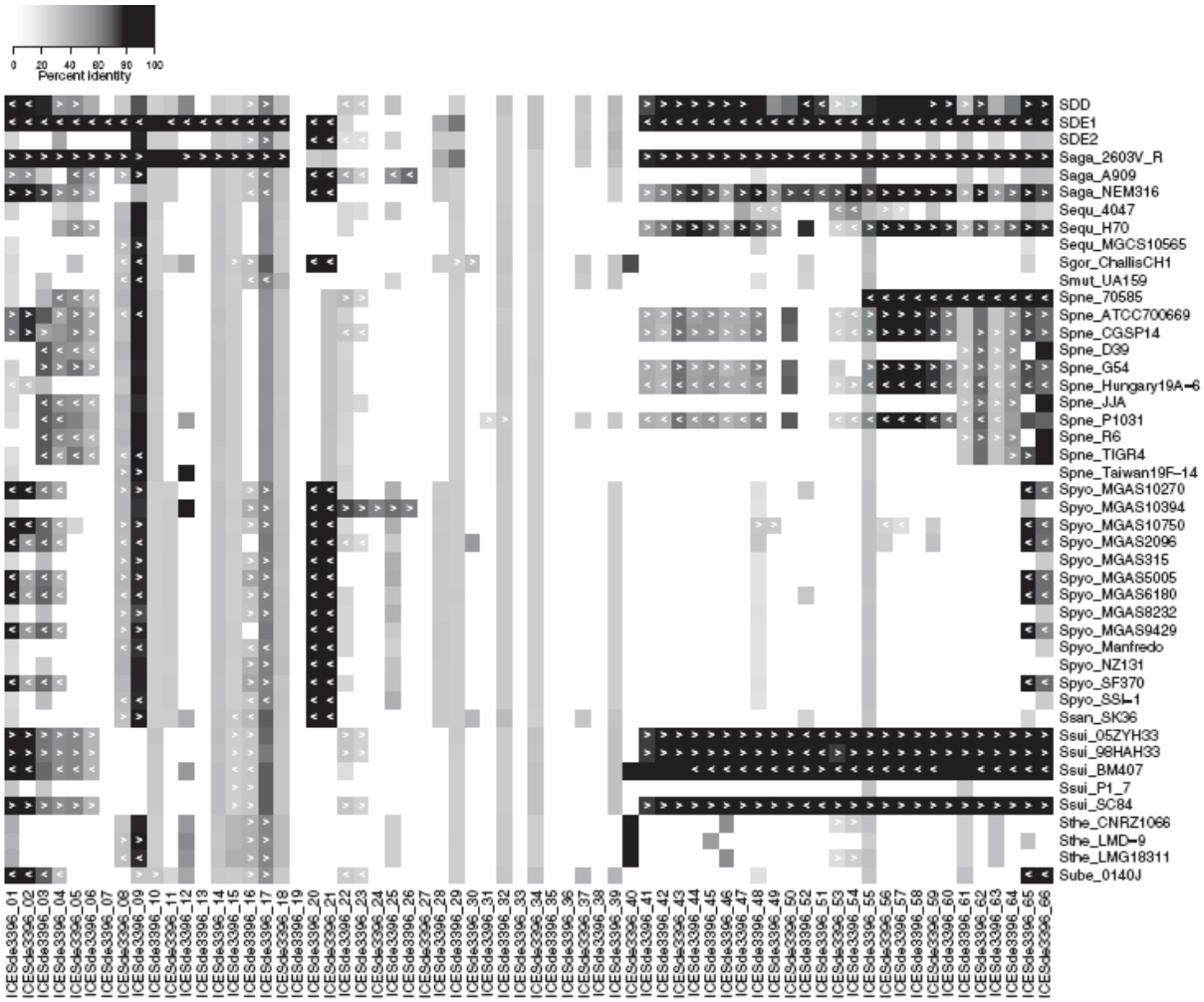


Figure 4. Carte présentant le pourcentage d'identité de gènes présents chez diverses souches de streptocoques par rapport aux gènes portés par ICE*Sde3396* de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* en utilisant BLASTP (tiré de [391]).

Les flèches représentent l'orientation des gènes.

2.2.3. Région de différence 2 (RD2) chez *S. pyogenes*

Chez *S. pyogenes*, sur 12 souches séquencées étudiées, 55 prophages et 12 ICE ont été détectés et sont intégrés à 21 loci différents. Environ 10 % du génome n'appartient pas au « core » génome de *S. pyogenes* et est composé d'éléments génétiques mobiles tels que des prophages et des ICE [16].

Le séquençage d'une souche de *S. pyogenes* du sérotype M28 majoritairement retrouvée dans les cas de septicémies et d'infections des nouveaux nés a mis en évidence la présence de 2 régions géniques de 11,1 et 37,4 kb, nommées respectivement RD1 et RD2, spécifiques à ce sérotype [152]. Ces régions sont situées à l'extrémité 3' de gènes codant des ARNt et sont bordées de séquences répétées. L'excision de RD2 est stimulée en conditions de stress de manière similaire à ICE*St3* et sa capacité à transférer entre différentes souches de *S. pyogenes* a été démontrée [371].

De nombreuses protéines codées par RD2 sont similaires à celles codées par les ICE intégrés à l'extrémité 3' du gène ARNt Lysine chez les souches 2603 V/R et NEM316 de *S. agalactiae*. Tandis que RD1 ne paraît coder aucun facteur de virulence, RD2 code 7 protéines extracellulaires pouvant être impliquées dans la virulence de *S. pyogenes* M28 [152, 369]. Notamment, l'une des protéines de surface produite par le gène *spy1325* code une protéine de surface appartenant à la famille des antigènes I/II capable d'adhérer aux protéines salivaires [448]. La transcription de certains gènes de RD2 est régulée différentiellement en fonction de l'environnement dans lequel *S. pyogenes* se trouve (voies respiratoires humaines, sang, tractus urogénital féminin et liquide amniotique), ce qui pourrait lui permettre d'adapter la production de facteurs de virulence en fonction de ses besoins [152].

RD2 est également présent chez des souches de streptocoques appartenant au groupe C et D de Lancefield [152, 371]. L'ensemble de ces éléments suggère des transferts horizontaux entre plusieurs espèces de streptocoques [152, 371].

2.2.4. ICE*Se2* chez *S. equi*

Un ICE présent chez une grande majorité des souches de *S. equi*, ICE*Se2*, porte des gènes qui présentent des identités de séquences avec les ICE putatifs CDTn*2* et CDTn*5* présents chez *C. difficile* et Tn*1549* présent chez Enterococcus spp [169]. La recombinase d'ICE*Se2* est également homologue à celle portée par Tn*5397* chez *C. difficile* [424].

ICE*Se2* code un système, nommé système équibactine, similaire au système yersiniabactine porté par un îlot génomique chez des souches de *Yersinia pestis* et *E. coli*. Le système est impliqué dans l'acquisition du fer et pourrait être un important facteur de virulence [169].

2.2.5. L'ICE 89 K chez *S. suis*

S. suis sérotype 2 est un pathogène majeur responsable d'épidémies chez le porc et l'Homme. Chez ce sérotype, des souches portent un îlot de pathogénicité, nommé 89K et adjacent au gène *rplL*. La présence de 89K chez des souches de *S. suis* sérotype 2 est reliée à des épisodes épidémiques récents chez le porc. L'îlot est capable de s'exciser et de transférer entre des souches de *S. suis*. Au sein de l'îlot, Tn*916* est présent et confère une résistance à la tétracycline [238].

2.2.6. ICE*Sp2905* chez *S. pyogenes*

ICE*Sp2905* est un élément génétique mobile transférable de manière intra-espèce et résulte de l'accrétion de deux ICE, ICE*Sp2906* et ICE*Sp2907*. ICE*Sp2905* est intégré à l'extrémité 3' du gène *rum* codant la méthyltransférase ciblant les résidus uracile de l'ARN. Ce site d'intégration est un point chaud d'intégration des éléments génétiques mobiles chez les streptocoques [39]. ICE*Sp2906* confère une résistance à la tétracycline tandis qu'ICE*Sp2907* confère une résistance à l'érythromycine [145].

II. *S. agalactiae* : un modèle d'étude des ICE chez les streptocoques

1. *Streptococcus agalactiae*

1.1. Généralités

L'une des premières mises en évidence de microorganismes en forme de coques et liés en chaînettes dans l'Histoire a été faite par Louis Pasteur en 1879 alors qu'il étudiait la fièvre puerpérale qui engendrait un fort taux de mortalité à la maternité. Les streptocoques ont été les premières espèces provoquant des maladies contagieuses à être étudiées. Historiquement, la classification des streptocoques est basée sur leurs propriétés sérologiques de paroi comme décrit par Rebecca Lancefield [221]. Il existe actuellement plus de 100 espèces de streptocoques connues et les classifications continuent d'évoluer [11, 119, 286].

Streptococcus agalactiae appartient au groupe B des streptocoques selon la classification de Lancefield et est une des espèces représentant le groupe des streptocoques pyogéniques qui produisent une hémolyse de type β-hémolytique sur gélose au sang (Figure 5). Elle a une forme de coque et est reliée en chaînette. *S. agalactiae* présente une coloration Gram positive et possède un métabolisme anaérobie aérotolérant avec une température optimale de croissance de 37°C. *S. agalactiae* est une espèce pathogène opportuniste principalement isolée dans des cas d'infections humaines et bovines [305]. Un premier cas de mammite chez une vache laitière due à *S. agalactiae* a été reporté en 1887 tandis que des cas d'infections humaines n'ont été détectés qu'une cinquantaine d'années plus tard [305].

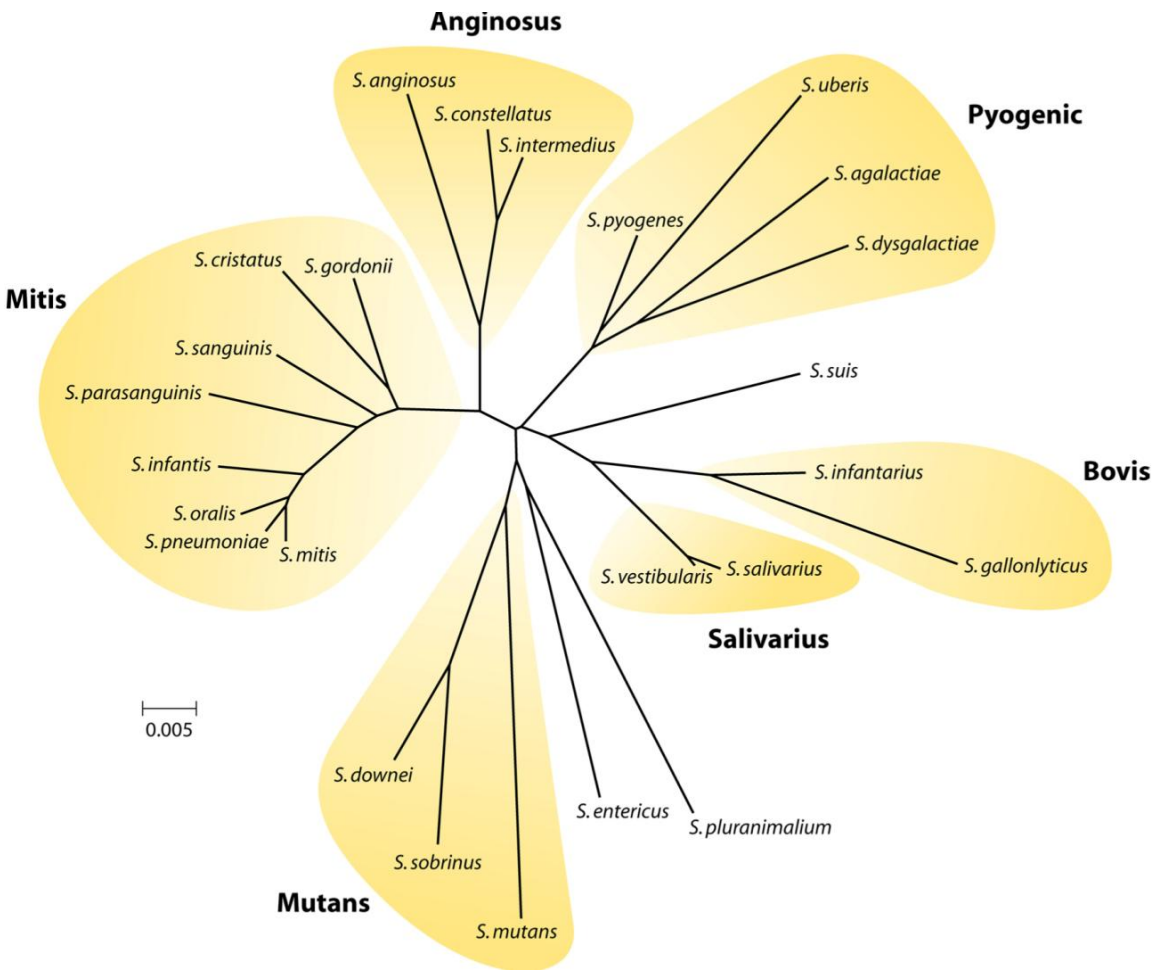


Figure 5. Arbre phylogénétique chez les streptocoques basé sur la comparaison des séquences du gène codant l'ARN ribosomique 16S (tiré de [286]).

Certaines espèces ne sont pas présentées sur la figure à des fins de simplification. Les streptocoques, à l'exception de S. thermophilus *et de* S. macedonicus, *sont toutes des espèces pouvant être impliquées dans des infections chez l'Homme et/ou l'animal.*

Tous les isolats cliniques de *S. agalactiae* possèdent une capsule polysaccharidique. Dix différents types capsulaires ont été identifiés. Décrite depuis longtemps, la capsule polysaccharidique confère une résistance au système immunitaire et représente un facteur de virulence majeur de *S. agalactiae* [258, 341]. De nombreuses études ont été réalisées sur la caractérisation des capsules puisque des anticorps dirigés contre celles-ci confèrent une

protection immunologique contre *S. agalactiae*. En fonction du lieu d'isolement des souches de *S. agalactiae* et de l'âge des patients, la répartition des sérotypes capsulaires responsables d'infections diffère mais les principaux sérotypes responsables d'infections sont les souches appartenant aux sérotypes Ia, Ib, II, III et V (Tableau 2) [27, 113, 265, 343, 397].

Tableau 2. Répartition des sérotypes capsulaires de *S. agalactiae* en fonction du lieu, des années d'isolement et des patients.

			Sérotypes capsulaires					
Lieu	**Années**	**Isolement**	**Ia**	**Ib**	**II**	**III**	**V**	**Source**
USA	1992/1993	Nouveaux nés infectés	33%	9%	6%	38%	11%	[27]
USA	1992/1993	Adultes infectés	34%	8%	6%	20%	29%	[27]
Pologne	1996/2005	Population totale en portage ou infectée	20%	13%	10%	36%	17%	[343]
Portugal	2001/2008	Adultes non enceintes infectés	35%	9%	12%	15%	20%	[265]
France	2007/2010	Adultes infectés	23%	10%	11%	26%	23%	[397]
Monde	1980/2011	Nouveaux nés infectés	23%	7%	6%	49%	9%	[113]

1.2. S. agalactiae: *une bactérie pathogène chez l'Homme*

1.2.1. Portage

S. agalactiae est une bactérie commensale qui colonise les femmes et les hommes. Ainsi, on retrouve *S. agalactiae* en portage sain au niveau du tractus génital (27% pour les femmes et 32% pour les hommes), sur la peau, dans la gorge et au niveau anal (respectivement 2 %, 4 % et 14 %) [416]. Des infections à *S. agalactiae* ont été reportées de manière croissante jusqu'en 1970. A cette date, une infection par *S. agalactiae* chez un nouveau né conduisait à un taux de mortalité de 55% [271]. Des méthodes prophylactiques

par l'utilisation d'antibiotiques pour prévenir la transmission de *S. agalactiae* de la mère à l'enfant durant l'accouchement ont permis de réduire ce taux à 5% [94]. *S. agalactiae* constitue néanmoins encore la cause principale de septicémies chez les nouveaux nés et représente environ 800 cas d'infections néonatales invasives provoquant entre 50 et 100 décès chaque année en France (www.pasteur.fr).

1.2.2. Infections chez les nouveaux nés

On distingue deux stades possibles d'infection chez les nouveaux nés sur la base d'un large éventail d'observations cliniques. Une première phase d'infection à *S. agalactiae* dite « aigue» (« early onset ») touche les nouveaux nés de moins de 7 jours souffrant majoritairement de détresses respiratoires et de pneumonies pouvant progresser rapidement en chocs septiques. La phase « tardive » d'infection (« late onset ») entraîne le plus souvent une méningite, accompagnée ou non d'une septicémie, et touche majoritairement les nouveaux nés de plus d'une semaine et jusqu'à 3 mois [305, 353] (Figure 6). Les infections précoces mais également les infections tardives pourraient avoir essentiellement comme origine une transmission mère-enfant durant l'accouchement ou via l'absorption de liquide amniotique.

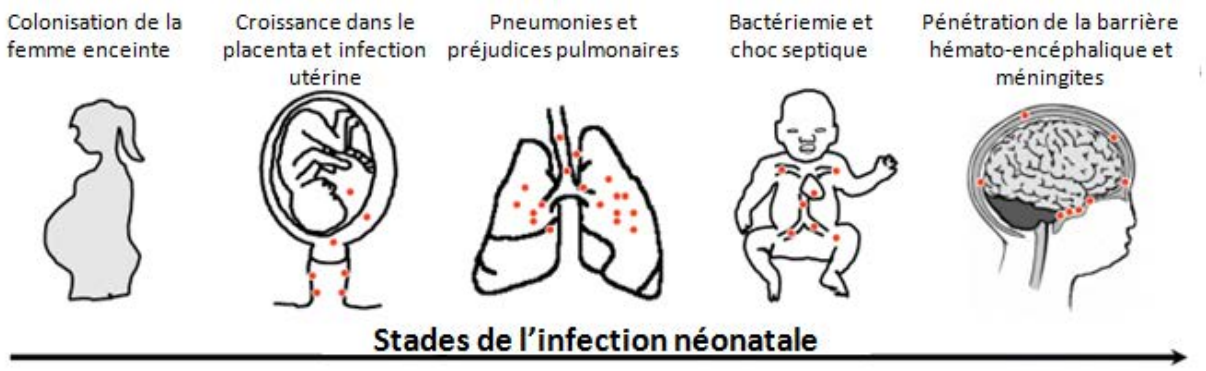


Figure 6. Etapes d'infection de *S. agalactiae* chez les nouveaux nés (tiré de [101]).

75% des infections à *S. agalactiae* chez les nouveaux nés sont des infections dites précoces [357]. La rupture précoce des membranes avant l'accouchement, la prématurité et la faiblesse du poids à la naissance paraissent constituer des facteurs facilitant l'invasion de *S. agalactiae*. Les enfants ayant survécu à une infection à *S. agalactiae* peuvent développer des séquelles sur le long terme (pertes auditives, de vision ou déficiences intellectuelles) [242, 353].

Il est à noter que les souches le plus souvent associées aux infections invasives néonatales sont les souches appartenant au complexe clonal ST17 [240, 266].

1.2.3. Infections chez les adultes

En parallèle au déclin des infections chez les nouveaux nés, une augmentation des infections chez les personnes adultes a été observée. La moyenne d'âge des personnes adultes atteintes par une infection à *S. agalactiae* est de 60 ans [397]. La mortalité associée est d'environ 25% et les personnes atteintes possèdent souvent une santé préalablement déjà affaiblie par des infections urinaires, du diabète, un carcinome, ou d'autres maladies chroniques ou fragilisant la santé des patients [121, 305, 397]. Les infections majeures chez les adultes consistent en des infections de la peau, des tissus mous, des os, des péritonites, des infections urinaires et des pneumonies. De manière plus rare, *S. agalactiae* est responsable d'arthrites septiques, de méningites et d'endocardites [81, 121, 154, 264, 270, 278, 320, 397].

1.3. S. agalactiae*: une bactérie pathogène vétérinaire*

Dans l'industrie laitière, les mammites bovines, cliniques et sub-cliniques, représentent une source de perte économique majeure. En 1970, *S. agalactiae* et *Staphylococcus aureus* représentaient les deux principaux pathogènes responsables de la perte de 10% du lait annuel [186]. *Streptococcus bovis* a été également relié à des cas de mammites chez les bovins, des endocardites [8], des méningites [283, 293, 374, 389] et est

associée à des cancers du colon chez l'Homme [319]. *Streptococcus uberis* est une bactérie commensale retrouvée en portage sain chez les bovins et provoque également des mammites. *S. uberis*, *Escherichia coli* et les staphylocoques à coagulase positive sont actuellement les causes majeures de mammites à travers le monde [33, 426]. Les mesures prophylactiques initiées pour diminuer l'apparition de mammites ont contribué à diminuer les pertes économiques liées aux cas d'infection à *S. aureus* et *S. agalactiae* mais ont eu peu d'effet sur les infections à *S. uberis* [426].

S. agalactiae devient également un pathogène émergent des poissons chez qui les infections sont caractérisées par des méningites et des septicémies [112, 117]. Les taux de mortalité et le nombre de cas sont très importants chez le cichlidé Tilapia du Nil [273]. De plus, *S. agalactiae* a été isolée lors d'infections chez des chiens, des chats, des chevaux, des dauphins, des varans émeraude, des crocodiles et des souris [25, 41, 117, 118, 171, 445, 446].

1.4. Relations entre souches d'origine humaine et vétérinaire

La diversité génétique est plus importante chez les souches humaines que chez les souches bovines. Il est à noter que les souches humaines et bovines appartiennent à des groupes phylogénétiques différents [24, 30, 327, 380, 390] même si une autre étude par comparaison génomique par hybridation sur puce à ADN a suggéré que la souche NEM316 serait proche d'une souche d'origine bovine [41]. Une grande partie des facteurs de virulence de *S. agalactiae* paraît être codée par des éléments génétiques mobiles et leur contenu en gènes est variable d'une souche à une autre. La présence de gènes spécifiques, notamment de virulence, permettrait aux souches de s'adapter plus précisément aux conditions rencontrées dans leur écosystème [41, 45, 327]. Il a été néanmoins montré que des souches de *S. agalactiae* pathogènes d'origine humaine peuvent provoquer des mammites chez les bovins et que des souches d'origine humaine étaient capables d'adhérer à des cellules épithéliales bovines [37, 191, 415]. Une étude a montré que l'éloignement phylogénétique entre une souche de *S. agalactiae* isolée d'un cas de méningite de poisson et

d'une souche humaine est plus fort que l'éloignement entre des isolats bovins et humains. Ceci pourrait s'expliquer par l'environnement très différent rencontré par cette souche [41].

De manière notable, une étude a montré que les souches ST17 se regroupent de manière plus proche avec la population des souches bovines que les autres souches humaines [24]. Néanmoins, ces résultats restent contreversés puisque d'autres auteurs ont montré que, sur une collection de souches humaines et bovines, aucune souche bovine ne s'apparente aux souches d'origine humaine ST17 [41]. La divergence dans les conclusions des deux études pourrait s'expliquer par l'émergence de nouveaux clones pouvant biaiser l'analyse [41].

Une comparaison par MLST (Multi Locus Sequence Typing) et sérotypage moléculaire de souches de *S. agalactiae* isolées de différents hôtes a montré que des souches isolées de dauphins et de poissons au Koweït avaient le même profil génétique qu'une souche d'origine humaine au Japon [117]. De plus, les souches prélevées chez les chiens et les chats paraissent plus proches des souches humaines que des souches bovines de *S. agalactiae*, ce qui pourrait indiquer un lien épidémiologique [446].

Les relations clonales entre les isolats de *S. agalactiae* paraissent se définir majoritairement en fonction de l'hôte et des relations épidémiologiques entre hôtes et non en fonction de la localisation géographique des souches.

1.5. Manifestations des infections au niveau cellulaire

Les manifestations cliniques des streptocoques sont variées. Bien que *S. agalactiae* soit étudiée depuis des décennies, peu de facteurs de virulence sont actuellement connus. *S. agalactiae* est capable de franchir les barrières que représentent les muqueuses et, une fois dans le système sanguin, peut survivre au système immunitaire pour se multiplier massivement. La virulence de *S. agalactiae* s'accompagne ainsi d'une adhésion et d'une invasion des macrophages et des cellules épithéliales et endothéliales [144, 340, 414]. Pour

ce faire, le pathogène doit produire différents facteurs de virulence et s'adapter aux modifications de son environnement. Différentes protéines intra- ou extracellulaires ont été décrites comme jouant un rôle majeur dans le pouvoir pathogène de *S. agalactiae*, notamment, dans l'étape clé qu'est l'adhésion. Des toxines formant des pores dans les membranes de l'hôte permettent l'entrée du pathogène dans les cellules cibles ainsi que sa dissémination. D'autres facteurs de virulence jouent un rôle dans l'échappement aux défenses de l'hôte en empêchant la reconnaissance de *S. agalactiae* par l'hôte comme non soi, en augmentant la survie intra-macrophages et en clivant des composants du sérum ou des protéines humaines. *S. agalactiae* peut résister à l'action des peptides antimicrobiens cationiques (AMP) produits par les cellules du système immunitaire inné de l'hôte notamment en modifiant la charge de sa surface cellulaire.

La persistance des infections humaines et vétérinaires à *S. agalactiae* souligne le besoin de mesures prophylactiques et thérapeutiques supplémentaires. La mise en place de ces mesures passe par une meilleure compréhension du cycle pathogène et donc par l'étude des moyens mis en jeu par *S. agalactiae* pour s'adapter à différentes niches écologiques sur le plan moléculaire et cellulaire.

2. Caractéristiques génomiques de *S. agalactiae*

2.1. Avancées sur l'acquisition de données génomiques de S. agalactiae

Les génomes de deux sérotypes capsulaires de *S. agalactiae* ont été entièrement séquencés pour la première fois en 2002 : la souche NEM316 responsable d'un cas fatal de septicémie [146] et la souche 2603 V/R [401]. En 2005, 6 génomes supplémentaires d'isolats humains de *S. agalactiae* ont été rendus disponibles : génome de la souche A909, isolée en 1934 d'un cas de septicémie; de la souche CBJ111, isolée en 1990 d'un prélèvement sanguin; de la souche H36b; de la souche 18RS21; de la souche COH1 isolée de sang et de la souche 515 isolée du fluide cérébrospinal d'un nouveau né en 1977 [400]. En 2011, la première

souche de *S. agalactiae* isolée d'un cas de mammite en 1987 a été séquencée (souche FSL S3-026) [99, 327]. Les caractéristiques des souches sont notées dans le tableau 3.

Tableau 3. Sérotypes capsulaires, complexes clonaux et numéros d'accession des souches séquencées de *S. agalactiae*.

Souches	Sérotype capsulaire	Complexe clonal	N° d'accession
NEM316	III	ST23	NC_004368
2603 V/R	V	ST110	NC_004116
A909	Ia	ST7	NC_007432
CJB111	V	ST1	NZ_AAJQ00000000
H36b	Ib	ST6	NZ_AAJS00000000
18RS21	II	ST19	NZ_AAJO00000000
COH1	III	ST17	NZ_AAJR00000000
515	Ia	ST23	NZ_AAJP00000000
FSL S3-026	III	ST67	AEXT01000000

La taille des génomes séquencés des souches humaines atteint environ 2,2 Mb et ils codent jusqu'à 2175 protéines [146, 400, 401] tandis que le génome de la souche d'origine bovine mesure 2,4 Mb et code 2334 protéines [327]. Le pourcentage génique en G+C est respectivement d'environ de 35,6 % et 36,1% pour les souches pathogènes humaines et bovine [146, 327]. Neuf pourcents seulement du génome de la souche NEM316 est unique à *S. agalactiae* et 55 % des gènes prédits possèdent un orthologue chez *S. pyogenes* ce qui représente un large réservoir commun entre ces deux espèces. La moitié des gènes ne possédant pas d'orthologues chez *S. pyogenes* se regroupent sous forme d'îlots génomiques dont beaucoup pourraient coder des facteurs de virulence [146].

2.2. Flexibilité du génome de S. agalactiae

L'accès aux séquences des génomes de 8 souches de *S. agalactiae* d'origine humaine appartenant aux principaux sérotypes responsables d'infections a permis d'observer la diversité du pool génique variable chez ces différentes souches [400]. Le génome conservé, dit « core génome », de *S. agalactiae* (humain et bovin) représente 80 % du génome total, dit « pan génome », comprenant l'intégralité des gènes de toutes les souches. La partie flexible du génome de *S. agalactiae* représente pour sa part 20 % du pan génome. Elle compte notamment soixante-neuf îlots génomiques présents dans les génomes des 8 souches d'origine humaine, dont certains sont caractérisés par un pourcentage en G+C divergeant du « core » génome (Figure 7) [400].

Des travaux combinant des approches *in vitro* et *in silico* ont mis en évidence la dynamique du génome de *S. agalactiae* et ont permis de suggérer une histoire évolutive [42]. Des fragments d'ADN pouvant avoir une taille jusqu'à 334 kb sont capables de transférer expérimentalement par conjugaison à partir de multiples sites d'initiation [42]. Il a été montré *in silico* que les génomes des huit souches séquencées de *S. agalactiae* sont composés d'une mosaïque de larges fragments chromosomiques provenant de différents ancêtres. Ces éléments suggèrent que la dynamique du génome de *S. agalactiae* proviendrait, entre autre, d'échange d'une importante quantité de matériel génétique dans son milieu naturel entre souches de *S. agalactiae* ou avec une autre espèce [42].

Trois cent cinquante huit gènes ont été retrouvés chez une seule des 8 souches humaines. Beaucoup de ces gènes souche-dépendants sont situés sur des éléments génétiques mobiles putatifs. Chaque séquençage supplémentaire de souches de *S. agalactiae* permettrait de détecter 33 nouveaux gènes spécifiques d'une souche [400].

183 gènes sont spécifiques à la souche de *S. agalactiae* d'origine bovine [327]. Une grande quantité de séquences d'insertion est présente chez cette souche (97) par rapport aux 8 souches humaines (20). La très forte proportion de séquences d'insertion dans le génome (4.3%) pourrait s'expliquer par un phénomène de goulot d'étranglement résultant d'une isolation de la population [327]. Ces travaux suggèrent que la probabilité de

réarrangements génomiques est plus élevée chez la souche bovine que chez les souches isolées de portage humain ou d'infections humaines [327].

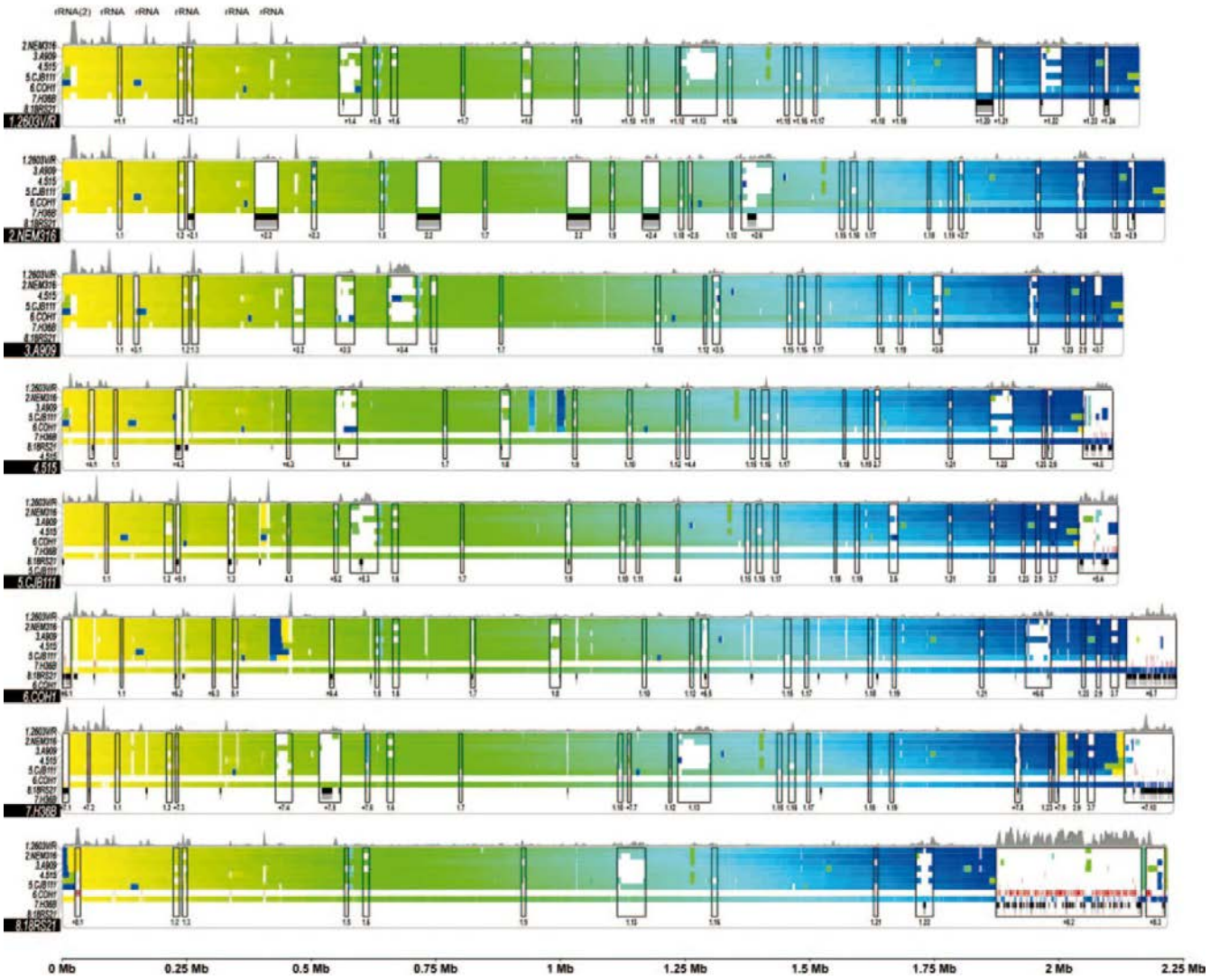


Figure 7. Alignement des pan génomes des souches de *S. agalactiae* d'origine humaine séquencées (tiré de [400]).

Les 8 génomes ont été comparés en utilisant les analyses COG et NUCMER. Chaque génome (nom de la souche surligné) est coloré avec un gradient allant du jaune (nucléotide 1) au bleu (fin). Les différences de couleur entre une séquence référence et les autres génomes indiquent des régions codant des protéines qui ont été réarrangées. Les segments non colorés indiquent des régions codantes dans lesquelles les gènes ne sont pas conservés. Les contigs où les gènes n'ont pas d'homologues par l'analyse NUCMER sont répartis en blocs rouges.

Prises collectivement, toutes ces données suggèrent que le « pan » génome de *S. agalactiae* est ouvert mais que la possibilité de transfert génétique entre souches de *S. agalactiae* d'origine humaine ou vétérinaire paraît faible même si des transmissions peuvent avoir lieu entre espèces en cas de contacts prolongés [256, 400]. Il est à noter que la différenciation observée entre les souches humaines et bovines paraît clairement liée à des mécanismes de dynamique génomique via des transferts horizontaux. La mise en évidence de 2 cas de transfert de gènes entre la souche FSL S3-026 et d'autres espèces pathogènes bovines (*S. uberis* et *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*) suggère la possibilité d'un taux plus élevé de transfert horizontal entre différentes espèces de streptocoques évoluant dans le même environnement qu'entre souches de *S. agalactiae* provenant d'hôtes différents [327]. Dans ce contexte, le transfert inter-espèce pourrait effectivement être plus avantageux pour *S. agalactiae* puisqu'il lui permettrait d'acquérir des fonctions utiles dans le milieu dans lequel la souche évolue : notamment des systèmes de résistance différents en fonction des antibiotiques utilisés en milieu vétérinaire et en milieu hospitalier ou encore des facteurs de virulence adaptés à un hôte spécifique.

2.3. Diversité des ICE chez S. agalactiae

L'analyse des ICE chez 8 souches séquencées a révélé la diversité et la plasticité des éléments intégrés chez *S. agalactiae*. Trente-cinq ICE ou éléments apparentés sont répartis entre quinze différents loci au sein des génomes des 8 souches étudiées (Figure 8). La plupart des loci d'intégration de ces éléments sont des gènes codant des ARNt ou des protéines ribosomiques [40]. Tn*916* et Tn*GBS* sont ainsi retrouvés à 4 sites d'insertion différents (Figure 8). Douze des éléments détectés possèdent un site *attI* interne ce qui suggère que ce sont des éléments composites provenant de l'accrétion de différents éléments génétiques mobiles [307].

Les éléments intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARNt Lysine illustrent bien la plasticité des ICE et leur prévalence puisque toutes les souches séquencées étudiées de

S. agalactiae possèdent un élément à ce locus (Figure 9) [40]. De plus, beaucoup de protéines codées par les éléments intégrés à ce locus possèdent une identité de séquence forte par rapport à des protéines produites par *S. pyogenes*, *S. suis*, *S. pneumoniae* et *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* [307].

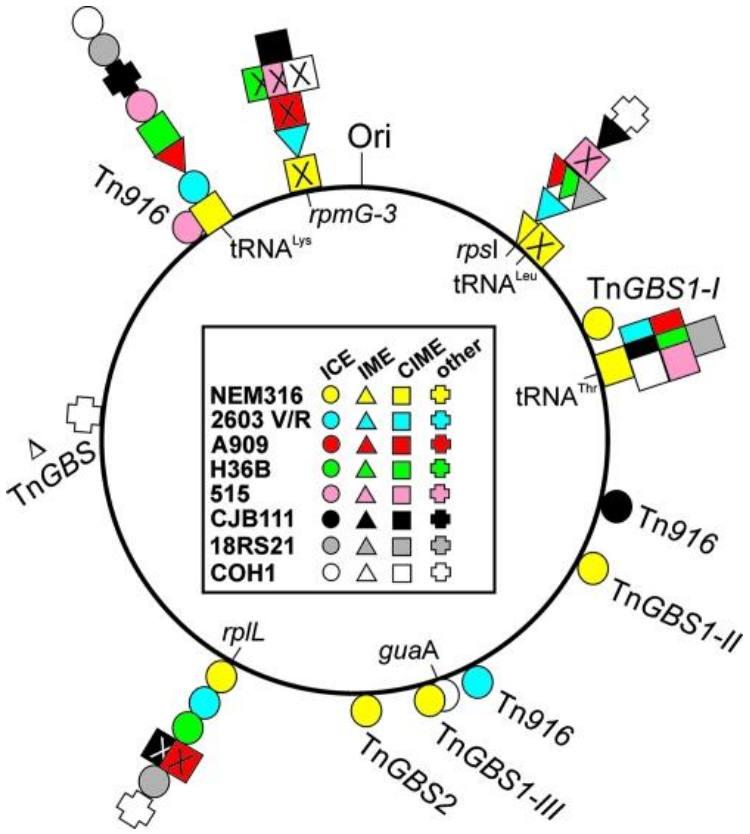


Figure 8. Carte génomique indiquant les positions des ICE ou éléments en dérivant chez 8 souches séquencées étudiées de *S. agalactiae* (tiré de [40]).

Les ICE apparaissent sous formes de cercles, les IME sous forme de triangles, les CIME sous forme de carrés (marqués avec une croix lorsqu'ils portent un gène codant une intégrase) et les autres îlots génomiques sous forme de croix. Les éléments qui sont identiques chez différentes souches apparaissent côte à côte sur la même ligne.

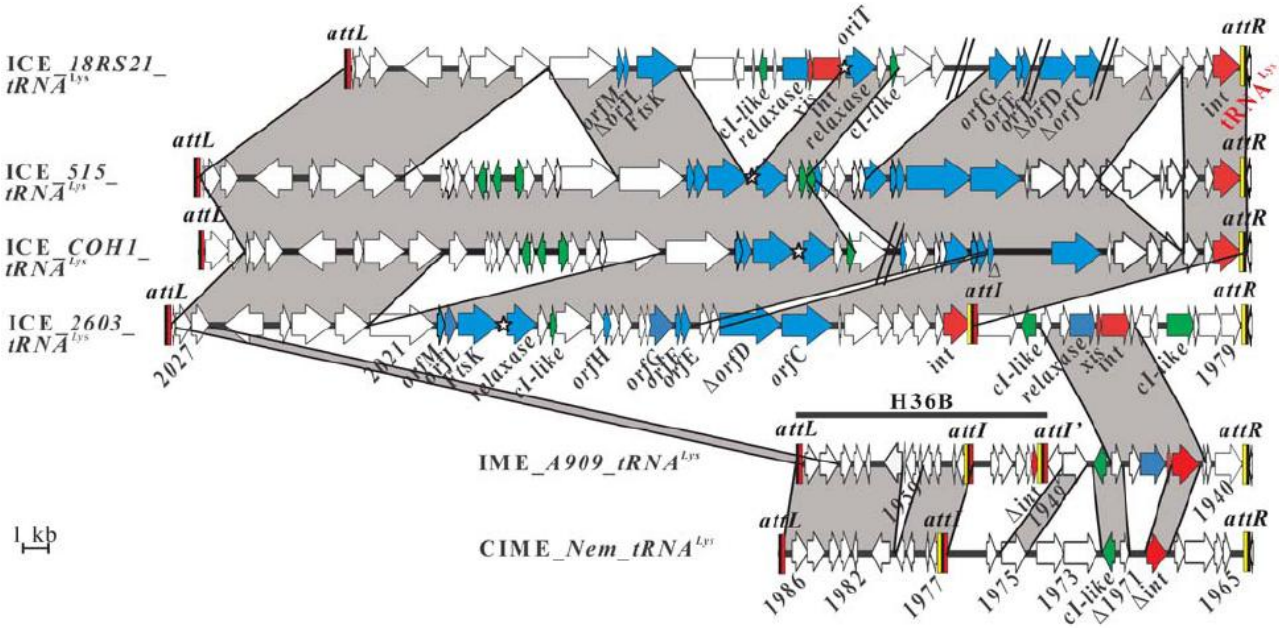


Figure 9. Schéma représentant la diversité et la plasticité des éléments intégrés à l'extrémité 3' d'un gène codant un ARNt Lysine chez 7 des souches séquencées de *S. agalactiae* (tiré de [40]).

Des analyses par puce à ADN utilisant comme matrice l'ADN génomique de 36 souches de *S. agalactiae* d'origine bovine et humaine, appartenant à différents complexes clonaux ont confirmé la prévalence et la diversité des ICE et des éléments génétiques apparentés. Les profils d'hybridation obtenus pour les éléments génétiques intégrés à l'extrémité 3' du locus ARNt lysine reflètent encore une fois la diversité de ceux-ci chez des souches de provenances diverses (Figure 10). Ces travaux suggèrent fortement l'acquisition par transfert horizontal de tels éléments par différentes souches de *S. agalactiae* provenant d'hôtes distincts [40].

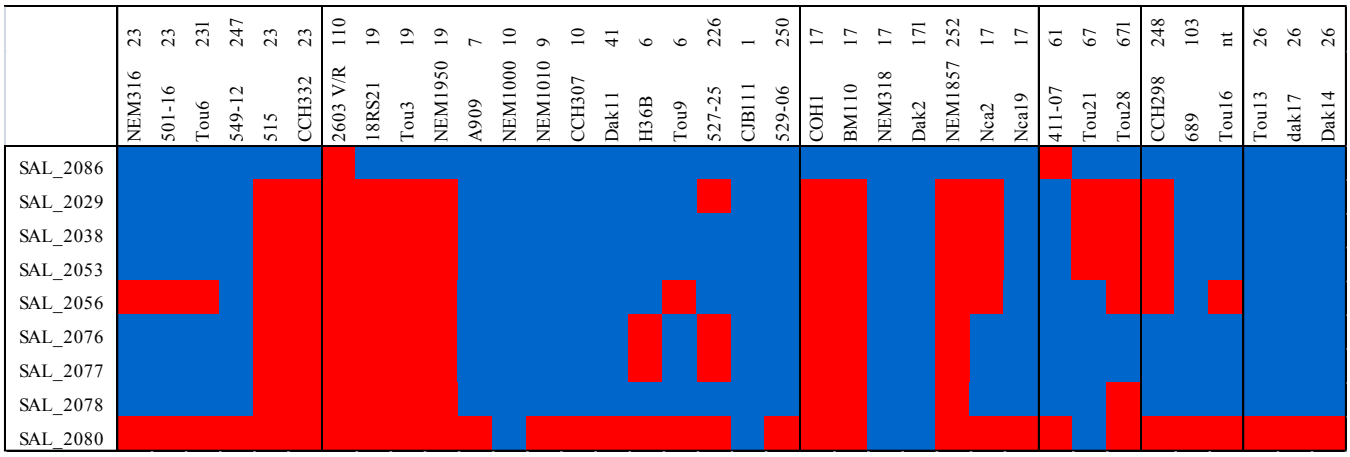


Figure 10. Profil d'hybridation sur puce à ADN de l'ADN génomique de 36 isolats bovins et humains de *Streptococcus agalactiae* (tiré de [40]).

Neuf gènes de l'ICE intégré à l'extrémité 3' du gène ARNt lysine de la souche 515 de S. agalactiae (*ICE*_515_tRNA^{Lys}) *ont été recherchés. Les signaux positifs d'hybridation sont représentés par des carrés rouges tandis que l'absence d'hybridation est représentée par un carré bleu.*

Par ailleurs, le gène codant l'intégrase de l'ICE intégré au locus d'un gène codant un ARNt lysine a été recherché parmi les séquences d'une collection de souches provenant d'isolats bovins de *S. agalactiae* (76 souches), de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (32 souches) et de *S. uberis* (101 souches). Celle-ci s'est révélée positive dans 51% des cas pour *S. agalactiae*, 16% pour *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* et 22% pour *S. uberis* [161]. Ceci indiquerait un transfert de ces éléments entre plusieurs espèces de streptocoques comme le suggérait déjà l'analyse par puce à ADN. Aucune donnée supplémentaire n'est disponible sur les éléments intégrés à ce locus, bien que ceux-ci soient répandus. Or, plusieurs gènes pourraient coder des protéines pouvant jouer un rôle dans la virulence des souches. Une analyse plus approfondie de ces éléments est donc nécessaire.

III. Diversité des facteurs de virulence codés par le « core génome » de *S. agalactiae*.

1. Prévalence et régulation des facteurs de virulence

1.1. Diversité des facteurs de virulence

S. agalactiae est capable de s'adapter à une diversité d'environnements aux paramètres physiologiques variés. Par exemple, *S. agalactiae* colonise le tractus vaginal féminin où la bactérie doit s'adapter à des pH acides (pH= 4.5) mais se maintient également dans le sang (pH= 7.3) [294, 393]. *S. agalactiae* possède donc de nombreuses fonctions adaptatives et de virulence lui permettant de survivre et de s'adapter à différentes niches écologiques et à différents hôtes [101].

Le séquençage des génomes de *S. agalactiae* appartenant à différents sérotypes et le développement d'outils moléculaires ont permis de mieux comprendre la stratégie mise en place par le pathogène durant l'infection et de révéler de nouveaux facteurs de virulence. *S. agalactiae* produit : (i) une multitude de protéines permettant l'adhésion aux cellules de l'hôte ; (ii) deux toxines formant des pores dans les membranes notamment des cellules pulmonaires, des érythrocytes et des macrophages pour faciliter sa survie, sa dissémination et l'invasion de cellules eucaryotes (β-hémolysine/cytolysine et facteur CAMP) ; (iii) des facteurs permettant l'échappement au système immunitaire de l'hôte (capsule polysaccharidique, peptidase ScpB, peptidase C5a, manipulation et dégradation du cytosquelette des phagocytes) ; (iv) des systèmes permettant sa survie en conditions de stress oxydant (superoxyde dismutase) ou encore (v) lui conférant une résistance aux peptides antimicrobiens (production de pili et modification de la charge à la surface cellulaire) (Figure 11) [101, 124, 213, 232, 252, 320, 326, 395].

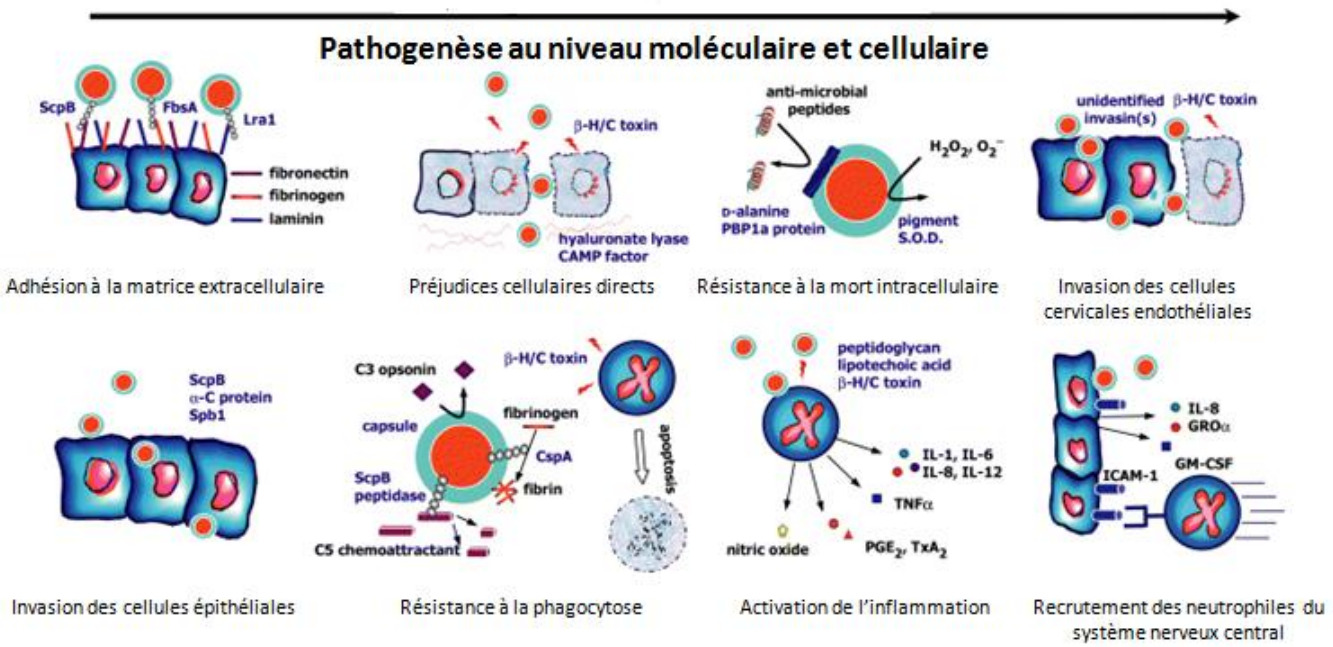


Figure 11. Etapes des infections par *S. agalactiae* chez les nouveaux nés, au niveau moléculaire et cellulaire (tiré de [101]).

β-H/C, beta-hémolysin/cytolysin; S.O.D., superoxde dismutase; IL, interleukin; TNFα, tumour necrosis factor-alpha; PGE, prostaglandine E; TxA2, thromboxane A; GROα, Growth related oncogen-alpha; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

1.2. Pouvoir adaptatif de S. agalactiae

Le succès de l'infection de *S. agalactiae* passe par une régulation appropriée de la production de différents facteurs en réponse aux modifications de l'environnement. Des analyses transcriptomiques de *S. agalactiae* montrent une réponse rapide à la croissance dans différents environnements. A titre d'exemple, l'adhésion de *S. agalactiae* varie avec le pH rencontré. Ainsi, l'adhésion à des cellules épithéliales est augmentée de 6 à 20 fois à pH= 4, ce qui est similaire au pH vaginal, par rapport à un pH neutre, rencontré au niveau sanguin [294, 393]. Une régulation différente est mise en place selon le liquide physiologique où se trouve la bactérie. En présence de liquide amniotique, l'expression des systèmes à 2 composants et d'autres régulateurs varie fortement et l'expression de la β-hémolysine est

induite tandis que l'expression de gènes codant des protéines permettant l'adhésion de *S. agalactiae* à la fibronectine, au collagène et à la laminine est inhibée [370]. La croissance en présence de sang induit quant à elle l'expression de quelques gènes codant des protéines d'adhésion (FbsA, BibA et Bsp) [272]. A 40°C, la production des hémolysines (facteur CAMP et β-hémolysine) est stimulée [272]. Les gènes du métabolisme et de réponse aux stress évoluent également en fonction de l'environnement dans lequel est placée la bactérie. Les opérons permettant la production de bactériocines et les gènes codant des facteurs de virulence sont souvent régulés en fonction de la densité cellulaire.

Etant une bactérie anaérobie aérobie facultative, *S. agalactiae* est capable d'avoir un métabolisme fermentaire aussi bien que respiratoire en fonction des conditions environnementales. Certaines protéines adhésives de *S. agalactiae* ne sont produites que lors du métabolisme fermentaire. *S. agalactiae* ne possède pas de voie de biosynthèse de l'hème et des quinones et utilise ceux de son hôte pour activer la cytochrome CydA oxydase nécessaire à la mise en place de la voie respiratoire pour l'acquisition d'énergie. En plus d'être la source principale de fer utilisée pour de nombreuses activités enzymatiques de *S. agalactiae*, l'utilisation de l'hème a pour conséquence d'augmenter fortement sa compétitivité (croissance doublée) et est nécessaire pour sa virulence complète chez la souris [122, 229, 440-442]. Ces résultats suggèrent l'importance de la voie respiratoire dans la virulence de *S. agalactiae* [440, 441]. Néanmoins, à forte concentration, l'hème a des effets toxiques pour la cellule bactérienne. Ainsi, la voie respiratoire semble être ajustée finement pour permettre une croissance optimale [122, 229, 441].

La souche NEM316 pourrait produire jusqu'à 107 régulateurs transcriptionnels de manière similaire à *L. lactis* et 3 facteurs sigma putatifs (σ^A, ComX et un facteur sigma de type ECF) (120). La quantité de régulateurs transcriptionnels mis en jeu, incluant une vingtaine de systèmes à deux composants, pourrait être un élément permettant à *S. agalactiae* de s'adapter rapidement et efficacement à des modifications de son environnement. *S. agalactiae* possède plus de ces systèmes que *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* et *L. lactis* (respectivement 14, 13 et 8) [146].

Les gènes du locus *rgf*BDAC de *S. agalactiae* permettraient la régulation des composants présents à la surface des bactéries en fonction de la densité cellulaire (Figure 12). La mutation du gène *rgf*C altère l'adhésion de *S. agalactiae* au fibrinogène [381].

D'autre part, le système à 2 composants CovRS joue un rôle important dans la virulence puisqu'un mutant de l'un ou l'autre des deux gènes entraîne une diminution de la virulence des souches. CovRS induit l'expression de la peptidase C5a, des protéines formant le pili et inhibe la production de la β-hémolysine, du facteur CAMP et de FbsB et BibA (Figure 12). Il a également été montré que le régulateur CovRS est responsable de la régulation de l'adhésion de *S. agalactiae* sur des matières inertes ou des composants de l'hôte (cellules épithéliales et matrice extracellulaire) [303]. Le régulateur permet également de répondre à des stress osmotiques, oxydatifs et acides et de survivre intracellulairement dans les phagosomes des macrophages [85, 194, 195, 220, 232].

De plus, Stk1 est un régulateur transcriptionnel appartenant à la classe des kinases sérine/thréonine (Figure 12). Stp1 est le capteur associé de Stk1 qui permet sa phosphorylation. Stk1 régule l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant et à la croissance dans le sang. Ce régulateur est important pour la ségrégation des cellules et la virulence lors de modèles d'infection de septicémie. Stk1 peut phosphoryler le système à deux composants CovRS ce qui inhibe son action [241]. Ainsi, Stk1 entraîne l'induction de l'expression de la β-hémolysine mais peut néanmoins inhiber celle du facteur co-hémolytique CAMP [321]. Dans cette configuration, *S. agalactiae* produit plus de β-hémolysine ce qui augmente sa capacité à envahir les cellules endothéliales micro-vasculaires du cerveau humain (hBMEC) [51, 232, 241, 321, 322, 366].

Le régulateur transcriptionnel RovS (famille des régulateurs de type Rgg, régulateurs transcriptionnels globaux), influence l'expression de nombreux facteurs de virulence (capsule polysaccharidique et facteurs d'adhésion au fibrinogène et à des cellules épithéliales pulmonaires) (Figure 12). Il provoque l'inhibition de l'expression d'une protéine impliquée dans l'adhésion au fibrinogène (FbsA). Par ailleurs, RovS induit l'expression du gène *sodA* qui code la superoxyde dismutase de *S. agalactiae* (Figure 12) [139, 348]. Un important mécanisme d'élimination des bactéries par les phagocytes implique la production

de métabolites d'oxygène hautement réactifs qui causent de sévères dommages aux cellules (anions superoxydes, péroxyde d'hydrogène et radicaux hydroxyles). Chez *S. agalactiae*, l'un des mécanismes de lutte contre ce stress est la superoxyde dismutase, qui nécessite du manganèse (Mn^{2+}) comme co-facteur, puisque cette espèce ne possède pas de catalase. RovS, en activant l'expression de *sodA*, pourrait ainsi permettre une meilleure résistance au stress oxydant et une survie accrue au sein des macrophages [313].

Le régulateur Rga, quant à lui, induit l'expression d'une sous-unité d'un pili (PilA) et une protéine de surface (Srr-1) et réprime l'expression du gène codant une autre protéine de surface (FbsA) [347]. Rga a un impact positif sur l'adhésion aux cellules épithéliales Hep-2 et à la kératine 4 mais négatif sur l'adhésion à des cellules épithéliales pulmonaires et au fibrinogène [347].

De manière intéressante, le régulateur Rgf régule négativement la transcription du gène *fbsA* et positivement le gène *fbsB*, ces gènes étant tout les deux impliqués dans l'adhésion au fibrinogène [2].

Le système à deux composants CsrRS réprime directement et indirectement, par l'inhibition du régulateur Ape1, la formation du pilus chez la souche 2603 V/R de *S. agalactiae.* De plus, la formation du pili est en partie régulée en fonction du pH de manière indépendante de CsrRS et Ape1 [193].

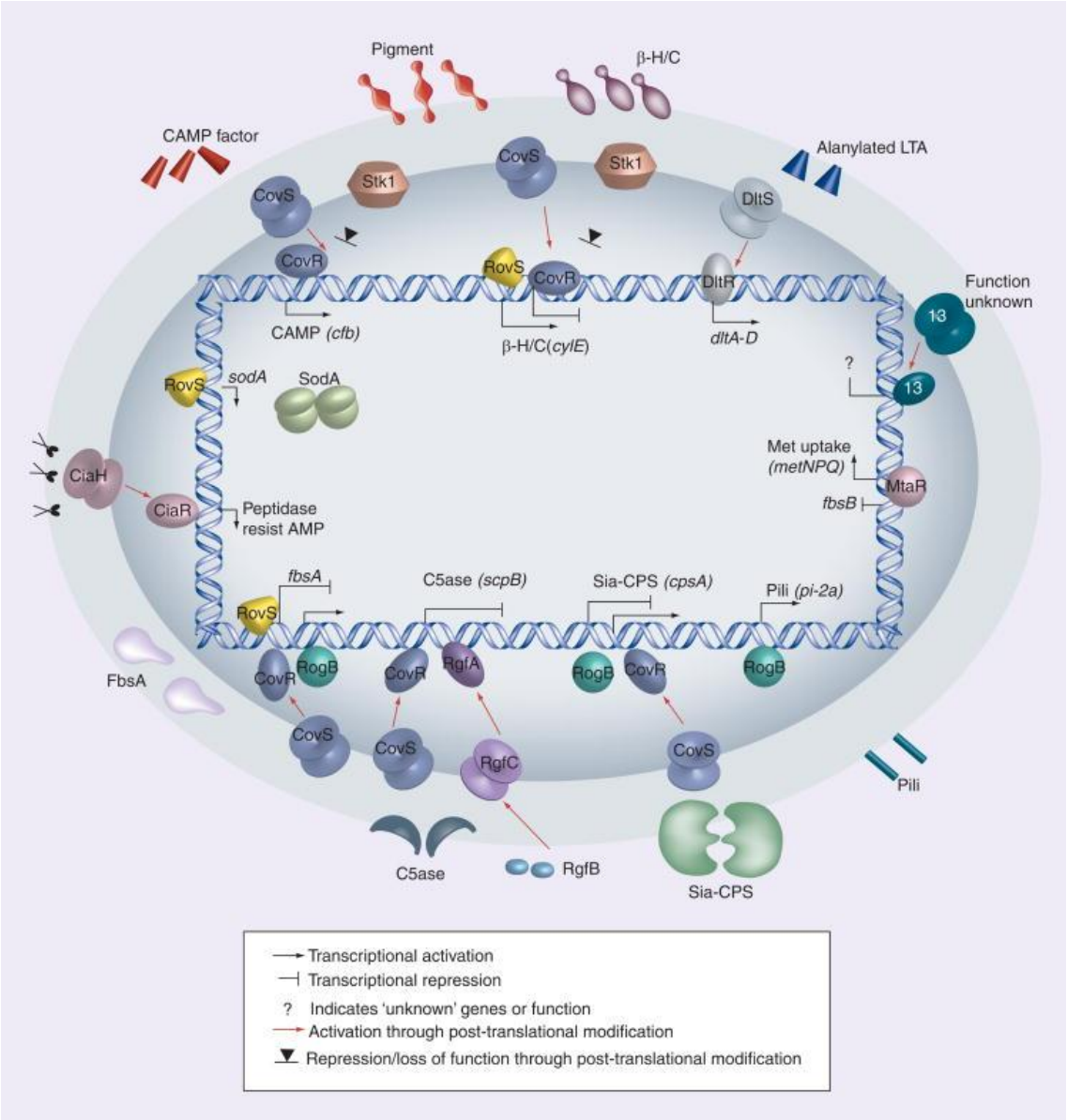


Figure 12. Régulation des facteurs de virulence importants pour la virulence de *S. agalactiae* (tiré de [320]).

Les systèmes à 2 composants comprenant les régulateurs transcriptionnels CovR, RgfA, CiaR et DltR et leurs capteurs associés CovS, RgfC, CiaH et DltS, régulent la transcription des toxines et autres facteurs contribuant à la virulence de S. agalactiae*. Ceux-ci incluent les toxines formant des pores dans les membranes eucaryotes et les facteurs permettant l'adhésion, l'évasion du système immunitaire et la résistance aux défenses de l'hôte. Les gènes régulés par 13 autres systèmes à 2 composants qui sont conservés parmi les différents sérotypes capsulaires de* S. agalactiae *codent des fonctions inconnues.* S. agalactie *code également des enzymes de signal retrouvées communément chez les eucaryotes, telle que la sérine thréonine kinase Stk1 et la phosphatase associée Stp1 qui régule également l'expression des toxines formant des pores dans les membranes. Sur les 6*

régulateurs standalones, la fonction de 3 seulement (MtaR, RovS et RogB) a été étudiée. Les séquences génomiques indiquent que S. agalactiae *codent plus de 107 molécules régulatrices, la fonction de peu étant connue. β-H/C: β-hémolysine/cytolysine; AMP: peptides antimicrobiens; C5ase: peptidase C5a ; CAMP: Christie Atkins Munch Peterson; FbsA: protéine liant le fibrinogène; GBS: streptocoque du Groupe B; LTA: acide lipotéichoïque; Met: Methionine; Sia-CPS: Capsule sialique polysaccharidique; SodA: Superoxyde dismutase.*

Par ailleurs, *S. agalactiae* est capable d'exploiter des composés produits par l'hôte à son avantage afin d'assurer le succès de l'infection. Ainsi, *S. agalactiae* utilise la phospholipase $A_2\alpha$ de l'hôte, chez qui elle est impliquée dans l'hydrolyse d'un acide gras, afin d'envahir les cellules endothéliales microvasculaires du cerveau et pénétrer *in vivo* celui-ci [267].

La variété des régulateurs transcriptionnels permet une régulation fine de la production des facteurs de virulence de *S. agalactiae* ce qui lui permet de s'adapter efficacement aux modifications de son environnement.

2. Etape clé de l'infection : l'adhésion à l'hôte

2.1. Propriétés adhésives de S. agalactiae

2.1.1. Mécanisme d'adhésion et forces impliquées

L'étape d'adhésion des bactéries pathogènes aux cellules eucaryotes ou à un substrat est la première étape dans la pathogénicité et l'invasion de l'hôte (Figure 13). *S. agalactiae* est capable d'adhérer à, et d'envahir, un grand nombre de cellules de différents hôtes dont les cellules épithéliales vaginales, rectales et intestinales et les cellules épithéliales et endothéliales pulmonaires et du cerveau [144, 339, 340, 362, 395].

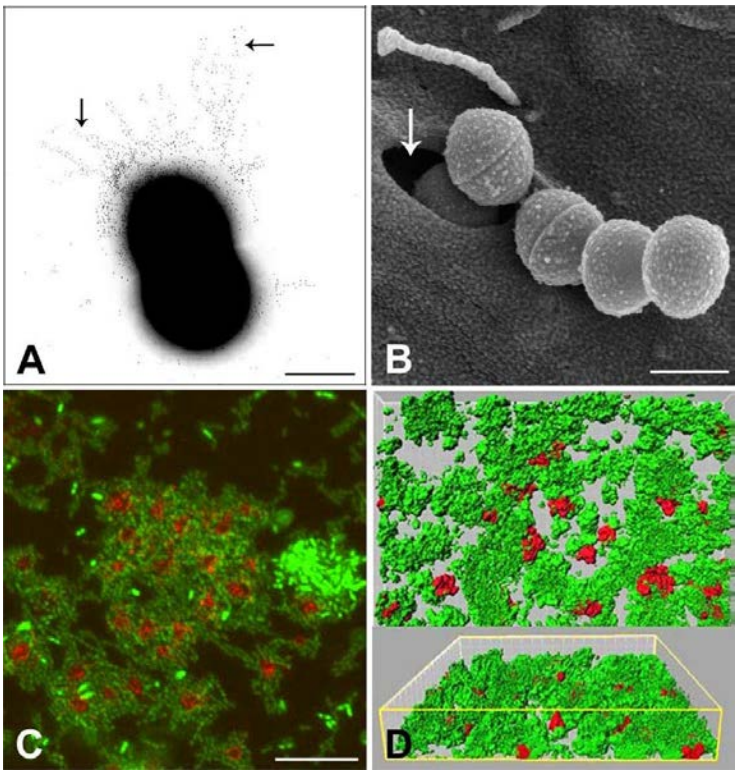


Figure 13. Exemples d'interactions streptocoques / hôte (tiré de [286]).

(A) Pili (flèches) de GBS marqués aux particules d'or avec des anticorps issus de la sous-unité du pilus PI-2a, barre, 0.5 µm. (B) Internalisation de S. pyogenes *par des cellules épithéliales via la formation de cavéoles (flèche), barre, 1 µm. (C) Agrégation de plaquettes humaines (en rouge) (marquage de la phalloïdine) par* S. sanguinis *(en vert), barre, 20 µm. (D) Biofilm dynamique de* S. gordonii *et* Veillonella atypica *(24h) montrant la perspective XY et une projection en 3 dimensions par imagerie confocale. Sous flux salivaire,* V. atypica *est incapable de former des biofilms mais est apte à s'intégrer à des biofilms mixtes incluant des streptocoques.*

Des études ont montré que l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales ciblait des composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, le fibrinogène, le collagène et la laminine [242, 286, 381, 395]. Les éléments de la matrice extracellulaire sont des composants permettant l'organisation structurale des cellules eucaryotes par leurs multiples sites de fixation aux cellules. Ils possèdent souvent un rôle régulateur et permettent de protéger mécaniquement les tissus contre les pathogènes invasifs [367].

La fibronectine, qui est l'un des composants de la matrice extracellulaire, a un rôle dans l'adhésion cellulaire et est retrouvée dans le plasma [173]. De manière très intéressante, *S. agalactiae* est capable de lier la fibronectine immobilisée, ce qui facilite la colonisation des muqueuses, mais pas la fibronectine soluble [59]. La fibronectine soluble peut agir de manière similaire à une opsonine. Les opsonines représentent l'ensemble des substances qui se lient à des antigènes favorisant la phagocytose des bactéries par des cellules du système immunitaire. La caractéristique de *S. agalactiae* de ne pas lier celle-ci pourrait être un mécanisme efficace de résistance pour éviter la reconnaissance par les phagocytes [59, 173].

S. agalactiae est également capable, de façon variable selon la souche, de lier le fibrinogène qui est retrouvé en concentration élevée dans le plasma humain, mais qui est également un composant de la matrice extracellulaire [104, 158, 355]. Le fibrinogène est clivé par la thrombine en fibrine qui est le principal composant permettant la formation des caillots sanguins [158]. La production de fibrinogène est régulée positivement en cas d'inflammation ou de stress, tels que lors d'infections systémiques [330]. Le fibrinogène interfère également avec l'activation du complément et protège de l'opsonophagocytose les pathogènes qui l'accumulent à leur surface [70, 355, 432]. La capacité d'adhésion des souches de *S. agalactiae* est variable selon leur lieu d'isolement. Par exemple, des isolats prélevés du fluide cérébrospinal de nouveaux nés adhèrent plus au fibrinogène que des souches d'origine vaginale ou isolées du fluide gastrique de nouveaux nés [336].

La laminine et le collagène sont deux glycoprotéines multifonctionnelles qui sont les principaux constituants de la lame basale. La lame basale est un assemblage de protéines et de glycoprotéines qui permet l'adhérence des cellules épithéliales aux tissus conjonctifs

sous-jacents. La laminine et le collagène constituent également une couche protectrice autour des capillaires sanguins et font partie de la matrice extracellulaire. Une étude a montré que l'adhésion de *S. agalactiae* au collagène représentait une étape critique pour permettre l'interaction avec une intégrine exprimée à la surface des cellules endothéliales du cerveau [7]. Néanmoins, très récemment, une étude a remis en question l'importance du rôle de l'adhésion au collagène dans la virulence de *S. agalactiae* puisqu'aucune des 10 souches de *S. agalactiae* étudiées n'était capable de lier le collagène [104].

La paroi bactérienne représente un organelle dynamique qui ne possède pas uniquement des fonctions de maintien de l'intégrité des cellules mais est l'élément impliqué dans l'adhésion aux matières inertes et/ou vivantes [259]. La paroi bactérienne des bactéries à coloration Gram positive est composée principalement de peptidoglycane (maillage complexe de chaînes de sucres maintenues par des ponts peptides) mais également d'acides téichoiques, de protéines et de polysaccharides (Figure 14). De manière intéressante, les propriétés adhésives des streptocoques seraient majoritairement dues aux protéines ancrées à la surface cellulaire [286]. *S. agalactiae* possède quant à elle de nombreux gènes qui codent des protéines extracellulaires. Le génome de la souche NEM316 contient notamment 30 ORF possédant un motif signal d'excrétion permettant l'exposition de la protéine à la surface cellulaire, 5 ORF putatifs codant pour des sortases et 71 gènes putatifs codant pour des protéines sécrétées [45, 146].

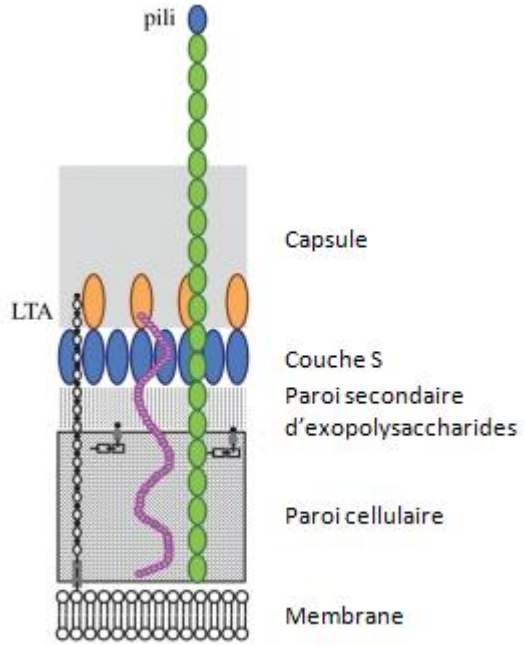


Figure 14. Structure de l'enveloppe des bactéries à coloration Gram positive (ex de *Bacillus cereus* et *B. anthracis*) (tiré de [352]).

Les bactéries à coloration Gram positive élaborent une membrane plasmique et une épaisse couche de peptidoglycane. Les polysaccharides secondaires de la paroi sont attachés au peptidoglycane. En plus des protéines ancrées dans la paroi, le peptidoglycane fonctionne également comme un point d'ancrage pour la capsule et les pili.

Chez *S. pyogenes,* l'adhésion à des cellules humaines serait réalisée en deux étapes (Figure 15). La première étape, réversible, permet à la bactérie de lier de nombreux substrats par des interactions hydrophobes de faible spécificité, notamment par l'intermédiaire des acides lipotéichoiques. La deuxième étape met en jeu des protéines plus spécialisées permettant ainsi une liaison stable au substrat [167]. Le deuxième type de protéines mis en jeu dans ce mécanisme est plus spécifique d'un substrat particulier. Ce modèle pourrait également être applicable à d'autres streptocoques dont *S. agalactiae* et *S. bovis* [167, 286] .

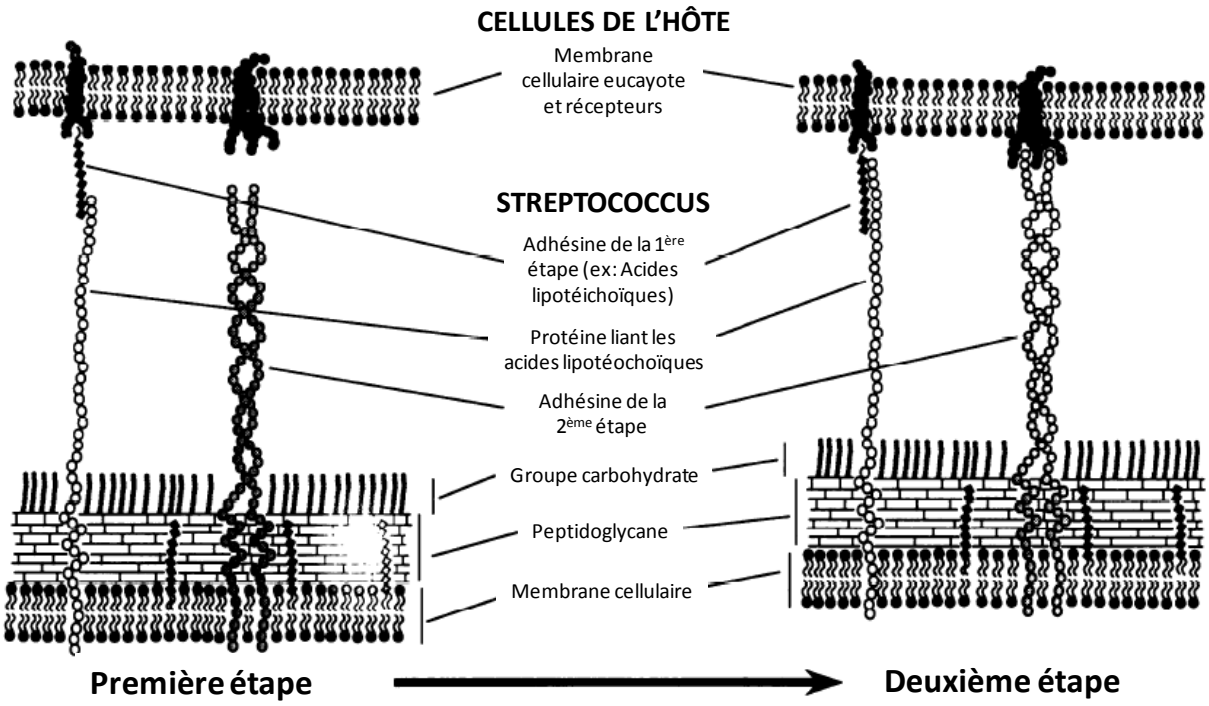


Figure 15. Schéma représentant le modèle en deux étapes de l'adhésion des streptocoques à des substrats (tiré de [167]).

Le modèle suggère que la première étape est fragile et réversible et est liée à des interactions hydrophobes, comme par le biais des acides lipotéichoiques chez S. pyogenes*. Cette première étape serait nécessaire pour la mise en place de la deuxième qui implique des partenaires plus spécifiques tels la protéine M de* S. pyogenes *et son récepteur ou des protéines liant la fibronectine et la fibronectine. La deuxième étape permettrait d'augmenter la force d'adhésion.*

2.1.2. Un cas particulier : la formation de biofilm

S. agalactiae est également capable de former des biofilms bactériens mixtes ou non. Un biofilm correspond à une communauté dense et structurée de bactéries enchâssées dans une matrice de polymère complexe (glucidique et/ou protéique et nucléique) qui adhère à une surface biotique ou abiotique (Figure 16). Les biofilms constituent une protection contre les stress environnementaux, les agents antimicrobiens et les défenses de l'hôte. De 65 % à 80% des infections bactériennes pourraient être liées à la formation de biofilms [86, 225,

226, 286, 308, 350]. De plus, la structure du biofilm permettrait de faciliter les échanges génétiques par transfert horizontal entre bactéries soit par transformation, conjugaison ou via des nanotubes [6, 308].

La première étape de formation d'un biofilm est l'attachement initial d'une bactérie à un substrat ou à un support (Figure 17, étapes 1 et 2). Celle-ci produit des composants exopolysaccharidiques permettant l'intégration d'autres bactéries (Figure 17, étape 3). L'attachement primaire, réversible, est souvent lié à des conditions environnementales défavorables comme le manque de nutriments ou la présence d'agents antimicrobiens. Néanmoins, une source de carbone permettant la production d'exopolysaccharides est souvent nécessaire pour le maintien du biofilm [308]. D'autres conditions environnementales influencent également la formation de biofilm comme le pH, l'osmolarité et la présence d'ions divalents [308].

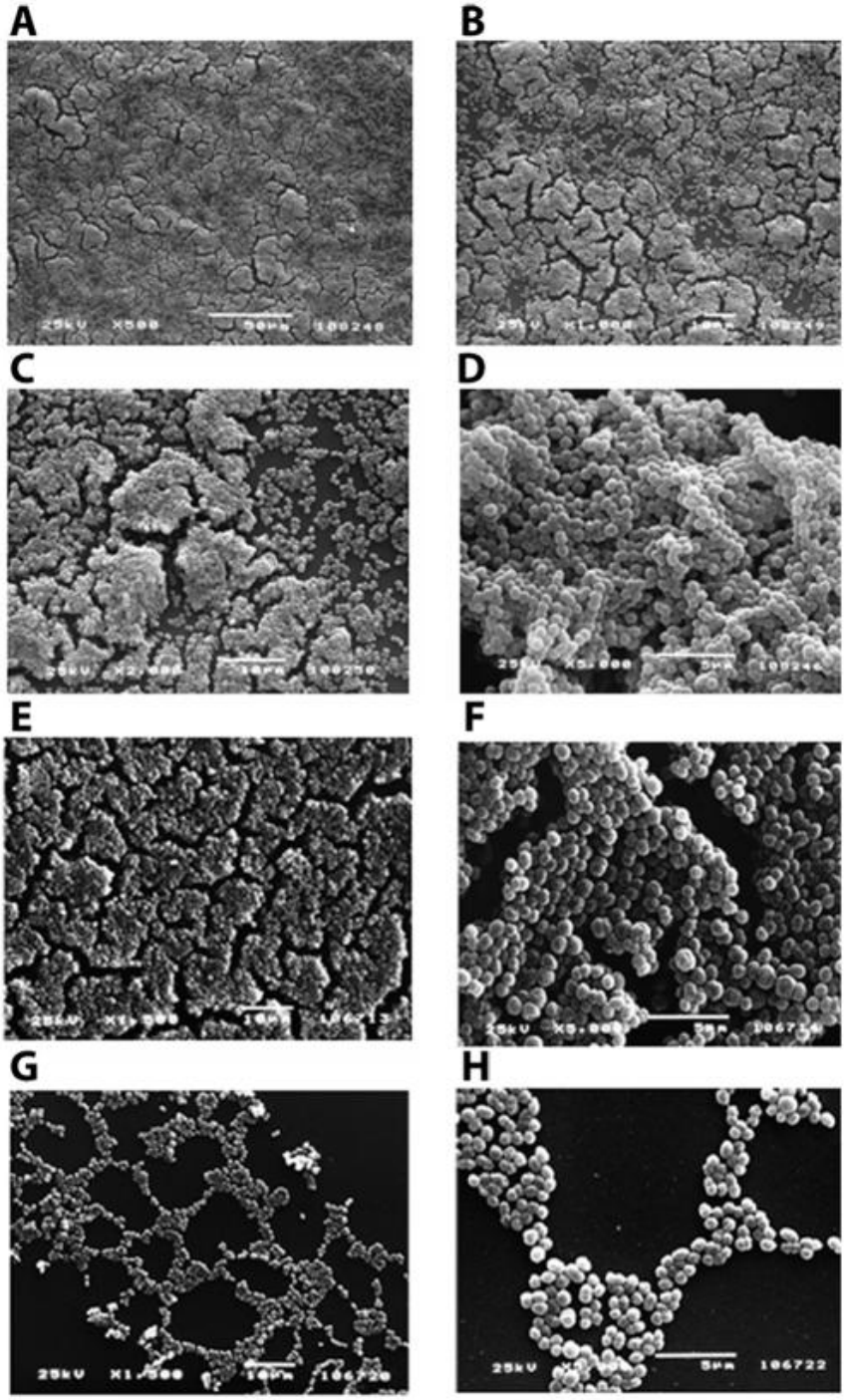


Figure 16. Analyse morphologique des biofilms de *S. agalactiae* par microscopie électronique à transmission (tiré de [328]).

Images representatives de trois souches différentes formant des biofilms importants (A-F) et d'une souche formant peu de biofilm. Les bactéries ont été cultivées sur sur des lames de verre pendant 72 h dans des conditions statiques. (A et B) Souche CHR-021, sérotype Ia avec un grossissement x 500 (A) et x 100 (B). (C et D) Souche ABC020018145, sérotype II avec un grossissement x 2000 (C) et x 5000 (D). (E et F) Souche 515, sérotype Ia avec un grossissement x 1500 (E) et x 5000 (F). (G et H) Souche CHR-019, sérotype II avec un grossissement x 1500 (G) et x 5000 (H).

Le développement et la maturation de l'architecture du biofilm sont les deux dernières étapes de la formation du biofilm (Figure 17, étapes 4 et 5). De nombreux facteurs sont produits de manière différente durant la phase de transition et le quorum sensing est souvent impliqué dans la formation d'un biofilm mature. Le quorum sensing est un processus de communication entre cellules qui passe par la production et la détection de molécules permettant la synchronisation de l'expression de certains gènes de virulence, de symbiose, de compétence, de conjugaison, de production d'antibiotiques, de sporulation et permettant la formation du biofilm. L'expression de différentes adhésines et de leurs récepteurs associés contribue au regroupement en communauté [239]. En général, les molécules du quorum sensing sont des homosérines lactones chez les bactéries à coloration Gram négative et des oligopeptides chez les bactéries à coloration Gram positive [4, 239, 308]. Deux types de systèmes de quorum sensing ont été identifiés chez les bactéries à coloration Gram positive. Le premier type met en jeu un système à trois composants (ComCDE) : un peptide auto-inducteur et un système à deux composants qui détecte spécifiquement et répond à la présence du peptide dans le milieu extracellulaire. En général, un transporteur de type ABC est requis pour permettre la sécrétion du peptide dans le milieu extracellulaire. Le second type de quorum sensing décrit implique un peptide signal qui est internalisé par un transporteur de type ABC [239]. Une fois internalisé, le peptide interagit avec un régulateur transcriptionnel qui régule la transcription de nombreux gènes, tel le régulateur ComR. Dans les deux cas, à partir d'un certain seuil de densité cellulaire bactérienne, le peptide est détecté et une cascade de régulation de nombreux gènes est mise en place [4, 239]. Certains auteurs suggèrent que beaucoup de métabolites extracellulaires pouvant posséder une activité antibiotique auraient le potentiel de fonctionner comme des molécules signal [447]. Par ailleurs, les voies de régulation permettant la régulation de la production des bactériocines et des phéromones impliquées dans la communication cellulaire sont très similaires [86]. Un peptide signal pourrait alors être défini plus largement comme une molécule s'accumulant dans le milieu extracellulaire durant une phase spécifique de croissance ou une condition environnementale particulière, étant capable de reconnaître un récepteur de surface ou cytoplasmique et ayant la capacité d'induire une réponse cellulaire [4, 246].

Au sein des biofilms, les bactéries sont confrontées à des gradients de nutriments, d'oxygène ou d'accepteurs d'électrons ce qui crée des microenvironnements particuliers auxquels les cellules répondent en régulant l'expression de certains gènes [246].

Enfin, la dernière étape de la formation de biofilm consiste en la dispersion des bactéries enchâssées afin de permettre la colonisation d'un autre site (Figure 17, étape 5) [86, 225, 226, 286, 350].

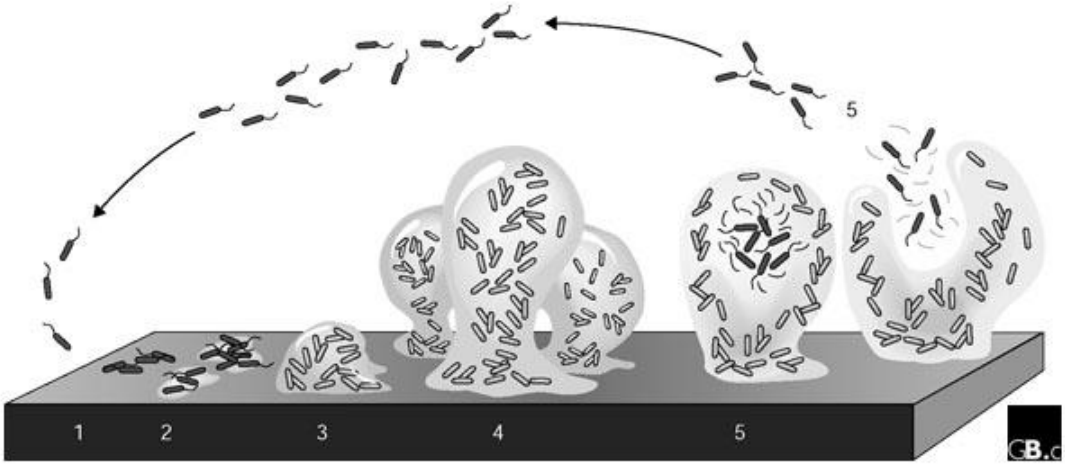


Figure 17. Schéma modélisant le développement d'un biofilm bactérien (tiré de [350]).

A la première étape, les cellules s'attachent réversiblement puis irréversiblement à l'étape 2 à l'aide des substances exopolysaccharidiques et de la perte de mobilité des bactéries. La troisième étape correspond au développement primaire de l'architecture du biofilm suivie par une seconde maturation aboutissant à un biofilm mature au niveau de l'étape 4. L'étape 5 consiste en la dispersion des cellules à partir des microcolonies.

Il a été montré que les bactéries avaient également développé des processus afin de se détacher si les conditions physico-chimiques et nutritives de leur environnement n'étaient pas favorables à leur croissance. L'adhésion bactérienne est donc un processus dynamique et régulé [286, 308].

2.2. Diversité des protéines de surface produites par S. agalactiae

2.2.1. Généralités

Il existe plusieurs catégories de protéines de surface chez les streptocoques : les pili, les protéines de type M, les antigènes de type I/II, les protéines liant les immunoglobulines, les glycoprotéines riches en répétitions sérine (Srr), les protéines similaires au collagène, les peptidases et les adhésines [286]. Des échanges génétiques entre streptocoques expliqueraient l'homologie de certaines protéines constatée entre différentes espèces [226, 286].

Le séquençage de génomes de streptocoques a révélé la présence de nombreuses protéines de surface possédant un motif LPxTG [123, 146, 439]. Ainsi, la plupart des familles des protéines décrites chez les streptocoques l'ont été chez *S. agalactiae* (sauf celles se liant aux protéines salivaires) (Tableau 4) [286]. Par conséquent, *S. agalactiae*, et plus généralement les streptocoques, paraissent particulièrement bien équipés pour coloniser de multiples environnements en adhérant à une grande diversité de substrats (Figure 18) [189, 242, 286].

Tableau 4. Protéines de surface impliquées dans l'adhésion aux composants de l'hôte déjà décrites chez *S. agalactiae*.

Groupe de protéines	Protéines	Motif d'ancrage	Fonction(s) et/ou substrat(s)	Sources
Antigène I/II	Ssp-5	LPxTG	Co-agrégation, subtrats multiples	[286, 401]
Famille Alp	Protéine α	LPxTG	Glycosaminoglycanes de l'hôte	[45, 286]
	Rib	LPxTG	Glycosaminoglycanes de l'hôte	[45, 286]
	R28	LPxTG	Glycosaminoglycanes de l'hôte	[45, 286]
	Alp2	LPxTG	Glycosaminoglycanes de l'hôte	[45, 286]
Pili/fimbriae	PI-1, PI-2a, PI-2b	LPxTG	Co-agrégation, formation de biofilm, substrats multiples	[213, 328, 362]
Protéines à séquences répétées riches en sérine	Srr-1, Srr-2	LPxTG	Subtrats multiples	[275, 346, 358, 362, 420]
Protéines liant la fibronectine	Peptidase C5a	LPxTz	Fibronectine	[12, 68, 184]
	GADPH / PKG	/	Fibronectine	[32, 114, 183, 196, 249, 294, 298, 359, 434]
	PavA-like	/	Fibronectine	[179, 364]
Protéines liant la laminine	Lmb	LXXC/XXGC	Laminine	[45, 382]
Protéines liant le fibrinogène	FbsA, FbsB	LPxTG, /	Fibrinogène	[2, 96, 158, 310, 336, 355]
	CspA	LPxTG	Fibrinogène (clivage)	[165, 363]
	GADPH / PKG	/	Fibrinogène	[32, 114, 183, 196, 249, 297, 298, 359, 434]
Protéines liant le plasminogène	GAPDH/PKG	/	Plasminogène, plasmine, actine	[32, 114, 183, 196, 249, 297, 298, 359, 434]
Protéines liant les immunoglobulines	Protéine β	LPxTG	IgA	[3, 242]
	Sip	Sans ancrage	Protection immunologique	[18, 43, 263, 329]
	BPS	LPxTG	Protection immunologique	[116]
Protéines liant les protéines du complément	Peptidase C5a	LPxTz	Complément C5a	[12]
	Protéine β	LPxTG	Facteur H	[3, 242]
Protéines liant les cellules de l'hôte	BibA	LPxTG	Cellules épithéliales	[349]
	FbsA	LPxTG	Cellules épithéliales et endothéliales, agrégation plaquettes	[158, 310, 356, 399]
	FbsB	/	Invasion des cellules épithéliales	[158]
	Peptidase C5a	LPxTz	Cellules épithéliales	[68]
	Lmb	LXXC/XXGC	Cellules endothéliales	[45, 399]
	Famille Alp	LPxTG	Cellules épithéliales	[31, 242, 384]
	Pili/Fimbriae	LPxTG	Cellules épithéliales et endothéliales	[7, 213, 253, 362]

HvgA	LPxTG	Cellules épithéliales et endothéliales	[396]
Srr-1	LPxTG	Cellules épithéliales	[275, 346]

2.2.2. Antigènes I/II

Russel *et al*. ont été les premiers auteurs à mettre en évidence une protéine de surface possédant deux déterminants antigéniques. Cette famille de protéines a alors été nommée famille des antigènes I/II [342]. La plupart des streptocoques oraux expriment à leur surface au moins un de ces polypeptides (Figure 18) [35].

Les antigènes I/II, en raison de leurs multiples sites de liaison, sont impliqués dans l'agrégation et dans la formation de biofilm, mais également dans un grand nombre d'interactions avec la matrice extracellulaire (collagène, fibrinogène, fibronectine et laminine) et avec d'autres partenaires microbiens oraux tels qu'*Actinomyces naeslundii*, *S. oralis*, *Porphyromonas gingivalis* et *Candida albicans* [178, 190, 219, 365].

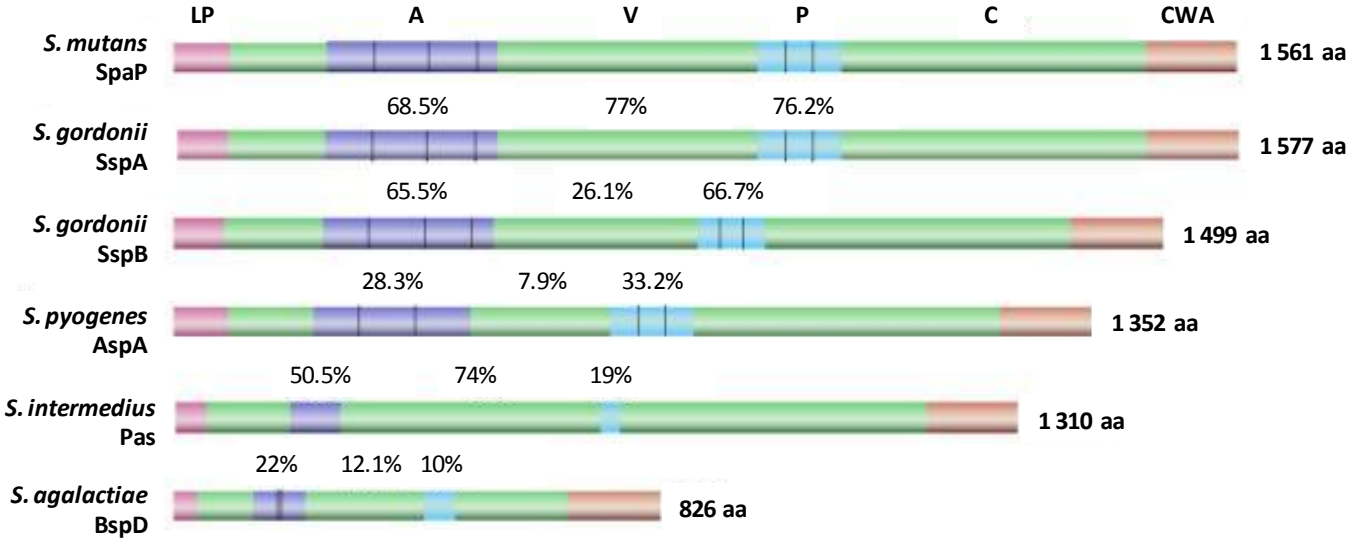


Figure 18. Identité de séquences entre des protéines appartenant à la famille des antigènes I/II chez les streptocoques (tiré de [35]).

LP, peptide signal ; A, région riche en alanine ; V, région hypervariable ; P, région riche en proline, C, région C-terminale ; CWA, signal d'ancrage à la paroi (le plus souvent LPxTG).

La protéine Gp340 est un récepteur majeur pour la plupart des antigènes de type I/II tels SpaP chez *S. mutans* et SspA et SspB chez *S. gordonii*. Gp340 est une molécule de défense produite par l'hôte au niveau des muqueuses et impliquée dans la régulation des réponses cellulaires immunes et dans la différentiation épithéliale [28, 202, 315]. En milieu liquide, Gp340 provoque l'agrégation bactérienne mais quand la protéine est immobilisée, notamment au niveau oral, elle devient un récepteur pour l'adhésion [36]. Plusieurs régions présentes sur les antigènes I/II peuvent permettre la liaison à Gp340.

Chez la plupart des streptocoques, ces protéines sont composées de 1310 et 1653 acides aminés tandis que *S. agalactiae* code des polypeptides d'environ 863 acides aminés [286]. Les domaines liant les substrats sont : une région N-terminale riche en alanine (région A), une région centrale V et une région riche en proline (P) dans la région C-terminale (Figure 19) [286]. Les antigènes I/II proviendraient d'une protéine ancestrale commune ayant divergé suite aux pressions sélectives afin de générer une famille de protéines présentant des fonctions variées représentatives de la niche écologique de la souche bactérienne [35].

La région N-terminale est bien conservée parmi les streptocoques (Figure 18). Une des caractéristiques de cette région est sa richesse en acides aminés chargés positivement et hydroxyles [188]. Des séquences de la région A impliquées dans la liaison aux protéines de l'hôte sont riches en alanine et contiennent beaucoup d'acides aminés hydrophobes. Ces séquences sont généralement répétées 3 ou 4 fois [92, 276, 279, 360]. Les séquences répétées sont très conservées chez la protéine SpaP de *S. mutans* et SspA et SspB de *S. gordonii* mais peu chez AspA (codée par le gène *spy1325*) de *S. pyogenes* et BspD de *S. agalactiae* (Figure 18). Néanmoins, AspA confère également des propriétés adhésives à la protéine Gp340 [448]. Il est à noter que la région A présente des homologies avec la région répétée de la protéine M, facteur de virulence majeur de *S. pyogenes* [92]. La région V paraît être la région la plus variable chez les streptocoques (Figure 18). La région V permettrait la liaison aux carbohydrates [34, 208]. La région P est riche en proline et est essentielle pour la sécrétion et la stabilité de la protéine [286]. Cette région est particulièrement hydrophile et peut être exposée à l'environnement extracellulaire. De nombreuses analyses fonctionnelles ont montré que cette région était à l'origine de l'adhésion aux cellules de l'hôte. Le motif

LPxTG d'ancrage de la protéine à la paroi bactérienne (CWA) est suivi d'une région d'acides aminés majoritairement hydrophobes et d'une queue C-terminale chargée positivement [188]. Deux séquences de la région nommée BAR en région C-terminale seraient responsables de l'interaction des streptocoques oraux avec *P. gingivalis* : KKVQDLLKK et NITVK [88]. En amont de la séquence NITVK, se trouve une séquence VxxLL proche de la séquence consensus LxxLL responsable d'interactions entre protéines eucaryotes. La séquence VxxLL est essentielle à l'interaction entre les streptocoques oraux et *P. gingivalis*. La séquence NYTVK est conservée chez les antigènes I/II produit par *S. gordonii, S. oralis* et *S. sanguinis*, 3 espèces formant des biofilms mixtes avec *P. gingivalis* [88].

Chez *S. agalactiae*, un seul antigène de type I/II putatif a été identifié par analyse *in silico* chez la souche 2603 V/R mais aucune description n'a été réalisée [286, 401]. Ainsi, les antigènes de type I/II ont été très peu recherchés chez *S. agalactiae*.

2.2.3. Famille Alp

La famille des protéines de surface Alp est composée de 4 protéines : les protéines α, Rib, R28 et Alp2 [385]. Les gènes codant les protéines de la famille Alp contiennent de multiples répétitions en tandem et le nombre de répétitions est important pour la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte [45]. Les recherches sur les protéines de la famille Alp sont importantes puisque cette famille offre des possibilités de candidats vaccinaux.

La protéine α est produite par la plupart des souches appartenant aux sérotypes Ia, Ib et II et très rarement chez celles appartenant aux sérotypes III et V tandis que la protéine Rib est exprimée par la plupart des souches de *S. agalactiae* appartenant au sérotype III [385, 429]. La protéine Rib et la protéine α présentent 80 % d'identité de séquences [429]. La protéine R28 a été identifiée pour la première fois chez une souche de *S. pyogenes* et a également été retrouvée chez des souches de *S. agalactiae* appartenant au sérotype capsulaire V et VIII [242]. La protéine Alp 2 a été identifiée chez peu de souches (toutes de sérotype Ia, III et V). Ainsi, la présence des gènes codant les protéines de la famille Alp paraît être liée au sérotype capsulaire et la majorité des souches de S. *agalactiae* possède au moins

l'un des 4 gènes codant une protéine de la famille Alp ce qui suggère un rôle important de cette famille pour *S. agalactiae* [242].

La délétion du gène codant la protéine α atténue la virulence d'une souche de *S. agalactiae* tandis que la protéine R28 n'a pas d'impact sur la virulence chez les souris [31, 384]. La protéine α ainsi que les protéines Rib et Alp2 n'ont pas d'impact sur l'adhésion à des cellules épithéliales cervicales humaines ME180. La protéine α permet néanmoins l'invasion de ces cellules [31, 242]. A l'inverse, la protéine R28 permet l'adhésion aux cellules ME180 [384]. De plus, la protéine Rib confère une immunité protective [384, 385, 429].

2.2.4. Pili

Trois loci codant des pili (PI-1, PI-2a et PI-2b) ont été décrits chez *S. agalactiae.* L'organisation génétique des ces 3 opérons est similaire et codent 3 sous-unités : PilA, PilB et PilC. La sous-unité PilB représente la protéine majoritaire et s'oligomérise pour former le squelette du pili tandis que PilA et PilC sont des composants minoritaires (Figure 13A, page 54). PilA se répartit sur la longueur du pili et PilC se positionne à la base du pili [103, 328, 337]. Les souches séquencées de *S. agalactiae* possède un ou deux loci et la souche 515 possède uniquement le locus PI-2a. Il est à noter que les trois loci sont situés sur des îlots génomiques et pourraient se transférer [337].

Les propriétés que confèrent les pili à *S. agalactiae* en termes de virulence restent discutées puisque plusieurs études présentent des résultats non concordants. En effet, les 3 types de pili avaient été initialement décrits comme impliqués dans la formation de biofilm [213] mais une autre étude a montré que la formation de biofilm sur des surfaces biotiques et abiotiques paraît être essentiellement conférée par la production d'un pili de type PI-2a [328]. La différence pourrait s'expliquer par le fait que la dernière étude a été réalisée dans des conditions *in vitro* qui ne reflètent que partiellement les conditions rencontrées *in vivo*.

Par ailleurs, il a été montré que le pili, et notamment la protéine PilA, contribue à l'adhérence de certaines souches de *S. agalactiae* au collagène, aux cellules épithéliales vaginales et cervicales et à la colonisation de tractus génital féminin [362], à l'adhérence et à

l'invasion des cellules endothéliales des micro-vaisseaux du cerveau (hBMEC), aux cellules épithéliales intestinales (TC7) et aux cellules pulmonaires en conditions statiques ou en conditions de flux reproduisant les conditions retrouvées dans les voies respiratoires (A549). PilA contribue à l'invasion du système nerveux central et au développement de méningites [7, 213, 253]. Néanmoins, une autre étude sur une souche différente de *S. agalactiae* n'a mis en évidence aucun rôle de PilA dans l'adhésion aux cellules épithéliales ME180, A549 et VK2 [193].

Il a également été montré que les pili, notamment la sous-unité PilB, chez les souches NCTC10/84 et 2603 V/R auraient un rôle dans la résistance aux peptides antimicrobiens aboutissant à une meilleure survie dans le système sanguin ainsi qu'une meilleure survie face aux macrophages ou aux neutrophiles [193, 254]. Néanmoins, une autre étude ne détecte aucun rôle de cette protéine chez la souche NEM316 dans la résistance à la phagocytose et à la survie intracellulaire au sein des macrophages [302]. La sous-unité PilB chez la souche NEM316 est chargée positivement tandis que la sous-unité de la souche NCTC10/84 est chargée négativement. La résistance aux peptides antimicrobiens pourrait s'effectuer alors par un mécanisme impliquant une répulsion électrostatique [302]. Il est à noter également que chez la souche NEM316, PilB est nécessaire pour que la virulence *de S. agalactiae* s'exerce pleinement chez les nouveaux-nés de souris [302].

Tous ces éléments révèlent des fonctions spécifiques pour les pili qui dépendent du type de pilus impliqué, de l'expression du pilus, de l'hôte et des facteurs environnementaux.

2.2.5. Famille des protéines à séquences répétées riches en sérine (protéines Srr)

La protéine Srr-1 (Serine-Rich-Repeat), produite par la majorité des souches appartenant aux sérotypes Ia, Ib, V et certaines souches du sérotype III, joue un rôle important dans le franchissement de la barrière hémato-encéphalique et dans le développement de méningites [358, 361, 420]. Srr-1 est également impliquée dans l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales (TC7), pulmonaires (A549) et du larynx (Hep-

2) [275, 346]. Srr-1 permettrait également le succès de la colonisation du tractus génital féminin [362].

2.2.6. Famille des protéines à séquences répétées riches en leucine (protéines LRR)

A l'instar de la protéine Slr de *S. pyogenes* et des internalines A et B *de L. monocytogenes*, *S. agalactiae* produit la protéine Blr riche en répétitions leucine. Ce type de protéines est groupable dans la famille des protéines LRR streptococcales (Leucine Rich Repeats) [325, 422]. Les protéines LRR sont présentes chez les eucaryotes et les procaryotes et sont impliquées dans un grand nombre d'interactions entre protéines [211]. Blr, qui possède des propriétés immunogéniques, n'est pas accessible lorsque *S. agalactiae* croît *in vitro* mais l'exposition de Blr à la surface chez *S. agalactiae* augmente d'un facteur 100 chez un mutant dépourvu de capsule polysaccharidique qui masque Blr. L'exposition de Blr s'accroît également en absence de la protéine de surface Rib. L'accessibilité à la surface de la protéine Rib n'est quant à elle pas perturbée par la capsule. Chez *S. pyogenes*, l'exposition à la surface de Slr n'est pas modulée en fonction de la présence ou l'absence de la capsule riche en acide hyaluronique, mais augmente d'un facteur de 20 chez une souche dépourvue de protéine M ou F (ou Sfb1) [422]. Les protéines de surface de *S. agalactiae* peuvent ainsi subir entre elles une régulation mécanique en fonction de la présence/absence d'autres protéines de surface.

2.2.7. Protéines liant la fibronectine

Peu de protéines de *S. agalactiae* sont capables de lier la fibronectine. Néanmoins, la peptidase C5a, codée par le gène *scpB*, possède cette capacité [12, 68, 184]. De plus, le gène codant une protéine similaire à la protéine PavA de *S. pneumoniae* a été décrite chez une souche de *S. agalactiae* [364]. Chez *S. pneumoniae*, PavA se fixe à la fibronectine immobilisée [179] mais est également impliquée dans l'adhésion aux cellules épithéliales A549 et Hep-2 et à des cellules endothéliales microvasculaires du cerveau humain et des cellules endothéliales dérivées de veines ombilicales humaines [314]. Néanmoins, des

données suggèrent que PavA jouerait un rôle indirect dans la virulence par l'intermédiaire de la modulation d'autres facteurs de virulence [314].

2.2.8. Protéines liant la laminine

La protéine Lmb (pour laminin binding), ubiquiste chez les souches d'origine humaine de *S. agalactiae*, a d'abord été décrite comme permettant l'adhésion à la laminine [382]. Plus récemment, des travaux ont montré qu'elle permettait également l'invasion des cellules endothéliales micro-vasculaires du cerveau humain (hBMEC) [399]. Le gène *lmb* est localisé sur un transposon et est adjacent au gène *scpB* codant la peptidase C5a. Cette région génétique apparait être une zone forte de plasticité génétique où peut s'insérer fréquemment la séquence d'insertion IS*1548* ou l'intron GBSi1 [1, 45]. La présence de l'un ou l'autre de ces éléments paraît être dépendant du complexe clonal des souches [1]. La présence d'IS*1548* induit l'expression du gène *lmb* et augmente de manière concordante la capacité d'adhésion à la laminine mais n'a aucun effet sur l'expression du gène *scpB* et sur la capacité d'adhésion à la fibronectine [1].

2.2.9. Protéines liant le fibrinogène

FbsA et FbsB sont deux protéines décrites comme permettant l'adhésion au fibrinogène [96, 158, 310, 355]. Bien que les deux protéines paraissent avoir la même fonction, il n'existe pas d'homologie entre les deux gènes codant ces protéines [96]. Une étude a montré que seulement 21 % des souches testées (n=111) ne possèdent pas le gène *fbsA*, 35 % des souches possèdent uniquement ce gène et 50 % possèdent les 2 gènes. Dans cette étude, *fbsB* n'est jamais trouvé en absence de *fbsA* [336]. Les souches qui possèdent les deux gènes présentent une plus forte capacité d'adhésion au fibrinogène [336]. Les protéines FbsA et FbsB sont présentes chez toutes les souches de *S. agalactiae* ST17. D'autres éléments indiquent également que la présence de l'un ou l'autre des deux gènes codant ces protéines de surface paraît être dépendante du groupe ST [2, 336].

FbsA paraît être la protéine majoritaire impliquée dans l'adhésion au fibrinogène. FbsA permet également d'adhérer aux cellules hBMEC et pulmonaires A549, induit l'agrégation des plaquettes sanguines humaines majoritairement par l'intermédiaire de l'adhésion au fibrinogène et joue un rôle dans la résistance à l'opsonophagocytose [158, 310, 354, 398]. Le nombre de répétitions de séquences répétées présentes dans le gène *fbsA*, qui sont à l'origine de la liaison au fibrinogène, est hautement variable d'une souche à une autre et est dépendant de la présence du gène *fbsB* [336, 355].

Une protéine FbsB d'une souche de *S. agalactiae* d'origine humaine est capable de lier aussi bien le fibrinogène humain que le fibrinogène bovin grâce à des régions différentes [96]. FbsB n'est pas impliquée dans l'adhésion aux cellules épithéliales pulmonaires humaines mais par contre joue un rôle dans l'invasion de ces mêmes cellules [158]. L'ajout de la protéine FbsB purifiée inhibe par compétition l'invasion des cellules A549 ce qui indique que le rôle de FbsB dans l'invasion des cellules est direct. Tandis que FbsA possède un motif LPxTG permettant l'ancrage dans la paroi bactérienne, FbsB ne possède pas de motif équivalent et pourrait ainsi être sécrétée dans le milieu ou attachée de manière non covalente [158].

La sérine protéase CspA de *S. agalactiae* est une protéase associée à l'enveloppe cellulaire capable de cliver le fibrinogène de l'hôte et de se fixer au produit de la réaction. CspA présente des homologies avec la famille de protéines à laquelle appartient la protéase C5a. CspA participe en plus à la virulence de *S. agalactiae* chez un modèle rat et à la résistance à l'opsonophagocytose par des neutrophiles humains *in vitro* [165, 363].

2.2.10. Protéines liant le plasminogène

Les glycéraldéhydes 3-phosphate deshydrogénases (GADPH) sont des enzymes cytoplasmiques impliquées dans le métabolisme glycolytique. Malgré l'absence de signal de sécrétion, elles sont exprimées à la surface de plusieurs bactéries, champignons et protozoaires. Ces enzymes de ménage peuvent être impliquées dans l'adhésion aux composants de l'hôte comme la fibronectine et le plasminogène et peuvent ainsi devenir des

facteurs de virulence [114, 196, 297, 298, 434]. Chez *S. agalactiae*, une telle protéine a été mise en évidence à la surface cellulaire [359]. Elle est capable d'interagir avec du plasminogène, du fibrinogène et de l'actine et participe à la virulence de *S. agalactiae* chez la souris [249, 359]. L'adhésion au plasminogène peut activer la plasmine pouvant générer une activité protéolytique. *S. agalactiae* pourrait, par cette voie, dégrader la fibronectine de l'hôte [249]. La GADPH chez *S. agalactiae* pourrait également être impliquée dans l'interaction avec des protéines de *S. agalactiae* telles les 3 sous-unités composant le pilus (PilA, PilB et PilC) mais également avec d'autres espèces bactériennes comme *L. lactis*, *S. aureus*, *S. pyogenes* et *E. coli* [291]. Chez *S. agalactiae*, la localisation extracellulaire de la GADPH est stimulée en cas de lyse cellulaire comme à la suite d'une exposition à de la pénicilline G ou en cas de surexpression d'une autolysine. A l'inverse de la GADPH produite par *L. lactis*, la GADPH de *S. agalactiae* induit l'apoptose de macrophages de souris [291].

Par ailleurs, la phosphoglycérate kinase (PKG) a été trouvée à la surface cellulaire des souches de *S. agalactiae* [32, 183]. Cette enzyme est également impliquée dans la voie glycolytique. La PKG se fixe au plasminogène, à la plasmine, à la fibronectine et à l'actine de l'hôte et l'expression de la PKG chez des cellules HeLa altère leur cytosquelette [32].

2.2.11. Protéines liant les immunoglobulines

Chez *S. agalactiae*, la protéine β interagit avec 2 composants du système immunitaire humain : la fraction C des immunoglobulines A du sérum humain et le facteur H du plasma qui inhibe l'activation du complément [3, 242]. Cette protéine est trouvée chez toutes les souches appartenant au sérotype capsulaire Ib, chez une minorité des souches appartenant aux sérotypes la, II et V et jamais chez celles appartenant au sérotype III. Contrairement à beaucoup de protéines de surface, la protéine β ne possède pas de longues séquences répétées mais contient une région riche en proline dans sa partie C-terminale.

Les 9 sérotypes capsulaires de *S. agalactiae* produisent une protéine exposée à la surface cellulaire nommée Sip pour Surface Immunogenic Protein [18, 43, 329]. L'analyse de séquence de Sip ne révèle pas de structures répétées, de motif LPxTG ou de motif de liaison

aux immunoglobulines A (MLKKIE). La protéine Sip représente une cible de choix pour un modèle vaccinal puisque des études ont montré que des souris étaient immunisées après une injection d'une protéine Sip recombinante [43, 263].

La protéine BPS (pour groupe B Protective Surface protein) présentant des similarités avec la protéine R de *S. agalactiae* est également exposée à la surface cellulaire. La vaccination avec une protéine BPS recombinante protège des souris contre la virulence de *S. agalactiae* et le taux de mortalité en est fortement diminué [116].

2.2.12. Protéines liant les protéines du complément

Le gène *scpB*, codant la peptidase C5a exposée à la surface bactérienne, n'a été identifié que dans les génomes de souches de *S. agalactiae* pathogènes humaines et non chez les souches isolées de bovins. La peptidase C5a présente une forte identité par rapport à la protéine ScpA de *S. pyogenes* ce qui suggère un transfert horizontal entre ces deux espèces [29, 45, 97, 132]. Elle permet la dégradation de la protéine du complément humain C5a, lie la fibronectine immobilisée [12] et confère un pouvoir invasif des lignées cellulaires épithéliales A549 et Hep2 [68]. Néanmoins, un mutant Δ*scpB* n'est que partiellement affecté dans sa capacité d'adhésion à la fibronectine. Ce résultat est en accord avec la quantité de travaux qui révèlent un arsenal de protéines de surface pouvant adhérer à de nombreux substrats et dont pour certaines, les fonctions se rejoignent [68].

2.2.13. Protéines liant les cellules de l'hôte

La protéine BibA est présente chez 7 souches séquencées de *S. agalactiae* dont la souche 515 et NEM316 et chez toutes les autres souches de *S. agalactiae* testées (n=25) [349]. BibA est capable de lier le régulateur du complément humain C4bp, les cellules épithéliales cervicales ME180, et les cellules pulmonaires A549. Une délétion du gène codant

BibA diminue la résistance de *S. agalactiae* dans le système sanguin, la résistance à la phagocytose et affecte la virulence chez le modèle souris [349].

HvgA, produite par les souches de *S. agalactiae* appartenant au complexe clonal 17 et au sérotype capsulaire 17, permet le franchissement des barrières intestinales et de la barrière hémato-encéphalique. HvgA est capable de lier de nombreuses lignées de cellules eucaryotes : cellules épithéliales intestinales Caco-2, les cellules constituant la barrière hémato-encéphalique hCMEC/D3, les cellules endothéliales de micro-vaisseaux du cerveau MVEC et hBMEC, les cellules épithéliales du plexus choroïdes CPEC et les cellules HeLa [396].

2.3. Les sortases : acteurs de l'ancrage des protéines de surface dans la paroi bactérienne

Les sortases sont des transpeptidases qui permettent l'ancrage des protéines de surface dans l'enveloppe bactérienne. Des analyses informatiques ont révélé leur présence dans tous les génomes bactériens à coloration Gram positive [286]. Les sortases sont classifiées selon leur fonction (Figure 19). Les sortases de classe A sont les sortases de ménage permettant d'ancrer la majorité des protéines de surface. Les sortases de classe B pourraient être impliquées dans l'acquisition du fer et l'assemblage de pili mais ne sont produites que par peu d'espèces comme *Bacillus cereus* et *C. difficile*. Les sortases de classe C sont retrouvées chez les espèces pathogènes, comme par exemple *E. faecium* et *S. agalactiae*, et sont impliquées dans la formation des pili et dans l'ancrage des protéines de surface essentielles à la virulence. Les sortases de classe D ne sont présentes que chez les Bacilles, les Clostridium et les Actinomycètes et leurs cibles sont des gènes impliqués dans des fonctions enzymatiques et dans la sporulation. Les fonctions des sortases des classes E et F sont peu connues. Les sortases appartenant à la classe E pourraient être les sortases de ménage des espèces possédant un haut pourcentage en G+C [286, 352, 383].

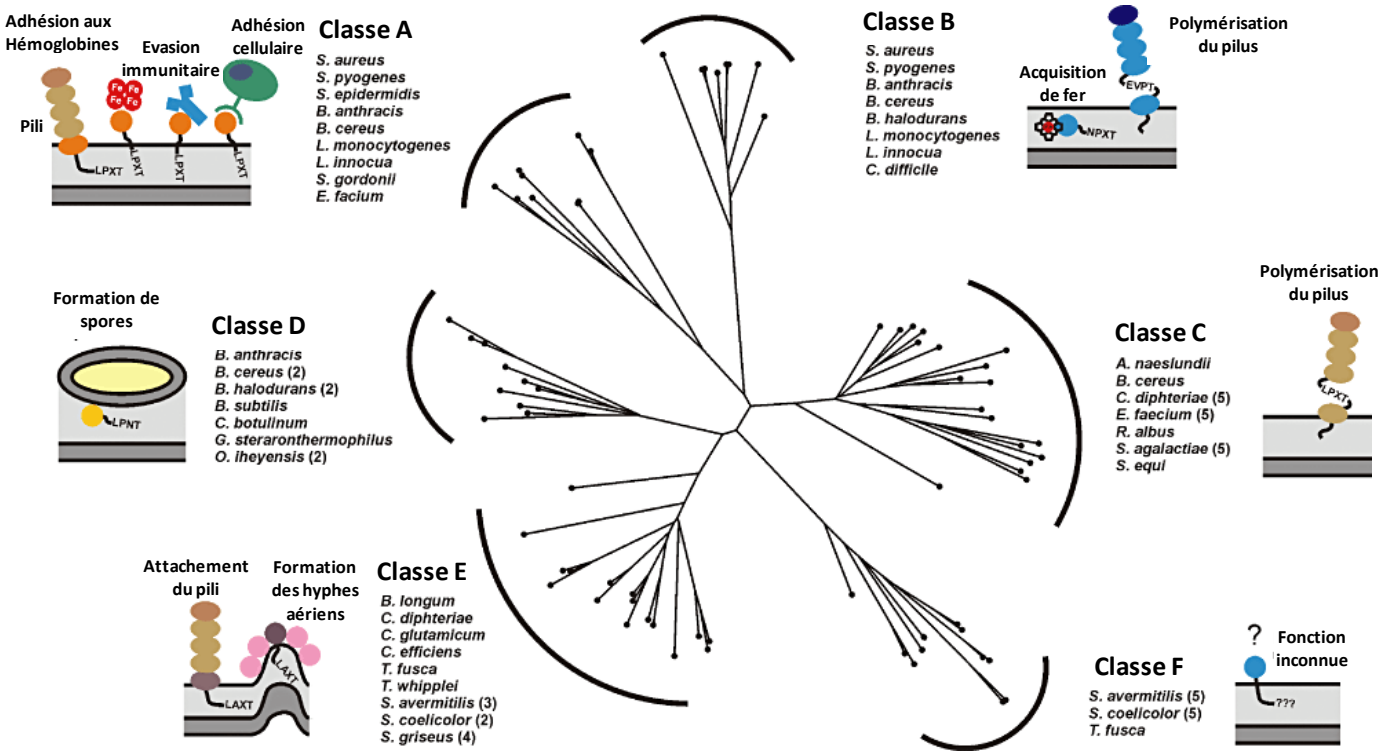


Figure 19. Arbre phylogénétique des six classes de sortases des bactéries à coloration Gram positive (tiré de [383])

Un alignement multiple basé sur les séquences de 73 sortases a été généré en utilisant le programme COBALT et un arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode développée par Papadopoulos [301]. Les sortases analysées ont été classifiées en 6 sous-familles en fonction de leurs séquences primaires. Il est à noter que les classes D et E décrites ici sont référées comme appartenant toutes les deux à la classe D selon la nomenclature de Dramsi et al *[105]. Les sortases appartenant aux classes A à F sont représentées ainsi que les principales fonctions connues de leurs substrats.*

Ces enzymes catalysent une première réaction de transpeptidation clivant la protéine de surface au niveau du peptide signal (Figure 20). Une deuxième étape consiste à incorporer les protéines clivées au sein de l'enveloppe. Les protéines de surface chez les bactéries à coloration Gram positive possèdent 2 motifs reconnus par les sortases : le peptide signal YSIRK/GS en région N-terminale et un signal de sortie en région C-terminale (CWA pour Cell Wall Anchor, le plus souvent un motif LPxTG) [259, 352] (Figure 20). Les protéines arborant un motif YSIRK sont le plus souvent réparties sur toute la surface

bactérienne tandis que les protéines sans ce motif sont généralement trouvées aux pôles cellulaires [91].

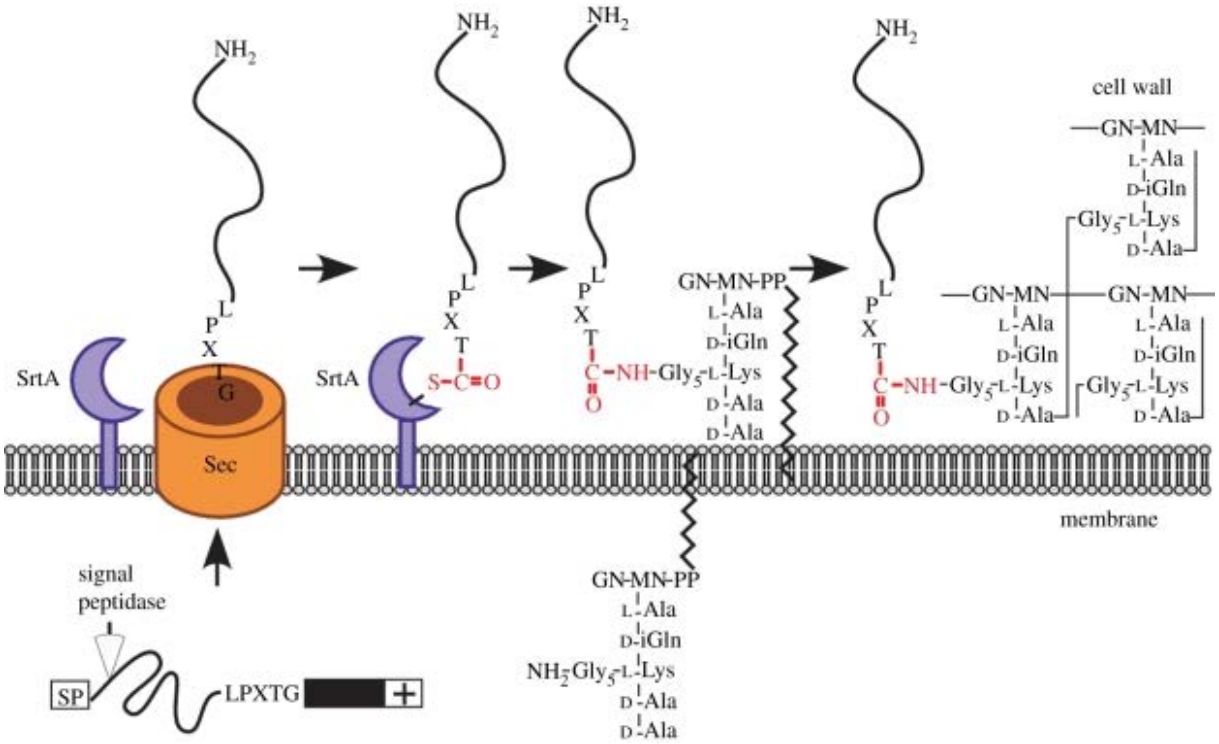


Figure 20. Rôle de la sortase A dans l'ancrage des protéines à la paroi cellulaire des bactéries à coloration Gram positive (tiré de [352]).

Les protéines de surface sont synthétisées comme des précurseurs avec un peptide signal en N-terminal et un motif de sortie LPxTG en région C-terminale qui inclut un domaine hydrophobique (boite noire) et une queue chargée positivement (+). Suivant l'initiation dans le système de sécrétion, le peptide signal est clivé, tandis que la sortase A recherche la présence de motif LPxTG sur les précurseurs. Après le clivage du précurseur par la sortase A entre la thréonine (T) et la glycine (G) du motif LPxTG, un intermédiaire acyl est formé entre le site actif cystéine (C) de la sortase A et le groupe carboxyle de la thréonine à l'extrémité C-terminale de la protéine de surface. Le groupe amine des ponts transversaux entre le lipide II effectue une attaque nucléophile sur la liaison thioester entre la sortase A et son substrat clivé, formant ainsi une liaison amide (isopeptide) entre la thréonine en C-terminal et le lipide II. Les réactions de transglycosylation et de transpeptidation permettent l'incorporation des protéines de surface au sein de la paroi cellulaire des bactéries à coloration Gram positive. MN et GN représentent respectivement l'acide N-acétylmuramique et N-acétylglucosamine.

S. agalactiae possède une sortase de classe A et un nombre variable de sortases de classe C [80]. Une souche dépourvue du gène *srtA*, codant la sortase A, est déficiente dans l'adhésion aux composants principaux de la matrice extracellulaire (fibrinogène et fibronectine) et présente également une déficience dans l'adhésion aux cellules épithéliales humaines (Caco-2, A549 et HeLa) et de souris (L2). La colonisation de souris gnotobiotiques par une souche Δ*srtA* est fortement diminuée lors d'essais de compétition même si la virulence de la souche n'est pas affectée [216]. La délétion de la sortase A n'affecte pas la polymérisation du pili chez *S. agalactiae* néanmoins l'expression du pilus à la surface est réduit et les composants s'accumulent dans le milieu extracellulaire [287]. La sortase de ménage de la classe A chez *S. agalactiae*, dont la souche 515, est responsable de l'ancrage des pili PI-2a dans la paroi mais pas de l'ancrage des protéines accessoires au sein des pili. La sortase A paraît bien représenter la sortase de ménage chez *S. agalactiae* [209, 281, 328].

Les sortases de classe C semblent être groupées au sein d'opérons codant des pili [337]. Les 3 opérons codant les pili décrits chez *S. agalactiae*, PI-1, PI-2a et PI-2b, codent ainsi chacun 2 sortases appartenant à la classe C. Comme pour les pili de type PI-1, ce sont les sortases de la classe C qui sont responsables de l'assemblage des protéines accessoires des pili PI-2a [209, 281, 328].

S. agalactiae produit donc deux types de sortases qui possèdent un rôle déterminé dans l'ancrage des protéines de surface et des pili.

3. Le facteur CAMP : une hémolysine ubiquiste chez *S. agalactiae*

3.1. Composition de la paroi des érythrocytes mammifères

Chez les mammifères, les érythrocytes sont des cellules anucléées, dont le cytoplasme est riche en hémoglobine, contenant des atomes de fer, et qui assurent le transport des gaz respiratoires. La membrane érythrocytaire est composée de protéines et de lipides intriqués dont la composition exacte varie en fonction de l'organisme [334]. Les phospholipides, dont les principaux représentants sont la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine et la sphingomyéline, et le cholestérol sont des composants essentiels de cette membrane [418]. Dans la plupart des tissus mammifères, la sphingomyéline représente de 2 à 15% de la totalité des phospholipides mais cette concentration est généralement beaucoup plus importante dans les membranes érythrocytaires. Chez les mammifères, la sphingomyéline peut être métabolisée en céramide (N-acyl-sphingosine), un lipide membranaire bioactif, sous l'action d'une sphingomyélinase [9].

3.2. Action des sphingomyélinases sur la paroi des érythrocytes

Les sphingomyélinases bactériennes sont des protéines sécrétées qui sont capables d'utiliser les lipides de l'hôte pour exercer leurs effets cytotoxiques [405]. La production de sphingomyélinases a été identifiée chez diverses espèces bactériennes dont *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria* sp., *Leptospira interrogans*, *Pseudomonas* sp., *Helicobacter pylori*, *M. tuberculosis* et *Clostridium perfringens* [274]. Les sphingomyélinases sont connues pour être des facteurs fragilisant la membrane érythrocytaire si celle-ci contient plus de 45% de sphingomyéline, et pouvant, par conséquent, engendrer la libération des hémoglobines augmentant ainsi la quantité de fer disponible dans l'environnement extracellulaire [405]. Sous l'action d'une sphingomyélinase, un simple refroidissement peut entraîner la lyse érythrocytaire [274].

Etant donnée la concentration en sphingomyéline de leur membrane, les érythrocytes de l'Homme (27%), de la souris (25 %), du lapin (19%) et du cheval (10 %) ne sont quasiment pas sensibles à l'action de la sphingomyélinase tandis que les chèvres, les moutons et les bovins le sont (respectivement 46%, 51% et 52%) [274, 331, 334, 405]. Néanmoins, il est à noter que les érythrocytes de lapins ont malgré tout été décrits comme sensibles après un traitement à la phospholipase C qui convertit les phospholipides en diacylglycérol.

Les sphingomyélinases bactériennes sont considérées comme des facteurs de virulence importants puisqu'il a été montré que des mutants ne produisant plus cette enzyme devenaient moins virulents chez la souris [38, 149] et chez le lapin [289].

3.3. Description et caractérisation de la réaction synergique hémolytique induite par S. aureus *et* S. agalactiae

L'addition de sphingomyélinase staphylococcale et de Mg^{2+} à une solution d'érythrocytes de moutons résulte en une hydrolyse de la sphingomyéline. Néanmoins, ceci n'aboutit à la lyse des cellules que dans certaines conditions supplémentaires : un refroidissement, l'addition d'EthyleneDiamineTetraAcetate (EDTA) [376], la modification du pH ou de la concentration en sel [316, 435], ou l'addition d'un produit extracellulaire spécifique produit par *S. agalactiae*, nommé facteur CAMP [75]. En raison de sa facilité d'exécution et de son faible coût, ce dernier devint le moyen privilégié d'identification de *S. agalactiae*, par un simple test sur gélose développé par R. Christie, N. E. Atkins et E. Munch-Petersen, desquels le facteur CAMP (également nommé protéine B) a tiré son nom [75]. Le test CAMP consiste en la réalisation de stries adjacentes de *S. aureus* et de la souche à tester. Le test CAMP est dit positif, c'est-à-dire qu'il y a production du facteur CAMP, si une zone d'hémolyse synergique caractéristique en forme de flèche est visible entre les deux stries.

3.4. Des niches écologiques communes entre S. aureus *et les streptocoques*

Chez l'homme *S. aureus* est principalement retrouvé dans les voies nasales mais également au niveau de la peau, des muqueuses, des valves cardiaques et des principales protéines de la matrice extracellulaire [150, 210, 306]. Par ailleurs, cette espèce constitue l'un des principaux pathogènes responsables de mammites chez les bovins [135]. De manière très intéressante, *S. aureus* est également capable d'envahir le système sanguin de son hôte. La possibilité de retrouver *S. aureus* en proximité immédiate avec *S. agalactiae* ou une autre espèce de streptocoque laisse suggérer que la réaction hémolytique synergique entre le facteur CAMP et la sphingomyélinase peut être un phénomène non anecdotique lors d'une infection.

3.5. Caractéristiques du facteur CAMP

Le facteur CAMP a été purifié et caractérisé par Bernheimer puis par Jürgens en, respectivement, 1979 et 1985 [21, 200]. En 1979, le facteur CAMP est décrit comme étant un composé thermostable, de masse moléculaire de 23,5 kDa ayant un point isoélectrique (pI) de 8,3 et composé à 4% de carbohydrates [21]. Des éléments contradictoires en 1985 montrent que le facteur CAMP aurait une masse moléculaire de 25 kDa et un pI de 8,9 [200]. D'autres expériences auraient tendance à confirmer cette deuxième démonstration [351].

Le facteur CAMP possède des propriétés immunogènes et est produit durant l'invasion de l'hôte [47, 197]. L'hémolyse diminue lorsqu'on ajoute au mix réactionnel initial (facteur CAMP, sphingomyélinase et érythrocytes) du sérum provenant de bovins antérieurement infectés avec une suspension de *S. agalactiae* et ayant développé une mammite [47]. De plus, la vaccination de vaches laitières avec une protéine chimérique possédant des épitopes du facteur CAMP et du facteur Uberis (cf partie 3.9.1.) résulte en une diminution significative de l'inflammation [126]. Le facteur CAMP peut se lier aux immunoglobulines des classes IgG et IgM de nombreuses espèces mammifères [197]. Le

complexe immunoglobuline/facteur CAMP formé inhibe la réaction hémolytique due au facteur CAMP [197]. Néanmoins, des résultats plus récents sont en contradiction avec cette propriété puisqu'aucune interaction entre le facteur CAMP et les immunoglobulines G n'a pu être détectée dans les conditions de l'expérience [115].

3.6. Mécanistique du facteur CAMP

Le facteur CAMP est un produit extracellulaire et il a été montré que la présence seule du facteur CAMP purifié suffisait à provoquer l'évènement de lyse des cellules uniquement lorsque celles-ci étaient prétraitées avec de la sphingomyélinase. Le clivage de la sphingomyéline en céramide par la sphingomyélinase apparaît donc comme un pré-requis essentiel pour la lyse cellulaire induit par le facteur CAMP [21]. Ainsi, le facteur CAMP permet la lyse des érythrocytes dont la membrane est composée d'au moins 45% de sphingomyéline puisque ceci est le seuil minimal pour l'action de la sphingomyélinase bactérienne [197].

L'étude de l'activité du facteur CAMP par l'utilisation de liposomes synthétiques a montré que la part de cholestérol dans la membrane des cellules eucaryotes pouvait influencer l'activité du facteur CAMP [223, 388]. Les liposomes sans cholestérol sont insensibles au facteur CAMP tandis que, lorsque la concentration en cholestérol augmente jusqu'à 45%, les liposomes deviennent trois fois plus sensibles au facteur CAMP [223].

Cinquante pour cent des érythrocytes de moutons sont lysés en 25 minutes à 25°C avec 1,25 ng/ml de facteur CAMP purifié [223] (Figure 21A.). Plus la concentration en facteur CAMP est élevée, plus la lyse est rapide. Sans prétraitement à la sphingomyélinase, le facteur CAMP a également une activité lytique mais à des concentrations beaucoup plus

élevées (Figure 21B) [223]. Ainsi, des cellules non traitées sont environ 10 000 fois moins sensibles que des cellules traitées à la sphingomyélinase.

Le facteur CAMP lie les membranes érythrocytaires et notamment les protéines de la membrane cellulaire. Certaines données suggèrent que le facteur CAMP lie spécifiquement les noyaux glycanes des protéines ancrées aux glycosylphosphatidyl inositols (GPI) [223, 224]. Le facteur CAMP paraît ne pas avoir d'action enzymatique contre la céramide mais sa liaison avec celle-ci entraînerait une désorganisation de la bicouche lipidique des érythrocytes et par conséquent la lyse cellulaire [21]. Par la suite, des essais hémolytiques en utilisant du polyéthylène glycol (PEG) de différents poids moléculaires comme moyen de protection osmotique ont montré que, plus le PEG a une masse molaire élevée, plus la sensibilité des érythrocytes vis-à-vis du facteur CAMP diminue. Ceci confirmerait l'hypothèse d'une lyse des érythrocytes par une modification de la pression osmotique intracellulaire suite à la désorganisation de la membrane érythrocytaire [223].

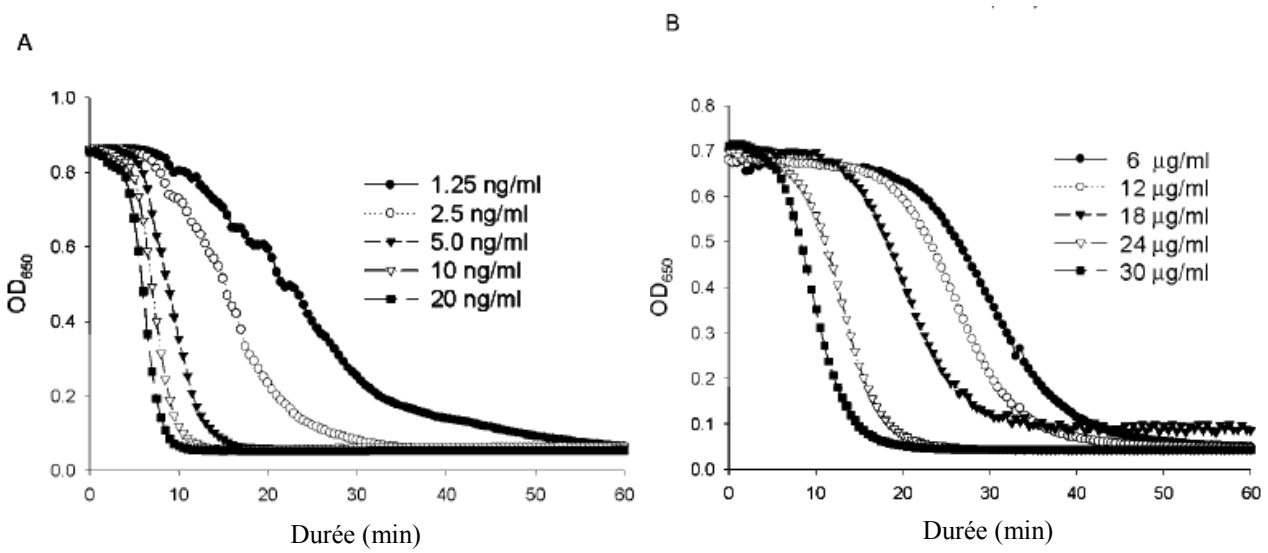


Figure 21. Lyse d'érythrocytes de mouton par le facteur CAMP dans différentes conditions (tiré de [223]).

A, lyse de cellules prétraitées à la sphingomyélinase (50 mU/ml) et exposition des cellules à diverses concentrations de facteur CAMP ; B, Hémolyse d'érythrocytes de mouton par le facteur CAMP sans prétraitement à la sphingomyélinase. L'hémolyse est mesurée comme la diminution de la DO à 650 nm.

Une analyse par microscopie électronique a révélé la formation de pores de tailles et formes variables dans la membrane érythrocytaire sous l'effet du facteur CAMP (Figure 22). Le facteur CAMP forme des oligomères mais ceux-ci ne sont pas stables après la solubilisation de la membrane sur laquelle ils étaient liés. Ceci indique que le facteur CAMP est capable de lier la membrane cellulaire, de s'oligomériser et de former des pores aboutissant ainsi à la lyse cellulaire [223].

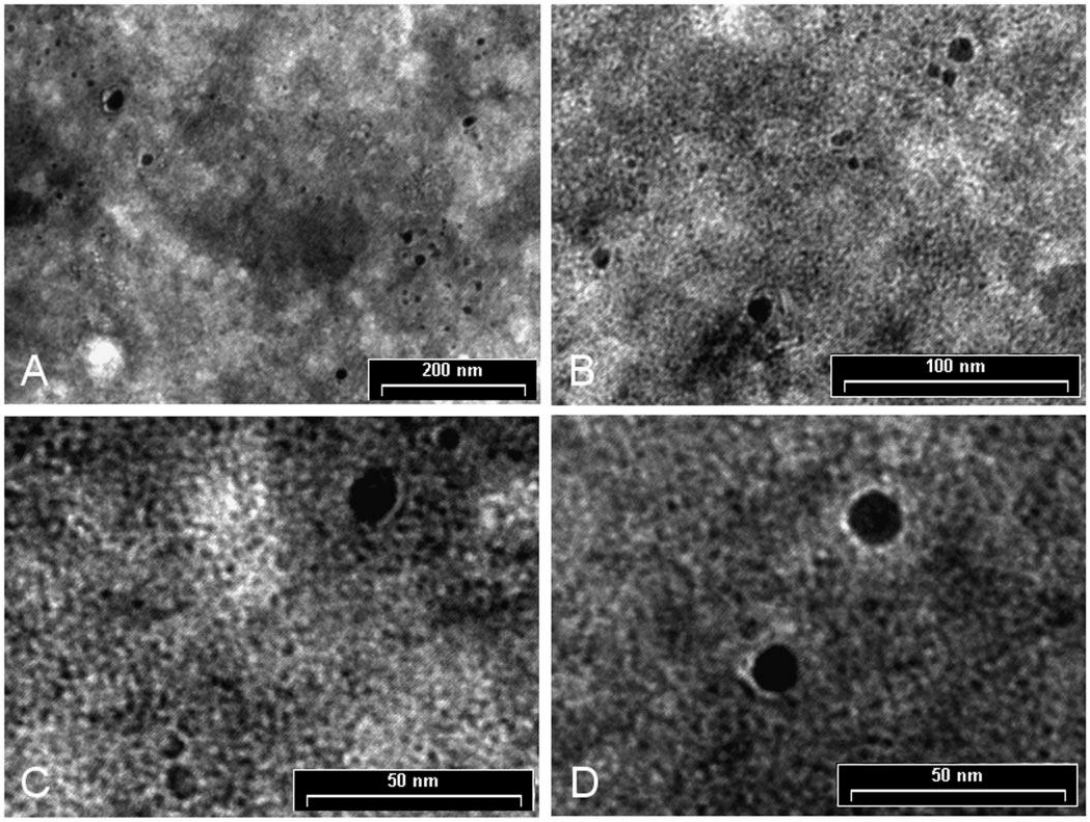


Figure 22. Visualisation par microscopie électronique des pores formés dans la membrane d'érythrocytes de moutons sous l'action du facteur CAMP (tiré de [223]).

Les érythrocytes sont prétraités avec de la sphingomyélinase et incubés avec le facteur CAMP purifié à une concentration de 70 µg/ml et les membranes lysées sont lavées par centrifugation. Les lésions varient en forme et en taille.

3.7. Présence ubiquiste d'un facteur CAMP chez S. agalactiae

Quasiment tous les isolats (96 à 99%) humains de streptocoques appartenant au groupe B de Lancefield réagissent positivement au test CAMP [120, 138, 309, 324].

Par ailleurs, le gène *cfb* codant le facteur CAMP chez *S. agalactiae* a été mis en évidence et séquencé pour la première en 1994 par Podbielski [311]. Par la suite, une PCR pour la détection de *S. agalactiae* a pu être mise au point en utilisant des amorces spécifiques à *cfb*. La présence du gène *cfb* a été détectée chez toutes les souches testées de *S. agalactiae* isolées d'aires géographiques variées (n=162), ce qui pourrait signifier que *cfb* est un gène essentiel pour *S. agalactiae* [205].

3.8. Le facteur CAMP, un facteur de virulence ?

En 1981, des expériences ont montré qu'une préparation à partir de facteur CAMP partiellement purifié était létal chez des animaux, notamment chez des lapins [372]. Ces éléments suggèrent l'implication du facteur CAMP dans le pouvoir pathogène de *S. agalactiae*. En 1987, d'autres auteurs ont montré que des injections intraveineuses de facteur CAMP purifié seul n'entraînent pas la mort chez des souris saines mais que des souris saines recevant une injection d'une solution de *S. agalactiae*, suivie de 7 injections identiques à la première expérience, développaient une leucémie fatale en 9h d'infection [197]. Ces deux travaux consistaient en des analyses indirectes de l'effet de la production du facteur CAMP par *S. agalactiae* sur la mortalité des souris.

En 2008, une approche par mutagénèse ciblée a été utilisée pour évaluer le rôle du facteur CAMP dans la virulence de *S. agalactiae* [170]. La survie d'une souche de *S. agalactiae* délétée du gène *cfb* ne varie pas par rapport à la souche sauvage quand les deux souches sont cultivées dans du sang humain, en présence de macrophages ou de peptides antimicrobiens (mCRAMPs). Aucune différence n'a pu être mise en évidente dans la

capacité d'adhésion et d'invasion de cellules endothéliales microvasculaires du cerveau (hBMEC) du mutant Δ*cfb* par rapport à la souche sauvage. Dans les conditions testées, lorsque les souris reçoivent des injections intra péritonéales de la souche de *S. agalactiae* sauvage et mutante, aucune différence de sensibilité des souris n'a également pu être mise en évidence [170].

Finalement, ces résultats peu concordants empêchent de tirer une conclusion sur l'appartenance du facteur CAMP à la famille des facteurs de virulence selon les termes établis par l'adaptation des postulats de Koch à l'échelle moléculaire pour définir un gène de virulence [130, 133].

3.9. Présence de facteurs co-hémolytiques chez d'autres streptocoques et bactéries à coloration Gram positive

Le test CAMP a longtemps été utilisé comme moyen de différenciation de *S. agalactiae* des autres streptocoques [155, 309]. Néanmoins, il a été décrit que des streptocoques appartenant au groupe sérologique A (*S. pyogenes*) étaient capables de développer une réaction synergique de type CAMP avec *S. aureus* dans certaines conditions, notamment sous atmosphère anaérobie [155]. Cette réaction positive avait été considérée comme un faux positif [394].

D'autre part, une réaction CAMP positive paraît être une constante pour *Streptococcus porcinus* et pour *Streptococcus canis* [106, 157, 166, 217, 218, 402]. Une majorité de souches de streptocoques de groupe G (*Streptococcus intestinalis*) isolées de chiens et de bovins répondent également positivement au test CAMP [377].

3.9.1. Facteur Uberis

Certaines souches de *S. uberis* produisent une protéine extracellulaire similaire au facteur CAMP de *S. agalactiae* (Figure 23). Ce produit est appelé facteur Uberis [166, 217, 244, 372]. Une analyse par immunoblot révèle que la masse moléculaire de ce produit est de 28 kDa et que les anticorps dirigés contre le facteur Uberis interagissent également avec le facteur CAMP de *S. agalactiae* [192]. Une banque d'ADN a été réalisée à partir de l'ADN chromosomique de *S. uberis* et a ainsi permis d'établir la séquence nucléotidique du gène *cfu* codant le facteur Uberis composé de 256 aa (Figure 24) [192]. Ce gène *cfu* est absent chez les souches CAMP négatives [166, 192].

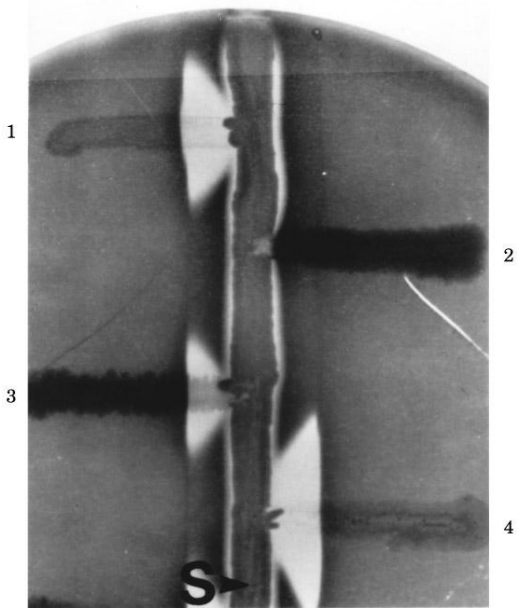


Figure 23. Test CAMP sur gélose au sang de *S. uberis* et des transformants d'*E. coli* exprimant le facteur Uberis (tiré de [192]).

Strie verticale : S. aureus*, Strie 1 :* S. uberis*, strie 2 :* E. coli *JF1754 (pTZ18R) (contrôle négatif), strie 3 :* E. coli *JF1754 (pJLD21) (transformant CAMP positif), strie 4 :* E. coli *JF1754 (pJLD21-2) (2ème transformant CAMP positif).*

```
                                10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Facteur CAMP SAG        MNVKHMMY--LSGTLVAGALLFSPAVLEVHADQVTTPQVVNHVN--SNNQAQQMAQKLDQDSIQLRNIKDNVQGTDYEKTVNEAITSVEKLKTSLR---A
Facteur Uberis SUB      MEFKKLLY--LTGS-IAGITLFSPILTSVQANQINVSQPSNNESNVISQKKEEIDNSLNQESAQLYALKEDVKGTEKEQSVNSAISAVENLKTSLR---A
Facteur CAMP SPY        MKPKHLLC--LSTV-VAGLALFSTMTHSVLADDASNPDAILMNNNQANFQRDALVQKLDEGHQQLEAIKHEAKGTDIETTVNKAIDAVDHMKSSIR---F
Facteur CAMP PAC        MKRSALIIPILTGAVLAPVAPAVAVAAPAPVSQSAARQHAQVDAEQALAQVNARIAELHK-MPQAQVPASEAPKVNYGEEIRKLLDTAFELRTAIESIIA

                                110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Facteur CAMP SAG        NPETVYDLNSIGSRVEALTDVIEAITFSTQHLANKVSQANIDMGFGITKLVIRILDPFASVDSIKAQVNDVKALEQKVLTYPDLKPTDRATIYTKSKLDK
Facteur Uberis SUB      NPETIYDLNSIGTRVEAISDVIQAIVFSTQQLTNKVDQAHIDMGFAITKLLIRIADPFASNESIKGQVEAVKQVQATVLTYPDLQPTDRATIYVKSKLDK
Facteur CAMP SPY        NTETIYDFSSIGARVEALSDAIKAIVFSTTQFTHKVEKAHTDMGFAITKLVIRIIDPFASVDAIKAQVQEIKALEEKVINYPDLQPTDRATIYTKAKLNK
Facteur CAMP PAC        GKVPPVDLSTIPARVDLLTTSVKTIQQANHNLVNKVEAAHVELGFSITRALIRTINPTSTAAQLAESKADVLSTYAKVAAYRDLKPTDAATVYVKNGLNT

                                210       220       230       240       250       260       270
                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|...
Facteur CAMP SAG        EIWNTRFTRDKKVLNVKEFKVYNTLNKAITHAVGVQLNPNVTVQQVDQEIVTLQAALQTALK-----------
Facteur Uberis SUB      LIWQTRITRDQKVLNVKSFEVYHQLNKAITHAVGVQLNPTVTVAQVDQEIKVLQEALNTALQ-----------
Facteur CAMP SPY        AIWNTRLERDKKVLGIKPFDVYNRLNKAITHAVGVQLNPTTTVQQVDDEVIAVQDALETALKS----------
Facteur CAMP PAC        KIWQTRINRDKYLLG-KNAEGYKAINKALTHATGVWFNPATTVKQVDDEVKALDLAFQATLDRGPADGKLRTN
```

Figure 24. Alignement de séquences de différents facteurs CAMP.

Les séquences protéiques des facteurs CAMP des souches 515 de S. agalactiae *(SAG, numéro d'accession : ZP_00790029), ATCC 9927 de* S. uberis *(SUB, numéro d'accession : AAA78910), SF370 de* S. pyogenes *(SPY, numéro d'accession : AAC29481) et HL013PA1 de* Propionibacterium acnes *(PAC, numéro d'accession : EFS35114) ont été comparées en utilisant le logiciel BioEdit.*

3.9.2. Facteur CAMP de *S. pyogenes*

En 1999, le séquençage du génome d'une souche de *S. pyogenes* a fait apparaître la présence d'une ORF de 774 pb, nommé *cfa*, codant une protéine possédant 67% d'identité avec le facteur CAMP et 65% avec le facteur Uberis (Figure 24). Le clonage du gène *cfa* chez *E. coli* a prouvé la fonctionnalité de *cfa* qui code ainsi un facteur type CAMP de 28,5 kDa composé de 257 acides aminés [141]. Le gène *cfa* est disséminé parmi une large population de *S. pyogenes* puisqu'il a été montré que 82% des isolats cliniques produisent une réaction CAMP positive [141]. Le gène codant ce facteur a été identifié dans des génomes de souches de streptocoques appartenant aux groupes A, B, C, G, M, P, R et U de Lancefield [141].

3.9.3. Facteur CAMP de *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes est une bactérie commensale de la peau chez l'Homme mais est également une bactérie pathogène opportuniste lors de maladies inflammatoires [83, 175]. Une réaction type CAMP a été observée entre *P. acnes* et *S. aureus* ou *C. perfringens* [72, 243].

En 2004, le séquençage du génome complet d'une souche de *P. acnes* [48] a révélé la présence de cinq gènes codant des homologues du facteur CAMP de *S. agalactiae* de masse comprise entre 28 et 30 kDa [413]. L'un des gènes fonctionnels, *camp2,* code une protéine présentant 33% d'identité en acides aminés par rapport au facteur CAMP ubiquiste de *S. agalactiae* (Figures 24 et 25) [280, 379].

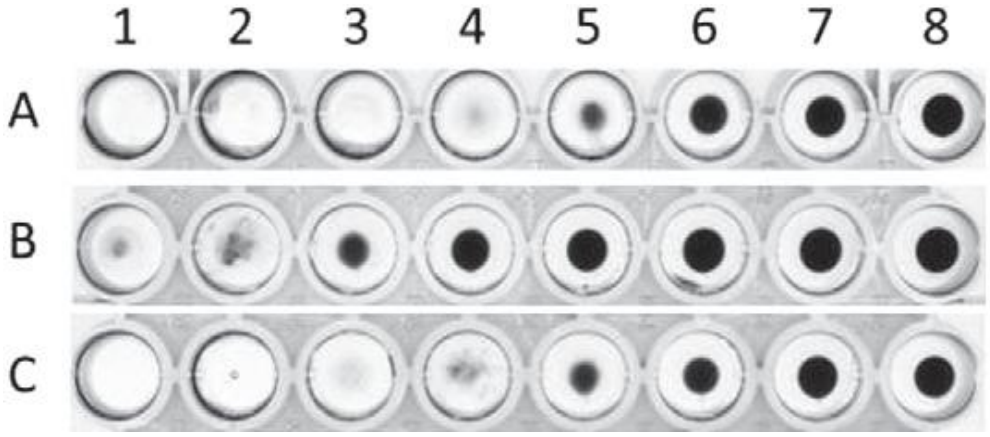


Figure 25. Analyse de l'activité co-hémolytique de *P. acnes* sauvage et de deux souches mutantes Δ*camp2* et Δ*camp4* (tiré de [379]).

*Chacun des puits contient une suspension d'érythrocytes de mouton concentrée à 1 % et lavée avec un tampon d'hémolyse. Les érythrocytes ont été préalablement traités avec 0,025 U/mL de sphingomyélinase pendant 30 minutes à 37°C avant l'ajout du surnageant des cultures des souches à tester. Les surnageants de culture ont été dilués en série (dilution 1:2, puits 1 à 8). Ligne A, surnageant de la souche sauvage ; ligne B, surnageant du mutant Δ*camp2 *; ligne C, surnageant du mutant Δ*camp4*.*

S. aureus est retrouvé de manière abondante sur la peau et dans les infections cutanées mais sa présence est très faible dans les lésions d'acné provoquées par *P. acnes* [404] ce qui pourrait suggérer que le facteur CAMP de *P. acnes* ne joue pas un rôle important dans sa virulence. Néanmoins, la présence de *P. acnes* dans des cultures de kératinocytes HaCaT et des macrophages RAW264.7 induit la production de sphingomyélinase par les cellules eucaryotes ce qui déclenche l'effet cytotoxique du facteur CAMP. *P. acnes* aurait ainsi la capacité de détourner la production de sphingomyélinases de l'hôte pour exercer son pouvoir pathogène [280].

3.9.4. Réaction CAMP chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Une réaction synergique avec des souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* a été décrite [134]. La co-hémolysine a été recherchée et identifiée et celle-ci paraît proche de celle de *S. agalactiae* puisque des anticorps contre le facteur CAMP inhibent la réaction CAMP générée par *A. pleuropneumoniae*. Le gène *cfp* d'*A. pleuropneumoniae* code un facteur type CAMP qui a une masse approximative de 27 kDa [134].

3.9.5. Le test CAMP comme moyen d'identification d'espèces d'Aeromonas Sp.

Le test CAMP a été utilisé pour différencier trois d'espèces d'Aeromonas Sp. Les souches d'*Aeromonas hydrophila* réagissent toujours positivement au test CAMP que ce soit sous atmosphère aérobie ou anaérobie, les souches d'*Aeromonas sobria* sont phénotypiquement CAMP positives uniquement sous atmosphère aérobie tandis qu'aucune souche d'*Aeromonas caviae* ne présente de réaction CAMP positive [125].

OBJECTIFS DES TRAVAUX ET STRATEGIE MISE EN PLACE

Toutes les analyses de génomes de streptocoques incluant notamment *S. equi* subsp. *epidemicus* [17], *S. equi* subsp. *equi* [177], *S. pneumoniae* [82], *S. suis* [176], *S. uberis* [426], ont révélé la présence de nombreuses séquences répétées au sein des génomes et la prévalence d'éléments génétiques mobiles variés. Ces éléments, comprenant des prophages et des ICE, n'appartiennent pas au core génome des souches et contribuent à leur plasticité génomique et à l'acquisition de fonctions de virulence adaptées à leur hôte. Il est à noter que les parties flexibles des génomes de *S. suis* et de *S. uberis* paraissent être les plus restreintes parmi les streptocoques (respectivement seulement 1,8 % et 1,7 %) ce qui suggère la présence de barrières à l'acquisition de matériel génétique exogène chez ces espèces [176, 426]. De manière remarquable, le génome de *S. uberis* 0140J ne contient aucune similarité avec des séquences d'insertion (IS).

Les éléments type ICE détectés chez les streptocoques sont majoritairement retrouvés à l'extrémité 3' de gènes codant des ARNt ou des protéines ribosomiques [433]. La majorité des gènes portés par des ICE chez les streptocoques présente de fortes similarités avec des gènes présents sur le génome d'autres espèces de streptocoques ou même d'espèces n'appartenant pas à la famille des streptocoques. Cet élément révèle la diversité des échanges possibles dans le milieu naturel entre bactéries. Les ICE jouent un rôle primordial dans l'évolution bactérienne par l'acquisition de matériel génétique exogène pouvant conférer des avantages significatifs à une souche pour la colonisation et l'infection d'un hôte. Les ICE constituent ainsi un réservoir de gènes permettant aux bactéries de survivre dans des conditions environnementales fluctuantes [46, 50, 52, 76, 77, 169, 257, 296, 318, 332, 333, 335, 356, 371].

Une espèce bactérienne est définie si l'hybridation ADN/ADN entre deux souches est supérieure à 80%. Au vu des séquençages réalisés ces dernières années et qui révèlent un pan génome ouvert chez les streptocoques, il faut veiller à distinguer la notion d'espèce nouvelle et de souches présentant une adaptation à leur hôte ou à leur environnement puisque l'association souches/environnement paraît très importante dans la pathogénicité des souches.

S. agalactiae constitue la principale cause de septicémies et méningites chez les nouveaux nés et est également pathogène de nombreuses espèces animales [25, 117, 171, 186, 273, 305, 353, 445, 446]. Pour ces raisons, la recherche de moyens de lutte efficaces contre cette bactérie reste d'actualité.

La multiplicité des protéines conférant des fonctions adhésives à *S. agalactiae* lui permet d'adhérer à de nombreux supports et de coloniser et d'envahir ainsi des environnements très variés [189, 242, 286]. Plusieurs protéines peuvent être impliquées dans des rôles similaires et l'absence de l'une d'elle ne troublera que légèrement le pouvoir adhésif de *S. agalactiae*. Par conséquent, afin d'étudier les protéines de surface de *S. agalactiae*, des stratégies parallèles doivent être mises en place. Les protéines des surfaces de *S. agalactiae* peuvent être notamment caractérisées en les exprimant chez un hôte presque dépourvu de protéines de surface comme *Lactococcus lactis* souvent utilisé dans des travaux récents.

Chez *S. agalactiae*, la prévalence et la diversité des ICE intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARNt Lysine (anticodon CTT) dans son génome ont été mis en évidence.

Récemment, le transfert intra-espèce de l'élément intégré chez la souche 515 de *S. agalactiae* (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) a été démontré (travaux de thèse d'Aurore Puymège, laboratoire de génétique et microbiologie, UMR INRA-UHP 1128, *soumis*). Il est composé de modules de régulation, de conjugaison et de recombinaison fonctionnels qui rendent possible son transfert. Chez cette souche, l'ICE pourrait coder d'autres fonctions que celles uniquement impliquées dans la régulation de sa mobilité intracellulaire (intégration/excision) et inter-cellulaire (conjugaison). Notamment, l'ICE pourrait coder pour un système toxine-antitoxine permettant le maintien de l'élément dans la population bactérienne. Deux gènes pourraient coder des protéines impliquées dans la réponse au stress oxydant par l'intermédiaire de la superoxyde dismutase. Trois gènes codent des protéines à motif LPxTG qui pourraient être impliquées dans l'adhésion à l'hôte. Un opéron similaire à un opéron de *B. subtilis*, qui pourrait coder un système de production et d'export d'un peptide aux propriétés antimicrobiennes, est également présent sur l'ICE. Enfin, un gène codant un deuxième facteur CAMP putatif est porté par ICE_*515_tRNA*^{Lys}.

Le premier objectif de ces travaux de thèse a été de caractériser les fonctions pouvant conférer un avantage adaptatif et d'étudier leur rôle dans le maintien de l'ICE et la virulence des souches.

Certaines données suggèrent la possibilité de l'acquisition de tels facteurs de virulence par transfert horizontal. Ainsi, dans un deuxième temps, les fonctions codées par ICE_*515_tRNA*^{Lys} apportant à *S. agalactiae* un réel avantage en termes de virulence et de compétitivité au sein de son microenvironnement ont été recherchées dans une collection de souches de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae, S. bovis, S. suis, S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* et *S. uberis*. Ces travaux ont permis d'évaluer la dissémination de cette famille d'ICE ainsi que les fonctions codées par ces éléments chez les streptocoques.

La stratégie développée comprenait plusieurs étapes. Pour commencer, des analyses bioinformatiques poussées ont été réalisées afin d'étudier les fonctions putatives portées par l'ICE. Ensuite, l'expression des gènes d'intérêt de l'ICE_*515_tRNA*^{Lys} chez la souche 515 de *S. agalactiae* a été analysée par RT-PCR dans différentes phases de croissance en milieu standard de croissance. La caractérisation des différentes fonctions a ensuite été effectuée par des approches de génétique et de biologie moléculaire, puis par des analyses phénotypiques.

La collection de souches du Réseau national d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales en France (RESAPATH) de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a été exploitée afin de déterminer la prévalence des fonctions d'intérêt en fonction de la présence de l'ICE dans une large collection de souches de streptocoques.

MATERIEL ET METHODE

I. Souches et conditions de croissance

Trois souches invasives humaines ont été utilisées dans ces travaux : la souche 515 de *S. agalactiae* du sérotype capsulaire Ia [146], la souche COH1 du sérotype III [400] et la souche NEM316 du sérotype III [401] (numéros d'accession GenBank: respectivement PRJNA54311, PRJNA54317 et PRJNA334). La souche 515 a été isolée du fluide cérébrospinal d'un patient infecté, la souche COH1 a été isolée lors d'une septicémie tandis que la souche NEM316 a été isolée d'un cas fatal de septicémie d'un nouveau-né.

Les souches de streptocoques pathogènes de terrain (n=677) et les deux souches de *S. aureus* ont été isolées par le réseau national d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance chez les animaux en France (www.resapath.anses.fr). Cette collection inclut des isolats de *S. uberis* (n=449), *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (n=162), *S. bovis* (n=31*), S. suis* (n=26) et *S. dysgalactiae* subsp*. equisimilis* (n=9). La grande majorité des souches de *S. uberis* et *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (soit 90% de la collection) a été isolée de mammites bovines entre 1984 et 2010.

La souche MG1363 de *Lactococcus lactis* a été utilisée afin de produire les protéines d'intérêt [317]. Les souches d'*E. coli* ont été utilisées pour les manipulations de clonage. Toutes les souches et les plasmides utilisés et/ou présentant un phénotype recherché ainsi que leurs caractéristiques sont listées dans le tableau 5.

Les souches de streptocoques, de staphylocoques et d'*E. coli* ont été cultivées en infusion cœur cerveau (milieu BHI) (AES CHEMUNEX, Bruz, France) ou sur géloses trypticase soja supplémentées avec 5 % de sang de mouton défibriné (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Les souches de *Lactococcus lactis* ont été cultivées en milieu M17 (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) supplémenté de 0,25 % de glucose soit en milieu liquide soit sur géloses. Les souches de streptocoques et de lactocoques ont été cultivées sans agitation à 37 °C et 30 °C respectivement, tandis que les souches d'*E. coli* ont été cultivées sous agitation à 200 rpm à 37 °C.

Les antibiotiques ont été utilisés aux concentrations suivantes : kanamycine, 50 $\mu g.mL^{-1}$ pour *E. coli* ; érythromycine et ampicilline, 20 $\mu g.mL^{-1}$ pour les souches de streptocoques et lactocoques et 150 $\mu g.mL^{-1}$ pour *E. coli* ; spectinomycine, 500 $\mu g.mL^{-1}$ pour les souches de streptocoques et 50 $\mu g.mL^{-1}$ pour les souches d'*E. coli*.

Tableau 5. Listes des souches et des plasmides utilisés.

Les espèces auxquelles appartiennent les souches sont indiquées dans la colonne de gauche. Les noms des souches et plasmides sont précisés ainsi que leurs phénotypes/génotypes particuliers si nécessaire, l'année d'isolement, l'origine géographique (numéros de départements français), le type d'hémolyse observé, le résultat du test CAMP si nécessaire, l'utilisation faite des souches et des plasmides ainsi que les sources et références. Les souches du Résapath analysées mais ne présentant pas de phénotype particulier ne sont pas indiquées dans cette liste.

	Noms des souches et plasmides	Pathologies ou génotypes importants	Années	Origines	Hémolyse	Résultat test CAMP	Utilisation	Source
Souches								
S. agalactiae	515 (ATCC BAA-1177)	Méningite	/	/	β	+	Constructions / CAMP / adhésion / stress / bactériocine	LGC standards
	515-*SAG2026::ery*	ery^R	/	/	β	+	Constructions	A. Puymège, Comm. Pers.
	515-*SAL_2044::spc*	spc^R	/	/	β	+	Maintien de l'ICE	Ces travaux
	COH1	Septicémie	/	/	β	+	Bactériocine	[400]
	COHI-*SAG2026::ery*	ery^R	/	/	β	+	Bactériocine	A. Puymège, Comm. Pers.
	NEM316	Septicémie	/	/	β	+	Divers (témoin)	[146]
	NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys})	ery^R	/	/	β	+	CAMP / adhésion / stress / bactériocine	Données non publiées
E. coli	DH5α	Souche de clonage	/	/	γ	-	Clonage	[164]
	Top10	Souche de clonage	/	/	γ	-	Clonage	In Vitrogen, USA
	EC101	Souche de clonage	/	/	γ	-	Clonage	
L. lactis subsp. cremoris	MG1363	/	/	/	γ	-	Clonage/bactériocine	[317]
	MG1363 (pOri23-camp^{515})	ery^R	/	/	γ	+	CAMP	Ces travaux

	MG1363 (pOri23-SAL_2056)	ery^R	/	/	γ	-	Adhésion	Ces travaux
S. aureus	CIP57.10	Souche de référence pour le test CAMP	/	/	β	+	CAMP	Institut Pasteur, Paris
	24609	Peau et muqueuses	2010	/	β	/	CAMP/bactériocine	Resapath
	24465	Peau et muqueuses	2010	/	β	/	CAMP/bactériocine	Resapath
S. uberis	21639	Mammite	/	/	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	21457	Mammite	2008	76	α	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	21459	Mammite	2008	76	α	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	21468	Mammite	2008	76	α	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	21512	Mammite	2008	61	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	22492	Mammite	2009	82	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	19827	Mammite	1985	64	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	19843	Mammite	1984	22	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	19908	/	1984	22	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	19909	Mammite	1985	22	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	1352	Mammite	1986	22	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	1825	/	1986	22	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	11535	Mammite	2000	82	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	12538	Mammite	2001	61	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	19623	Mammite	2007	38	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	20576	Mammite	2007	61	α	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	20965	Mammite	2008	29	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	19168	Mammite	2007	01	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	20222	Mammite	2007	74	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	16193	Mammite	2007	42	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	19608	Mammite	2007	01	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	21519	Mammite	2008	68	/	-	Bactériocine	Resapath
	20978	Mammite	2008	37	/	-	Bactériocine	Resapath
	19118	Mammite	2007	50	/	-	Bactériocine	Resapath

	21102	Mammite	2008	54	/	-	Bactériocine	Resapath
S. dysgalactiae subsp.equisimilis	20591	Liquide synovial de cheval	2007	61	β	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
S. bovis	7434	Mammite	1993	82	γ	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	1052	Pneumonie	1985	49	γ	-	Construction	Resapath
	1052 (pOri23-*camp*^{515})	ery^{R}	/	/	γ	+	CAMP	Ces travaux
S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae	24084	/	2010	50	α	+	CAMP/ Rech. ICE	Resapath
	593	/	1984	22	γ	-	Construction	Resapath
	593 (pOri23-*camp*^{515})	ery^{R}	/	/	γ	+	CAMP	Ces travaux
	24122	/	2010	38	/	-	Bactériocine	Resapath
	24098	/	2010	73	α	-	Bactériocine	Resapath
S. canis	20922	Otite de chien	2008	84	/	/	Bactériocine	Resapath
S. suis	19179	Isolée de vache	2007	53	/	-	Bactériocine	Resapath
S. pneumoniae	3993	Moelle de veau	1988	01	α	-	Bactériocine	Resapath
Plasmides	pOri23	*ermAM ori* ColE1 *P23*	/	/	/	/	Constructions	[317]
	pOri23-camp^{515}	*ermAM* ori ColE1 *P23* *SAL_2074*	/	/	/	/	CAMP	Ces travaux
	pOri23-SAL_2056	*ermAM* ori ColE1 *P23* *SAL_2074*	/	/	/	/	Adhésion	Ces travaux
	pUC19	pMB1, Ap^{R}, lacZα	/	/	/	/	Constructions	
	pG+host9	Origine thermosensible pWV01 provenant de pVE6002, Erm^{R}	/	/	/	/	Constructions	[251]
	pG+host9*spc*	plasmide dérivé de pG+host9, Spc^{R}	/	/	/	/	Constructions	X. Bellanger, comm. pers.

II. Manipulations génétiques, biochimiques et de biologie moléculaire

1. Extraction d'ADN

1.1. ADN génomique

L'ADN génomique purifié des souches bactériennes utilisées dans ces travaux a été préparé à l'aide du kit DNAeasy Blood & Tissue Kit selon les recommandations du fournisseur (Qiagen, Hilden, Germany).

L'ADN génomique des souches de streptocoques pour des expériences ne nécessitant pas directement une purification sur colonne, comme par exemple des vérifications, a été extrait de la manière suivante [345]. A partir d'une culture isolée sur le milieu contenant les antibiotiques appropriés si nécessaire, une culture de 10 mL a été ensemencée et placée dans les conditions appropriées sur la nuit. Le culot cellulaire a été récupéré par une centrifugation à 5000 rpm pendant 10 min et resuspendu dans 500 µl d'une solution TE 1X (Tris 100mM pH 8; EDTA, 50 mM pH 8). La suspension a été lavée une deuxième fois par centrifugation et le culot a été repris à nouveau dans 500 µl de TE 1X. Les suspensions ont été traitées avec 20 µl de lysozyme (5 %) durant 45 min à 37 °C puis par 60 µl d'une solution d'EDTA (0,5 M, pH8) et 10 µl de protéinase K (2 %) pendant 10 min à 37 °C. Enfin, 60 µl de SDS à 10 % ont été ajoutés au mélange réactionnel qui a été placé pendant 1 h à 50 °C. 350 µl de solution de précipitation (potassium, 3 M ; acétate, 5 M) ont été ajoutés au mix et celui-ci a été placé à 4 °C pendant 10 min.

Après une centrifugation de 10 min à 13 000 rpm, le surnageant a été collecté dans un nouveau tube eppendorf afin d'éliminer les protéines. Un millilitre d'isopropanol préalablement refroidi à 4 °C a été ajouté au surnageant. Une centrifugation à 4 °C à 14 000 rpm pendant 30 min a permis de précipiter l'ADN. Deux lavages successifs avec de l'éthanol concentré à 70 % ont éliminé les impuretés et les solvants. Les culots d'ADN ont été séchés à 42 °C et repris dans 50 µl d'eau ultrapure.

1.2. ADN plasmidique

Les plasmides nécessitant une purification ont été extraits sur colonnes en utilisant le kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Les constructions plasmidiques n'ayant pas besoin d'être purifiées ont été extraites de la manière suivante. A partir d'une culture isolée sur le milieu approprié, une culture de 3 mL (A, bactéries à coloration Gram négative) ou de 10 mL (B, bactéries à coloration Gram positive) a été réalisée dans le même milieu dans les conditions appropriées à l'espèce bactérienne pendant une nuit. A partir de 1,5 mL (A) ou de la totalité (B) de cette culture, le culot cellulaire a été récupéré par une centrifugation à 5000 rpm pendant 10 min et resuspendu dans respectivement 100 µl ou 300 µl d'une solution de resuspension (glucose, 50mM; Tris HCL 25mM pH 8; EDTA 25 mM). Un deuxième lavage a été effectué de la même manière. 200 µl ou 300 µl (respectivement A et B) d'une solution de lyse et de dénaturation des protéines (NaOH, 0,2N; SDS, 1 %) puis 150 µl ou 300 µl (respectivement A et B) d'une solution de précipitation (potassium, 3 M ; acétate, 5 M) ont été ajoutés successivement après homogénéisation.

Après une centrifugation de 10 min à 13 000 rpm, le surnageant a été collecté dans un nouveau tube eppendorf afin d'éliminer les protéines. Un volume d'isopropanol préalablement refroidi à 4 °C a été ajouté au surnageant et une centrifugation à 4 °C à 14 000 rpm pendant 30 min a permis de précipiter l'ADN. Deux lavages successifs avec de l'éthanol concentré à 70 % ont permis d'éliminer les impuretés et les solvants. Les culots d'ADN ont été séchés à 42 °C et repris dans 20 µl d'eau ultrapure.

2. <u>Réactions d'amplifications en chaine par polymérase</u>

2.1. PCR standards et séquençage

Les PCR standards ont été réalisées dans un volume final de 25 µl contenant 1 U de Taq polymerase (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), du tampon 1x, des amorces

à 0,4 mM, un mix de dNTP à 0,2 mM et 100 ng d'ADN matrice. Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 6. Les conditions de PCR ont consisté en une première dénaturation à 95 °C pendant 2 min suivie par 30 cycles chacun composé d'une étape de dénaturation pendant 30 s, d'une étape d'hybridation à 5 °C en dessous du Tm des amorces pendant 30 s et d'une étape d'élongation à 72 °C sur une durée de 1 min par kb amplifié. Une étape finale d'élongation a été réalisée à 72 °C pendant 10 min.

Les réactions de séquençage ont été réalisées par Beckman Coulter Genomics. Les données obtenues ont été traitées grâce au logiciel BioEdit et/ou BLASTN.

2.2. PCR long range et PCR nichées

Les PCR long range ont été réalisées en utilisant le mix PCR GoTaq® Long PCR Master Mix (Promega, Madison, USA). Les PCR ont consisté en une première dénaturation à 94 °C pendant 2 min suivie de 20 cycles chacun composé d'une étape de dénaturation de 30 s à 94 °C, d'une étape d'hybridation des amorces de 30 s à une température 5 °C inférieure au Tm des amorces utilisées et d'une étape d'élongation de 30 min à 65 °C (Tableau 6). Quinze cycles supplémentaires ont ensuite été réalisés sur le même modèle que les 20 premiers cycles, mais avec une incrémentation de 30 s à chaque étape d'élongation supplémentaire. L'élongation finale a duré 20 min à 72 °C. Un µl du produit d'amplification a été utilisé comme matrice pour les PCR nichées qui ont été réalisées dans les mêmes conditions que les PCR standards.

Tableau 6. Liste des amorces utilisées.

Objectifs	Nom des amorces	Séquence 5'-3'
Construction 515ΔSAG_2025	SAG_2025-1-*Pst*I	AAAAA**CTGCAG**ATGGGACAATTGAAGTTC
	SAG_2025-2-*Avr*II	AAAAA**CCTAGG**ATGAGAAAGAGCCACTT
	SAG_2025-3-*Avr*II	AAAAA**CCTAGG**TACAGTAAATGGACAAACAC
	SAG_2025-4	TTCTTCAACAGTACTTCTACC
515ΔSAN_2147	SAN_2147-1_*Pst*I	TTTTTT**CTGCAG**CCATGAAGAGGTAGTAGGTAT
	SAN_2147-2_*Avr*II	TTTTTT**CCTAGG**TTGGTTTTACTTCTCTCTGA
	SAN_2147-3_*Avr*II	TTTTTT**CCTAGG**AAAAACGAATTAGACAATGT
	SAN_2147-4	CTGCCCATCACTTAATTG
Construction 515ΔSAL_2044	SAL_2044-1	CAGAATGAGGAGGTAATTG
	SAL_2044-2_*Avr*II	TTTTTT**CCTAGG**GTCTCTTTTAATATCTTCT
	SAL_2044-3_*Avr*II	TTTTTT**CCTAGG**CAGGGGCTTGGTCTCGAA
	SAL_2044-4	TCTTTGATCTGCAGTATCTTGTG
Construction 515ΔSAL2057	SAL_2057-1_*Pst*I	TTTTTT**CTGCAG**TACAGTAAGCGTAGCAGT
	SAL_2057-2_*Avr*II	TTTTTT**CCTAGG**ATCTTTAGCTCTATCCACTG
	SAL_2057-3_*Avr*II	TTTTTT**CCTAGG**TCAAACATCACAACTAAGA
	SAL_2057-4	AACAACATGATGACCTGC
Construction 515ΔSAL2059	SAL_2059-1_*Eco*RI	TTTTTT**GAATTC**ATGGTTATTCAGCAGAGA
	SAL_2059-2_*Avr*II	TTTTTT**CCTAGG**ACGTCACTAGTAGCATCACT
	SAL_2059-3_*Avr*II	TTTTTT**CCTAGG**TGATCAGTACTATAGGTCTC
	SAL_2059-4	CATCTCTACGTAAAATAGCTC
Construction 515ΔSAL2074	SAL_2074-1	TTAGACTGTATACTACTGGTGTA
	SAL_2074-2_*Avr*II	TTTTTT**CCTAGG**TCCGAATCCCATGTCAAC
	SAL_2074-3_*Avr*II	TTTTTT**CCTAGG**CGTATTGCTGATCCATTTG
	SAL_2074-4_*Hind*III	TTTTTT**AAGCTT**ACGAATATCGCTGTTGCCT
Cassette spectinomycine	Spec-lox71_*Spe*I Fwd	TTTTT**ACTAGT**TCGTACCGTTCGTATAGCATACATTATA CGAAGTTATCGTAACGTGACTGGCAAGA
	Spec-lox66_*SpeI* Rev	TTTTT**ACTAGT**CGTACCGTTCGTATAATGTATGCTATAC GAAGTTATCCAATTAGAATGAATATTTCCC
Construction NEM316 (ICE_*515_tRNA^{Lys}*)	SAG_2026-1-*Hind*III	AAAAA**AAGCTT**CATTCCATTTAATAACCATC

	SAG_2026-2-*Avr*II	AAAAA**CCTAGG**TCACTCGTTGTTCTACAGTA
	SAG_2026-3-*Avr*II	AAAAA**CCTAGG**AAATAGTGAATATCCCCA
	SAG_2026-4-*Eco*RI	AAAAA**GAATTC** TGTTAGGATTGGAGTTTAG
RT-PCR SAL_2074	CAMP factor II RT-PCR Fwd	ATCATGTCGTAGTTAGTCAAGTTA
	CAMP factor II RT-PCR Rev	TCCGAATCCCATGTCAAC
RT-PCR SAL_2059	SAL_2059-3_*Avr*II	TTTTTT**CCTAGG**TGATCAGTACTATAGGTCTC
	SAL_2059-4	CATCTCTACGTAAAATAGCTC
RT-PCR SAL_2044	SAL_2044-2_*Avr*II	TTTTTT**CCTAGG**GTCTCTTTTAATATCTTCT
	SAL_2044-Fwd-*Nde*I	TTTTTT**CATATG**TTTAATTTTACTGAAGAAGC
RT-PCR SAN_2147	SAN_2147-5	TGAACCAGCAACCCATCT
	SAN_2147-6	ATTCAGAGAGAAGTAAAACCAAT
RT-PCR SAL_2078	SAG_2025-1-*Pst*I	AAAAA**CTGCAG**ATGGGACAATTGAAGTTC
	SAG_2025-2-*Avr*II	AAAAA**CCTAGG**ATGAGAAAGAGCCACTT
Construction de pOri23-camp[515]	CAMP factor II *Bam*HI Fwd	TTTTT**GGATCC**AAGTTATTTTGATTTAGGAGGG
	CAMP factor II *Nsi*I Rev	TTTTT**ATGCAT**GAATATCGCTGTTGCCTT
Construction de pOri23-AgI/II[515]	SAL_2056 *Bam*HI Fwd	TTTTT**GGATCC**TGT GAT ATT TTG AGG GCA AGA T
	SAL_2056 *Pst*I Rev	TTTTT**CTGCAG**GCA TCT CCA ATA AAA TTT GGA AG
Séquençage pOri23-AgI/II[515]	SAL_2056 Fwd-seq	CAGCCAACACCACCGTCAA
	SAL_2056 rev-seq	AGATTGACCTGCTTCATCA
Recherche facteurs CAMP	Uberis factor U34322.1 Fwd	AAGAGGAATGCTTATGGAA
	Uberis factor U34322.1 Rev	TCCACCAAATCTCTTCAAC
Recherche ICE	ICE_*515_tRNA*^{Lys} integrase Fwd	AAGCGTGAAGCTATGAATGA
	ICE_*515_tRNA*^{Lys} integrase Rev	CTACCAGCTATGACAACTCCA
	ICE_*SUB19608_tRNA*^{Lys} integrase Fwd	AAACGTGAAGCTATGAATGAAG
	ICE_*SUB19608_tRNA*^{Lys} integrase Rev	TTACCAGCTATCACAACACC
	tRNA^{Lys} AAA Rev	GGTTATTGCTGTGGCATACG
	HMPREF9319_0116 Fwd	CCCTGCAAGCAAATGAGG
	HMPREF9964_2030 Fwd	CCTCACTTTGCCATTCCT
PCR nichées	CAMP factor II Rev	TCCGAATCCCATGTCAAC
Recherche gènes d'ICE_*515_tRNA*^{Lys}	SAG_2025-5	TTTTT CTGCAG CAT ACG TGT TTC TTA TTT AAT CTT AC

3. Etude de l'expression des gènes d'intérêt par RT-PCR

L'expression des gènes d'intérêt a été étudiée par RT-PCR. Brièvement, une préculture de 10 mL de la souche étudiée a été incubée sur la nuit et ensemencée le lendemain au ratio 1 :100 dans 10 mL du milieu approprié. Deux millilitres de culot cellulaire ont été collectés à une DO à 600 nm de 0,4 ou 0,8 par centrifugation à 2000 × *g* à 4 °C et conservés par un refroidissement rapide à -80 °C. Les échantillons d'ARN ont été purifiés en utilisant le kit RNAeasy mini kit selon les recommandations du fournisseur (Qiagen, Hilden, Germany) avant d'être traités avec la RQ1 RNase free DNase (Promega, Madison, USA) pendant 1 h. Les ADN complémentaires ont été synthétisés en utilisant la retro-transcriptase M-MLV (In Vitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA). Des PCR standards ont été réalisées en utilisant les ADNc obtenus comme matrice pour l'ADN polymérase (Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

4. Electroporation des bactéries

4.1. Electroporation des bactéries à coloration Gram négative

Les électroporations permettant l'acquisition de plasmides par les bactéries à coloration Gram négative ont été effectuées comme décrit antérieurement avec quelques modifications [102]. Des cultures de 100 mL d'*E. coli* ayant atteint une DO à 600 nm comprise entre 0,5 et 0,7 ont été collectées 10 min à 4000 rpm à 4 °C. Le culot a été resuspendu dans 50 mL de glycérol à 10 %. Un deuxième lavage a été réalisé et le culot cellulaire a été repris dans 10 mL de glycérol à 10 %. Une troisième centrifugation dans les mêmes conditions a permis de resuspendre le culot dans un volume final de 300 µl de glycérol à 10 %.

Dans une cuve d'électroporation de 2 mm (Biorad, Munich, Allemagne) préalablement refroidie, 50 µl de cellules compétentes ont été mélangés à 2 µl de produit de

ligation et une électroporation (2.5 kV, 200 Ω et 25 µF) a été réalisée à l'aide du genepulser Xcell (Biorad, Munich, Allemagne). Les cellules ont été rapidement reprises dans 1 mL de milieu SOC (tryptone, 2 %; extrait de levure, 0,5 %; NaCl, 2 mM; KCl, 2,5 mM; $MgCl_2$, 10 mM; $MgSO_4$, 10 mM; glucose, 20 mM) et incubées 1 h à 37 °C sous agitation afin de permettre la regénération des cellules. Les cellules ont ensuite été étalées sur des géloses contenant les antibiotiques appropriés.

4.2. Electroporation des bactéries à coloration Gram positive

Pour les souches de streptocoques, les conditions d'électroporation ont été différentes de celles appliquées aux lactocoques et à *S. bovis*.

Pour les streptocoques, 100 mL d'une suspension bactérienne ayant atteint une DO à 600 nm comprise entre 0,4 et 0,5 ont été mélangés à 100 mL d'une solution 1 (saccharose, 1 M; glycine, 5 %) et incubés à 37 °C durant 1 h. Les cellules ont été collectées par une centrifugation de 10 min à 4500 rpm à 4 °C. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 100 mL d'un tampon d'électroporation (saccharose, 0,25 M; NaH_2PO_4, 7 mM; $MgCl_2$, 1 mM). Un deuxième lavage a été effectué dans les mêmes conditions de centrifugation et le culot a été resuspendu dans 50 mL d'un mélange de tampon d'électroporation et de glycérol à 15 % (ratio 1 :1). Après une dernière centrifugation, le culot cellulaire a été repris dans un volume final de 500 µl du même mélange que l'étape précédente. De 500 ng à 1 µg de plasmides ont été laissés en contact avec 80 µl de cellules compétentes pendant 5 min dans des cuves d'électroporation de 2 mm (Biorad, Munich, Allemagne) et une électroporation a ensuite été réalisée à l'aide du genepulser Xcell (2,5 kV, 10 µF et 600 Ω). Les cellules ont été reprises rapidement dans 1 mL de bouillon BHI et incubées pendant 1 h à 37 °C ou pendant 3 h à 30 °C lors de l'utilisation du vecteur pG+Host9. Les cellules ont ensuite été étalées sur des géloses contenant les antibiotiques appropriés.

En ce qui concerne les lactocoques, 100 mL de milieu M17 supplémenté de 0,5 % de glucose, de 17 % de saccharose et de 1,5 % de glycine ont été ensemencés au ratio 1 :100 à partir d'une préculture et incubés dans les conditions appropriées jusqu'à l'obtention d'une DO à 600 nm d'environ 0,2. Les cellules ont été collectées par une centrifugation de 10 min à 5500 rpm à 4 °C et resuspendues dans 100 mL d'une solution de compétence (saccharose, 17,1 %; glycérol, 10 %) préalablement refroidie à 4 °C. Les cellules ont été lavées dans les mêmes conditions deux fois. Le culot a été repris dans 1 mL final de la solution de compétence. L'ADN à électroporer a été mélangé à 40 µl de cellules compétentes dans des cuvettes d'électroporation (2 mm) et l'électroporation a été réalisée à l'aide du genepulser Xcell à 25µF, 2,0 kV et 200 Ω. Les cellules ont été rapidement resuspendues dans 960 µl de solution de regénération (M17 supplémenté de 17,1 % de saccharose, 0,5 % de glucose, 2,5 mM de $MgCl_2$ et 2,5 mM de $CaCl_2$) et ont été incubées à 30 °C pendant 2 h. Les cellules ont finalement été étalées sur des géloses de milieu M17 supplémenté avec 0,5 % de glucose et incubées dans les conditions appropriées pendant une nuit.

5. Stratégie développée pour la mutagénèse chez *S. agalactiae*

Le plasmide pG+host9 a été employé en tant que vecteur de clonage. Il possède une origine de réplication thermosensible qui dérive de celle du plasmide pWVO1 de *Lacotococcus lactis* et permet la réplication par un mécanisme de cercle roulant chez *E. coli* et les bactéries lactiques. Ce plasmide, en raison d'une mutation dans le gène *repA*, peut se répliquer à 30 °C (température permissive) mais non à 37 °C (température restrictive).

Le plasmide pUC19 a été utilisé comme vecteur de sous-clonage. Il est, contrairement à pG+host9, à un nombre élevé de copies et permet de réaliser plus facilement les clonages chez *E. coli*.

5.1. Construction des plasmides pUC19 contenant les cassettes d'interruption

Les deux extrémités de chacun des gènes à interrompre ont été amplifiées à l'aide d'une polymérase à haute fidélité Phusion® High-Fidelity (Finnzymes, Keilaranta, Finland) selon les recommandations du fournisseur (Figure 26, étape 1). Les amorces externes utilisées lors de cette réaction contiennent chacun des sites de restrictions appropriés aux vecteurs pUC19 et pG+host9. Des sites *Avr*II ont été intégrés au sein de chacune des amorces internes qui sont compatibles avec les sites *Spe*I des amorces utilisées pour amplifier une cassette de résistance à la spectinomycine (issue du vecteur pG+host9spc) (Figure 26, étape 6). Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 6. Après amplification, les fragments d'ADN obtenus ont été vérifiés sur gel puis digérés par les enzymes appropriées. Les plasmides pUC19 et pG+host9 purifiés ont été digérés avec les enzymes de digestion appropriées (Figure 26, étapes 2 et 10). Les inserts et le plasmide pUC19 ainsi obtenus ont été purifiés à l'aide du kit High pure PCR Product Purification (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). La ligase T4 a permis la ligation entre les deux inserts du gène à interrompre et le vecteur pUC19 selon les recommandations du fournisseur à 16 °C pendant 16 h (Promega, Madison, USA). Deux microlitres du produit de ligation a été électroporé dans des cellules compétentes d'*E. coli* DH5α (Figure 26, étapes 3 et 4). Les profils de restriction des plasmides des clones obtenus ont été vérifiés à la suite d'une extraction d'ADN plasmidique (Figure 26, étape 5).

Le plasmide obtenu a été purifié et digéré par *Avr*II. La ligation des produits de digestion de ce plasmide et de la cassette de résistance, l'électroporation et la vérification des clones ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus (Figure 26, étapes 5, 6, 7 et 8).

5.2. Construction des plasmides pG+host9 contenant les cassettes d'interruption

Les plasmides obtenus précédemment ont été purifiés et digérés au niveau des sites de restriction externes à la cassette d'interruption. Les cassettes ont été purifiées sur gel à l'aide du kit High pure PCR Product Purification (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) (Figure 26, étapes 9 et 10). A la suite d'une ligation entre le vecteur pG+host9 et la cassette d'interruption, 2 µl du produit de ligation obtenu ont été électroporés dans des cellules électrocompétentes d'*E. coli* EC101 (cellules portant une origine de réplication qui permet aux vecteurs pG+host9 de se répliquer à 37 °C) (Figure 26, étape 11). La vérification des clones obtenus a été réalisée par digestion de l'ADN plasmidique extrait (Figure 26, étape 12).

5.3. Mutagenèse chez S. agalactiae

Des cellules électrocompétentes (cf paragraphe 4.2) de la souche 515 de *S. agalactiae*, ont été électroporées avec les plasmides pG+host9 possédant les cassettes d'interruption. Les géloses ont été incubées à 30 °C (température permissive de pG+host9) en présence des antibiotiques appropriés (Figure 26, étapes 13 et 14). Quelques colonies ont été placées en culture liquide une nuit à 37 °C (température restrictive de pG+host9). L'ADN génomique a été extrait à partir de clones isolés des cultures afin de déterminer le sens d'intégration des plasmides (recombinaison homologue par l'insert gauche ou droit) et de détecter la présence/absence de tandem (Figure 26, étape 15).

A la suite de ces vérifications, des shifts de température (entre 3 et 10) ont été réalisés afin de sélectionner le deuxième évènement de recombinaison correspondant à la perte du vecteur pG+host9. Après le dernier shift de température à 37 °C, des colonies ont

été isolées sur géloses [14]. A partir des colonies isolées, des répliques (en général de 2000 à 4000) ont été réalisées sur des géloses contenant ou non de l'érythromycine (résistance de pG+host9). Les clones positifs doivent être sensibles à l'érythromycine (perte du vecteur pG+host9). L'ADN génomique de ces clones a été extrait afin de vérifier par PCR l'interruption du gène d'intérêt (Figure 26, étape 15).

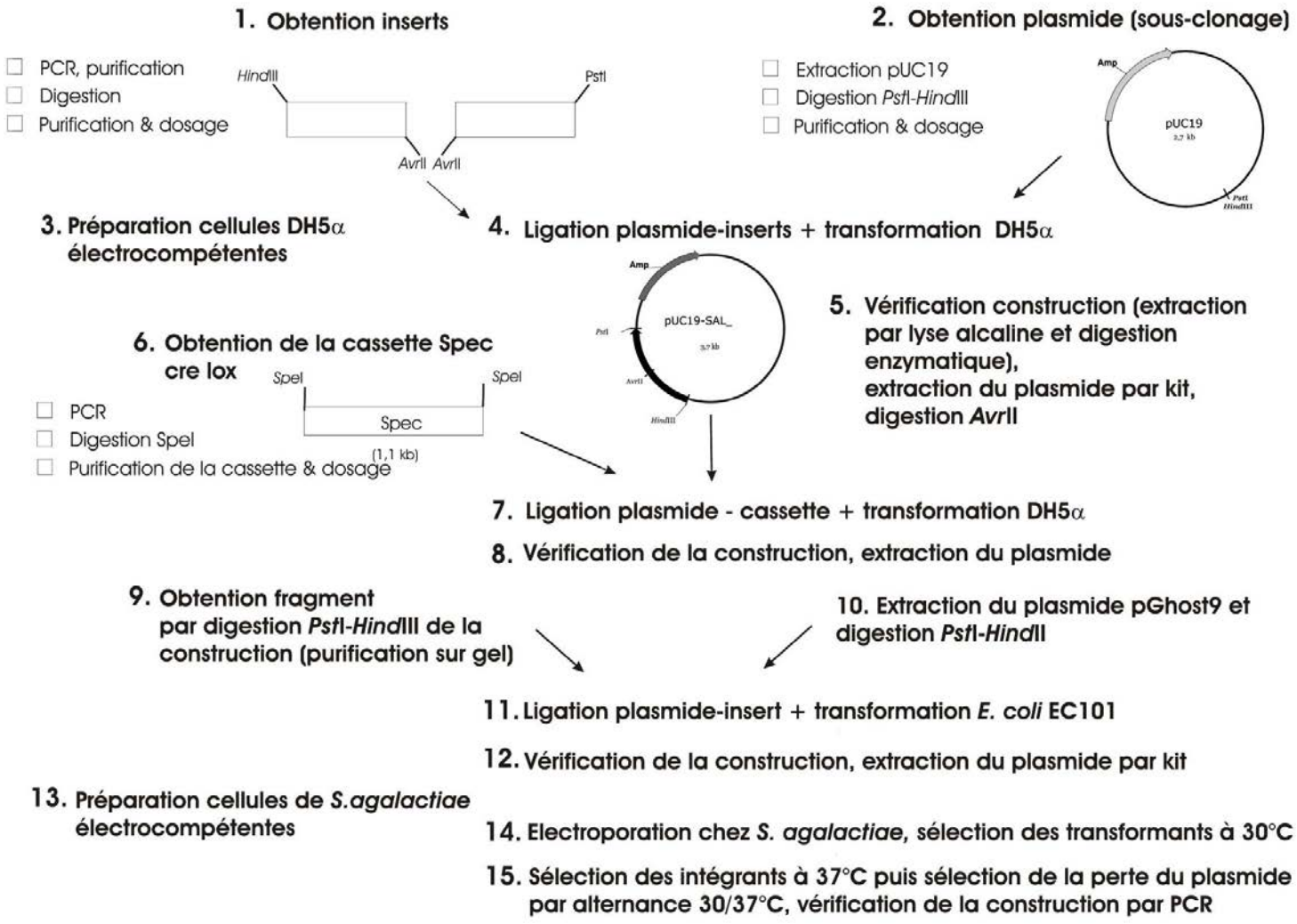


Figure 26. Représentation schématique des différentes étapes de la construction d'un mutant chez *S. agalactiae*.

6. Marquage des ICE et construction du transconjugant NEM316 (ICE *515 tRNA^{Lys}*).

L'étude du transfert conjugatif d'un ICE nécessite le marquage de l'élément afin de pouvoir le suivre lors de l'événement de conjugaison. Il est également essentiel de sélectionner une souche receveuse présentant une résistance à un antibiotique différente de celle de la cellule donatrice. Ces deux constructions ont permis de sélectionner des transconjugants c'est-à-dire les cellules receveuses qui ont acquis l'ICE. Le gène de résistance à l'érythromycine a été choisi pour marquer les ICE car la fréquence de résistance spontanée à cet antibiotique aux concentrations utilisées est très faible chez les streptocoques. Il permet donc la détection du transfert à de faibles fréquences.

ICE_*515_tRNA^{Lys}* et ICE_*COH1_tRNA^{Lys}* ont été marqués à leur extrémité gauche au niveau du gène homologue au gène SAG2026 de la souche 2603 V/R, qui code une sous-unité ATPase d'un transporteur de type ABC, en utilisant le vecteur pG+host9spc. Le vecteur pG+host9spc est un dérivé du vecteur pG+host9 portant à la place du gène de résistance à l'érythromycine, un gène de résistance à la spectinomycine provenant du vecteur pSET4S (travaux de Xavier Bellanger, communication personnelle) [251].
Pour construire le mutant, les extrémités 3' et 5' du gène SAG2026 ont été amplifiées indépendamment par PCR et clonées dans le vecteur pG+host9 comme décrit ci-dessus (amorces SAG2026-1-*Hin*dIII, SAG2026-2-*Avr*II, SAG2026-3-*Avr*II and SAG2026-4-*Eco*RI).
Un gène de résistance à l'érythromycine a été amplifié en utilisant le vecteur pG+host9 et inséré dans le site interne *Avr*II entre les deux extrémités du gène SAG2026. Le vecteur ainsi obtenu pG+host9spc-SAG2026:*ery*, contenant l'insert complet (les deux fragments de SAG2026 séparés par la cassette *ery*), a été utilisé pour transformer *S. agalactiae* par électroporation [131]. Deux évènements de recombinaison, en amont et aval de la région taggée, ont été sélectionnés comme décrit précédemment pour obtenir le remplacement du gène par la cassette *ery* [14].

L'ICE_*515_tRNA^{Lys}*-SAG2026 ::ery a été transféré à la souche receveuse NEM316 par conjugaison sur filtre comme déjà décrit avec des modifications mineures [14]. Brièvement,

la souche receveuse et la souche donneuse ont été cultivées une nuit à 37°C. Quinze millilitres de milieu ont été inoculés avec 150 µl de culture de la souche donneuse ou receveuse. Les souches ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance (DO à 600 nm de 0,4). Les deux cultures ont été mélangées et centrifugées pendant 15 min à 4,500 × *g*. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 1 mL de milieu BHI, et 150 µl ont été étalés sur des filtres en nitrocellulose de 0,45 µm (Sartorius, Goettingen, Germany) déposés sur des géloses trypticase soja contenant 5% de sang de mouton défibriné. Les géloses ont été incubées pendant 15 h à 37 °C. Les filtres ont été enlevés des géloses et placés dans des flacons contenant 10 mL de milieu BHI et vortexés pendant 30 s. Des dilutions ont été étalées sur des géloses supplémentées avec les antibiotiques appropriés et celles-ci ont été incubées pendant 24 h afin d'obtenir les transconjugants.

7. Construction des plasmides pOri23-camp^{515} et pOri23-SAL_2056

Les caractéristiques du plasmide pOri23 [317] sont listées dans le tableau 5 (page 101). Les étapes de clonage ont été réalisées en utilisant *E. coli* comme souche hôte.
Les gènes SAL_2074 et SAL_2056 codant le facteur CAMP et un antigène I/II putatifs et présents sur ICE_*515_tRNA^{Lys}*, ainsi que leur site RBS (Ribosomal Binding Site) et leur terminateur, ont été amplifiés en utilisant la polymérase haute fidélité Phusion® High-Fidelity (Finnzymes, Keilaranta, Finland). Les amorces utilisées pour amplifier SAL_2074 sont CAMP factor II *Bam*HI Fwd et CAMP factor II *Nsi*I Rev tandis que l'amplification de SAL_2056 a nécessité les amorces SAL_2056 Fwd-*Bam*HI Fwd et SAL_2056 Rev-*Pst*I Rev (Tableau 6, page 107). Les sites de restriction *Bam*HI, *Nsi*I ou *Pst*I ont été incorporés à l'extrémité 5' de chacune des amorces afin de permettre la ligation finale.

Les fragments PCR obtenus pour SAL_2074 et pour SAL_2056 (922 et 2764 pb) ont été vérifiés sur gel d'agarose et sous-clonés en utilisant le vecteur Zero Blunt® TOPO® et des cellules compétentes d'*E. coli* Top10 (In Vitrogen life Technologies, Carlsbad, USA). Les vecteurs obtenus ont été extraits sur colonnes en utilisant le kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Germany) puis digérés par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Nsi*I

pour le plasmide contenant l'insert SAL_2074 et *Bam*HI et *Pst*I pour celui contenant l'insert SAL_2056 (Promega, Madison, USA). Les inserts ainsi digérés ont été purifiés sur les colonnes du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

En parallèle, le vecteur natif pOri23 a été digéré par *Bam*HI et *Pst*I puis lié aux inserts avec la ligase T4 (Promega, Madison, USA). Les vecteurs ont été transformés par électroporation dans des cellules compétentes d'*E. coli* DH5α comme décrit précédemment [164, 345]. Enfin, les vecteurs pOri23-camp^{515} et pOri23-SAL_2056 ont été purifiés et électroporés chez *L. lactis* MG1363 et chez *S. bovis* et *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* pour pOri23-camp^{515} [49, 317].

8. Analyse des surnageants par SDS-PAGE

Après culture pendant une nuit dans du milieu BHI ou MCD (milieu chimiquement défini, [234]), les surnageants des souches testées ont été collectés après une centrifugation à 5000 x *g* à 4 °C pendant 10 minutes. Les protéines ont été précipitées en utilisant un protocole mettant en jeu du deoxycholate de sodium (DOC) et de l'acide trichloroacétique (TCA) [15]. Brièvement, le DOC a été ajouté à une concentration finale de 0,02 % à 30 ml de surnageant. Après une homogénéisation et un temps d'attente de 30 min sur glace, du TCA a été ajouté à une concentration finale de 10 %. Les protéines des surnageants des cultures ot été précipitées pendant une nuit à 4 °C. Le précipitat a été récupéré par une centrifugation à 14 000 x *g* à 4 °C pendant 15 min. Le surnageant a été délicatement enlevé. Les protéines ont été lavées deux fois dans de l'acétone froid préalablement stocké à -20 °C. Les culots ont été séchés sous vide et resuspendus dans 50 mM de Tris-HCl à pH 6,8 afin d'atteindre une concentration des surnageants de 250 fois pour ceux issus du milieu BHI et 1000 fois pour ceux issus du milieu MCD. Les protéines ont été séparées en fonction de leur taille par électrophorèse dans un gel de sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) à 12 %.

9. Spectrométrie de masse sur des surnageants précipités

Les bandes du gel de SDS-PAGE d'intérêt ont été découpées et traitées comme décrit ci-après pour une identification du contenu. Les expériences ont été réalisées à Nancy par la plateforme de protéomique de la Fédération de Recherche FR3209.

Les cystéines ont été réduites dans du DTT (30 mM, préparé dans 100 mM de bicarbonate d'ammonium, BA) et alkylées dans de l'iodoacétamide (30 mM dans du BA). Chacun des deux traitements a duré 30 min à température ambiante. Après deux cycles de lavages de 15 min chacun dans du BA et du BA / acétonitrile (ratio 1 : 1), les bandes ont été séchées sous vide pendant 1 h, et digérées pendant une nuit à température ambiante avec 100 ng de trypsine après une resuspension dans 20 µl de BA. Les peptides ont été extraits deux fois consécutivement dans 25 µl d'une solution d'acétonitrile à 80 % et d'acide trifluoroacétique (TFA) à 1 %, pendant 10 min par sonication dans un bain d'eau. Les peptides extraits ont été mélangés, séchés sous vide et re-uspendus dans une solution contenant 2 % d'acétonitrile et 0,1 % de TFA.

L'HPLC a été réalisée en utilisant un équipement Ultimate 3000 (Dionex). Les peptides (6,4 µl) ont été injectés dans une colonne dessalante et déposés sur des colonnes Acclaim pepmap RSLC C18, 15 cm. Les peptides ont ensuite été élués pendant une séquence de 60 min par un gradient linéaire d'acétonitrile 2-45 % et 192 fractions par échantillon ont été récupérées sur un fractionneur 384 anchorchip MALDI plate via un Proteineer FcII (Bruker) et mixées avec de l'acide α-Cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) directement lors du dépôt. L'acquisition des données en modes TOF et TOF/TOF a été réalisée automatiquement en utilisant WARP-LC comme logiciel pilote sur un spectromètre de masse Autoflex speed MALDI (Bruker). L'annotation des peptides, l'identification des protéines et les notations ont été réalisées grâce au serveur Proteinscape en autorisant une tolérance de 50 ppm pour les mesures de masse. La recherche de la taxonomie des bactéries a été effectuée en interrogeant la base de données NCBInr via un serveur local Mascot.

III. Analyses phénotypiques

1. Analyse *in silico* et recherche de fonctions putatives des gènes d'intérêt

Les gènes et protéines d'intérêt ont été analysés informatiquement à l'aide de différents outils informatiques. Les séquences nucléotidiques et protéiques disponibles ont été collectées à l'aide des bases de données GenBank et GenPept. Les alignements nucléotidiques et protéiques ont été réalisés à l'aide des logiciels BioEdit et Vector NTI (InVitrogen). La taille en acide aminés, la masse et le point isoélectrique des protéines ont été prédits à l'aide du logiciel UniProtKB. Les BLAST nucléotidiques ont été effectués avec le logiciel BLASTN tandis que les BLAST protéiques ont été réalisés à l'aide des logiciels UniProtKB et BLASTP. Les domaines conservés des protéines ont été recherchés à l'aide de l'outil CDsearch. Les résultats qui ont été retenus de l'ensemble des BLAST sont ceux présentant une significativité statistique (pvalue < 0.05) et présentant des caractéristiques particulières (protéines homologues déjà étudiées dans la littérature, homologues chez des hôtes particuliers, etc.). La littérature existante sur les domaines conservés des protéines d'intérêt ainsi que celle concernant les homologues de ces protéines chez *S. agalactiae* ou d'autres espèces ont permis d'appuyer l'analyse *in silico*. L'ensemble des résultats ainsi obtenus a permis de prédire des fonctions putatives aux protéines étudiées et d'orienter les travaux.

2. Test de résistance au stress oxydant

Plusieurs molécules sont susceptibles de générer du stress oxydant. Dans ces travaux, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a été utilisé pour générer un tel stress. Les souches à tester ont été cultivées une nuit dans le milieu approprié. Le lendemain, le même milieu a été inoculé au ratio 1 :100 à partir de la préculture. Quand les cultures ont atteint une DO de 0,4 à 600 nm, 20 mM de peroxyde d'hydrogène ont été ajoutés. Les cultures ont été incubées à 37 °C pendant 60 min dans ces conditions. Des dilutions en séries (1 : 10) ont été réalisées

puis 100 µl ont été étalés sur des géloses appropriées placées ensuite à 37 °C durant 24 h. Les unités formant des colonies ont été comptées afin de déterminer le taux de survie par rapport à des souches non traitées avec du peroxyde d'hydrogène.

3. Analyse des propriétés antimicrobiennes

La détermination d'une éventuelle propriété antimicrobienne conférée par l'ICE a été déterminée sur gélose. La production de bactériocine a été évaluée par l'observation ou non de zone d'inhibition de croissance de souches indicatrices.

Des spots de 10 µl des cultures d'une nuit des souches à tester ou des surnageants des cultures filtrées ont été déposés sur gélose Mueller Hinton (Biorad). Les gouttes ont été séchées 20 min sous hotte à flux laminaire. Un millilitre d'une culture d'une nuit des souches indicatrices a été mélangé à 13 mL de BHI soft ou M17 soft (agar, 8 %) maintenus en surfusion. Des surcouches ont été réalisées avec chacune des souches indicatrices sur les boites sur lesquelles ont été déposés les spots. Les boites ont été incubées 24 h dans les conditions appropriées.

4. Mesure de l'activité co-hémolytique

4.1. Test CAMP

Les souches de la collection du Resapath ont été testées pour leur réaction au test CAMP [75]. Brièvement, la souche CIP 57.10 de *S. aureus* productrice de β-toxine (Institut Pasteur, Paris) a été striée sur gélose trypticase soja avec 5 % de sang. Les souches examinées par rapport à la production d'un facteur type CAMP ont été striées perpendiculairement à la première strie de *S. aureus*. Après une incubation d'une nuit à

37 °C, les souches produisant un facteur type CAMP développent une réaction hémolytique synergique en forme de flèche entre elles et *S. aureus* (Figure 27).

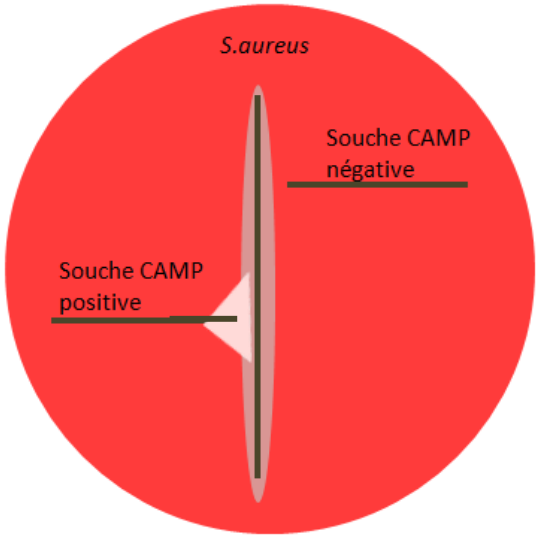


Figure 27. Schéma de la réalisation d'un test CAMP.

4.2. Suivi hémolytique de la réaction synergique CAMP

La titration de l'hémolyse a été réalisée par un suivi de densité optique à l'aide d'un lecteur de microplaques comme décrit avec des modifications mineures [379]. Les érythrocytes de 2 mL de sang de mouton défibriné (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) ont été collectés par une centrifugation à 4 °C à 2000 x *g* pendant 30 min. Les érythrocytes ont été lavés 5 fois dans du tampon d'hémolyse (Tris-HCl, 10 mM; NaCl, 150 mM; pH 7,4) de manière similaire à la centrifugation précédente et une suspension à 1 % (v/v) d'érythrocytes a été traitée avec 0,025 U/mL de sphingomyélinase (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) pendant 30 min à 37 °C. Des témoins sans traitement à la sphingomyélinase ont été réalisés en parallèle. Cent microlitres de la suspension d'érythrocytes ont été distribués dans les puits d'une microplaque de 96 puits en polystyrène à fond plat (NUNC immuno plate

Maxisorb, Roskilde, Denmark). Des cultures bactériennes ont été réalisées à partir d'une préculture d'une nuit et d'une dilution (ratio 1 :100) jusqu'à l'obtention d'une DO à 600 nm de 0,8 et les surnageants des cultures ont été récupérés par une centrifugation de 10 min à 2000 x *g*. Les surnageants ont été filtrés à l'aide d'un filtre de 0,2 µm et dilués en série de 2 en 2. Cent microlitres de chaque surnageant ont été distribués dans les puits de la microplaque. L'activité co-hémolytique a été évaluée à l'aide d'un lecteur de microplaques (Biotek ELx808). Les expériences ont été réalisées en triplicat technique pour chacun des 3 réplicats biologiques.

5. Analyse des propriétés adhésives

5.1. Etude de la formation de biofilm sur polystyrène

Des précultures sur la nuit ont été réalisées dans les conditions et avec les antibiotiques appropriés. Du bouillon BHI supplémenté de 1 % de glucose a été inoculé au ratio 1 :100 à partir de cette préculture. Les souches ont été cultivées dans les conditions appropriées jusqu'à l'obtention d'une DO à 600 nm de 0,1 et 1,5 mL de chaque culture a été distribué dans les puits de plaques de culture cellulaire de 24 puits à fond plat en polystyrène (Falcon, Frankin lakes, USA). Après une incubation de 24 h à 37 °C pour les souches de streptocoques et à 30 °C pour les souches de lactocoques, les plaques ont été lavées deux fois avec du tampon phosphate saline (PBS) (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) puis séchées 45 min à 55 °C. Les biofilms formés ont été visualisés par une révélation au cristal violet (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) concentré à 0,2 % pendant 45 min à température ambiante suivie d'un séchage à 55 °C. La biomasse a été resuspendue dans 1 mL d'un mélange éthanol / acétone (80 :20) afin de réaliser la quantification par une lecture spectrophotométrique à 595 nm. Les expériences ont été réalisées en quatre réplicats techniques pour chacun des trois réplicats biologiques.

5.2. Etude de l'architecture des biofilms par microscopie confocale

Les biofilms ont été réalisés dans des microplaques de 96 puits en polystyrène avec une base mclearH (Greiner Bio-one, France). Les biofilms immergés âgés de 24 heures ont été observés à l'aide d'un microscope confocal inversé à balayage laser Leica SP2 AOBS (CLSM, LEICA Microsystems, France) sur la plateforme de microscopie MIMA2 (http://www6.jouy.inra.fr/mima2). Pour les observations de biofilms immergés, le milieu de culture BHI des puits a été remplacé par du milieu BHI frais après la première étape d'adhésion (3 heures) afin d'éliminer les bactéries planctoniques.

Les cellules ont été marquées en utilisant un mix de fluorophores composé de SYTO 9 et d'iodure de propidium (InVitrogen), qui exploite les différences de perméabilité cellulaire et d'affinités aux acides nucléiques. Après 15 minutes d'incubation à temperature ambiante, la microplaque a été montée sous la platine motorisée du microscope confocal. Les microplaques ont été scannées à 400 Hz en utilisant un objectif à immersion x 63 et une ouverture numérique de 1,4. L'excitation des fluorophores a été réalisée à 488 nm par un laser argon, et la fluorescence émise a été enregistrée dans les gammes 500-550 nm pour le fluorophore SYTO 9 (fluorescence verte) et 600-650 nm pour l'iodure de propidium (fluorescence rouge). Afin de quantifier le nombre de cellules attachées au fond des microplaques, un total de neuf images a été acquis pour chacune des souches étudiées dans trois puits différents. Afin de générer les images des biofilms, un minimum de six séries Z d'images avec un pas de 1 mm a été acquis pour chaque souche dans trois puits différents.

Les projections en 3 dimensions des biofilms ont été reconstruites à partir de la série Z des images en utilisant le logiciel Imaris v7.0 (Bitplane, Suisse). Les biovolumes des biofilms immergés et les autres caratéristiques obtenues ont été calculés à l'aide du logiciel Phlip, une version du logiciel d'analyse d'image Matlab disponible gratuitement (http://phlip.sourceforge.net/phlip-ml). Le biovolume représente le volume global d'un biofilm (en mm^3) et peut être utilisé pour estimer la biomasse totale. Il a été défini comme étant le nombre de pixels d'avant plan dans une série d'images plan multiplié par le volume de voxel, qui est le produit de la taille des pixels au carré et de la taille de pas du balayage. Le ratio du volume rapporté à la surface du biofilm reflète la fraction du biofilm exposé au flux nutritif. La distribution des cellules sur le substrat est également mesurable.

5.3. Etude de l'adhésion à des protéines salivaires

5.3.1. Collecte de salive

La collecte de salive a été réalisée comme précédemment décrit [248]. La salive de 5 à 8 volontaires sains a été collectée. La salive a été poolée et du dithiothréitol (DTT) (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) a été ajouté à une concentration de 2,5 mM. Les matières particulaires et la mucine ont été éliminées par une centrifugation à 13 000 x *g* pendant 10 min. La salive ainsi clarifiée a été diluée à 10 % avec de l'eau distillée stérile. La solution à 10 % a été filtrée à travers un filtre en nitrocellulose de 0,2 µm. La salive clarifiée diluée a été conservée à -20 °C.

5.3.2. Test d'adhésion aux protéines salivaires

Les souches bactériennes testées ont été cultivées une nuit à 30 °C ou 37 °C selon l'organisme étudié et en présence des antibiotiques appropriés.

Du milieu de culture additionné de 0,2 % de glucose a été ensemencé à partir des précultures de la veille à un ratio 1 :100 et les souches ont été cultivées jusqu'à l'obtention d'une DO à 600 nm de 0,1. Les microplaques, préalablement recouvertes avec 1 mL de solution de salive traitée à 10 % pendant 16 h à 4 °C, ont été ensemencées avec 1 mL de suspension bactérienne. Les plaques ont été incubées 24 h à 30 °C ou 37 °C selon l'organisme étudié et lavées deux fois avec du PBS. Les puits ont ensuite été séchés 45 min à 55 °C puis incubés en présence de 1 mL de cristal violet 0,2 % pendant 45 min à température ambiante. Les plaques ont été lavées jusqu'à l'élimination complète du cristal violet et séchées à 55 °C. La biomasse a été resuspendue dans 1 mL d'un mélange éthanol / acétone à un ratio 80:20 et la quantification de la biomasse formée durant la phase de biofilm sur le substrat a été réalisée par une mesure spectrophotométrique à une DO de 595 nm.

5.4. Test d'adhésion à des protéines humaines

Des tests en microplaques de 96 puits (NUNC immuno plate Maxisorb, Roskilde, Denmark) ont été effectués afin d'évaluer l'adhésion de souches à des protéines humaines de la matrice extracellulaire. L'adhésion à trois types de protéines a été évaluée : au fibrinogène provenant de plasma humain (F3879, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), à la fibronectine issu de plasma humain (F0895, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) et au collagène isolé de placenta humain (C7521, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA).

Cent microlitres de PBS ont été distribués dans les puits de la microplaque. Cent microlitres de protéines humaines ont ensuite été ajoutés dans la première colonne à des concentrations de 0,25 mg/mL pour la fibronectine et le collagène et 1 mg/mL pour le fibrinogène puis des dilutions sériées de 2 en 2 ont été effectuées. Une des colonnes ne contenait pas de protéine et a été utilisée comme témoin négatif. Les plaques ont été recouvertes à 4 °C pendant 16 h puis lavées 3 fois avec du PBS. Les sites de fixation non spécifiques ont été bloqués par l'ajout d'une solution de PBS contenant 2 % d'albumine de sérum bovin (BSA) (Sigma Aldrich, Saint Louis) pendant 1,5 h à température ambiante. Des témoins sans blocage des sites aspécifiques ont été réalisés. Les plaques ont à nouveau été lavées 3 fois à l'aide de PBS.

Dix millilitres de culture des souches ont été incubés une nuit dans les conditions de culture appropriées et le culot cellulaire a été récupéré par une centrifugation de 10 min à 3000 x *g*. Le culot a ensuite été repris dans 1 mL de PBS. Deux cents microlitres de suspension bactérienne ont été répartis par puits et les microplaques ont été incubées 3 h à 37 °C avant d'être lavées 3 fois avec du PBS. Les cellules qui ont adhéré ont été fixées 45 min à 55 °C.

La biomasse fixée a été révélée par une coloration au cristal violet concentré à 0,2 % pendant 45 min à température ambiante. Les puits ont été lavés jusqu'à l'élimination complète du cristal violet résiduel (3 à 4 lavages nécessaires). La biomasse bactérienne a été resuspendue dans 200 µl de tampon citrate (citrate de sodium dihydraté 18,4 g, acide citrique anhydre 9,2 g, eau distillée qsp 1000 mL, pH 4,5) pendant 1,5 h à température ambiante et la quantification a été réalisée par une lecture spectrophotométrique à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Biotek ELx808).

6. Analyse statistique des données

Les données brutes des tests phénotypiques ont été analysées à l'aide du test statistique non paramétrique de Mann-Whitney. Les nombres d'observations étaient identiques pour chacun des échantillons indépendants. Les deux échantillons sont considérés comme statistiquement différents si la pvalue obtenue du test est, au moins, inférieure à 0,05. Ce test, basé sur la technique des rangs, a été choisi étant donné le nombre de données pour chacun des échantillons observés. Les tests ont été réalisés en utilisant des commandes du logiciel R.

RESULTATS

Les éléments intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARNt Lysine (anticodon CTT) sont très fréquents chez *S. agalactiae* et sont également retrouvés chez d'autres streptocoques [40, 161]. Des travaux précédents ont permis de montrer la fonctionnalité (excision, conjugaison et intégration chromosomique chez une souche receveuse) de l'ICE chez la souche 515 de *S. agalactiae*, nommé ICE_*515_tRNA*^{Lys} (travaux de thèse d'Aurore Puymège, laboratoire de génétique et microbiologie, UMR INRA-UHP 1128, *soumis*).

Cet élément génétique mobile est composé d'un module de régulation, d'un module de conjugaison et d'un module de recombinaison fonctionnels qui rendent possible son transfert, mais également d'autres ORF que celles impliquées dans sa mobilité. Une analyse *in silico* en utilisant le logiciel BLASTP, suggère que certains de ces gènes seraient impliqués dans le maintien de l'ICE en favorisant le succès évolutif de son hôte, et pourraient notamment être impliqués dans sa virulence (Figure 27). ICE_*515_tRNA*^{Lys} a donc été choisi comme modèle d'étude pour la caractérisation fonctionnelle des fonctions pouvant être véhiculées par l'intermédiaire de cette famille d'ICE.

La première partie des résultats des travaux de thèse consiste en l'analyse *in silico* des gènes d'intérêt d'ICE_*515_tRNA*^{Lys}. Cette analyse a permis de prédire des fonctions putatives codées par l'ICE.

Une deuxième partie des travaux a porté sur l'expression des gènes détectés permettant de conférer des fonctions d'intérêt à l'hôte.

Les trois parties suivantes présentent les résultats des tests phénotypiques réalisés en lien avec les fonctions d'intérêt (résistance face à un stess oxydant, propriétés antimicrobiennes, maintien de l'ICE, propriétés d'adhésion et propriétés hémolytiques).

Une dernière partie est centrée sur l'étude du transfert de fonctions codées par ICE_*515_tRNA*^{Lys} à d'autres bactéries pathogènes d'intérêt sanitaire humain et vétérinaire.

I. Analyse *in silico* des fonctions putatives portées par ICE *515 tRNA*^{Lys}

1. Système de maintien de l'ICE

L'analyse *in silico* a mis en évidence un système toxine-antitoxine putatif codé respectivement par les gènes SAL_2044 et SAL_2045 situés au sein du module de conjugaison d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} (Figure 28, page 135).

SAL_2044 code une protéine de 84 aa (numéro d'accession GenBank : ZP_00789072) tandis que SAL_2045 code une protéine de 85 aa (numéro d'accession GenBank: ZP_00789110) (Tableau 7). Les protéines ont un poids moléculaire prédit respectivement de 10,45 et 10,32 kDa et un pI acide théorique de 6,29 et 4,93 (Uniprot) (Tableau 7). Ce système est également présent sur d'autres ICE situés au même locus chez d'autres souches de *S. agalactiae* mais n'a pas encore été caractérisé. Le système SAL_2044/SAL_2045 a une identité de séquences de 100 % par rapport aux systèmes présents sur les ICE intégrés à l'extrémité 3' du gène codant l'ARNt Lysine chez les souches 2603 V/R (ICE_*2603V/R_tRNA*^{Lys}) et FSL S3-026 (ICE_*FSLS3026_tRNA*^{Lys}). ICE_*COH1_tRNA*^{Lys} présent chez la souche COH1 de *S. agalactiae* code une toxine et une antitoxine putatives similaires à SAL_2044 et SAL_2045 (identité de respectivement 97 % et 100 %).

De manière intéressante, un système identique est également présent chez la souche de *Streptococcus urinalis* 2285-97 (identité de 100 % pour les deux protéines) [79]. Celui-ci est codé par les gènes STRUR_1968 (SAL_2044) et STRUR_1969 (SAL_2045).

Une analyse par BLASTP indique l'appartenance de SAL_2044 et de ses homologues à la famille des toxines Txe et celle de SAL_2045 à la famille des antitoxines de type YefM. Une analyse bioinformatique a ainsi révélé que SAL_2044 et SAL_2045 présentent 56 % et 45 % d'identité de séquence protéique avec les protéines fonctionnelles déjà décrites dans la littérature, respectivement Txe (pour Toxine d'*Enterococcus faecium*) et Axe (pour

Antitoxine d'*Enterococcus faecium*) [151, 162]. Par ailleurs, SAL_2044 et SAL_2045 présentent respectivement 56 % et 29 % d'identité avec les protéines YoeB et YefM codées par des gènes ayant une localisation chromosomique chez *E. coli* et *S. pneumoniae* (Tableau 7) [285].

Les protéines Txe, Axe, YoeB et YefM ont, comme SAL_2044 et SAL_2045, un poids moléculaire avoisinant les 10 kDa. Txe (toxine) et Axe (antitoxine) ont un pI théorique respectivement de 8,0 et 4,7 tandis que YoeB (toxine) et YefM (antitoxine) ont un pI respectivement de 7,9 et de 5,1 (Tableau 7) [151]. De manière intéressante, toutes les antitoxines possèdent un pI acide, ce qui est le cas de la protéine SAL_2045.

Tableau 7. Caractéristiques de systèmes toxine-antitoxine par rapport aux protéines SAL_2044 et SAL_2045.

*L'identité protéique des systèmes toxine-antitoxine Txe-Axe et YoeB-YefM a été analysée par rapport aux protéines SAL_2044 et SAL_2045 codés par ICE*_515_tRNA^{Lys} *par BLASTP. Les tailles, poids moléculaires et pI ont été obtenus à l'aide de la base de données UniProt.*

	Protéine	Souche	Identité protéique	Taille (en acides aminés)	Poids moléculaires	pI
Toxine	SAL_2044	*S. agalactiae*	/	84 aa	10,4 kDa	6,3
	Txe	*E. faecium*, *B. thuringiensis*, *E. coli*	56%	85 aa	10,2 kDa	8,0
	YoeB	*E. coli*, *S. pneumoniae*	56%	84 aa	10,2 kDa	7,9
Antitoxine	SAL_2045	*S. agalactiae*	/	85 aa	10,3 kDa	4,9
	Axe	*E. faecium*, *B. thuringiensis*, *E. coli*	45%	89 aa	10,4 kDa	4,7
	YefM	*E. coli*, *S. pneumoniae*	29%	83 aa	9,3 kDa	5,1

Les systèmes Txe/Axe et YoeB/YefM (toxine/antitoxine) font partie des premiers systèmes de maintien d'éléments génétiques mobiles décrits chez les bactéries à coloration Gram positive et pourraient avoir un rôle dans la mort cellulaire programmée [182].

Le système d'addiction Txe/Axe est présent sur les plasmides non conjugatifs pRUM conférant à *Enterococcus faecium* des résistances à de nombreux antibiotiques [151, 162, 338]. Il permet le maintien de nombreux plasmides chez différentes souches dont *E. faecium*, *Bacillus thuringiensis* et *E. coli* [151].

Txe et YoeB exercent un effet toxique sur les cellules bactériennes en clivant les ARNm, inhibant ainsi la synthèse protéique [74, 162, 201]. Axe et YefM représentent les antidotes capables de se lier à leur toxine et de bloquer leur activité cytotoxique permettant ainsi la survie des cellules [151, 162, 201, 285]. YefM a un effet retro-transcriptionnel sur sa propre expression mais aussi sur celle de YoeB et les deux protéines interagissent [69, 206]. D'autre part, la dégradation de YefM par la protéase Lon active la toxine YoeB [74]. Une analyse bioinformatique révèle la présence de tels modules d'addiction dans les génomes de diverses espèces bactériennes à coloration Gram positive (*S. pneumoniae*, *S. aureus*) mais également à Gram négative (*Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicolor* et *Agrobacterium tumefaciens*) [151, 233, 299].

Ainsi, le système SAL_2044/SAL_2045 codé par ICE_*515_tRNA*^{Lys} chez *S. agalactiae* pourrait permettre le maintien post-ségrégationnel de l'ICE et paraît disséminé parmi les streptocoques.

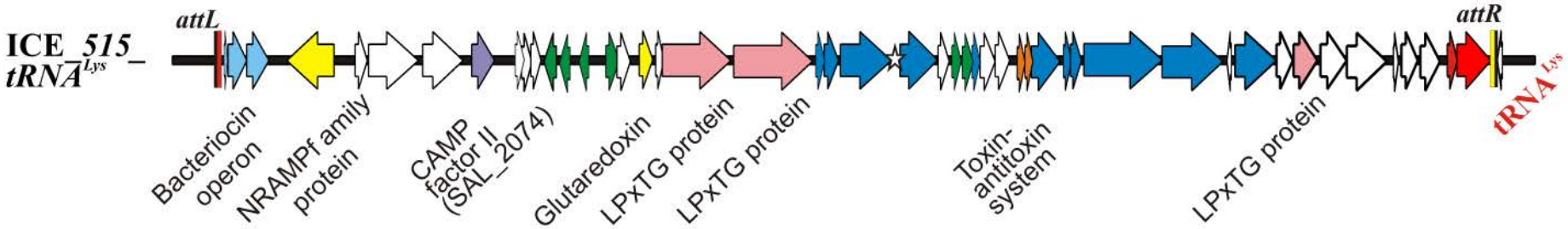


Figure 28. Représentation schématique de l'élément ICE_*515_tRNA*^{Lys} de *S. agalactiae.*

Les gènes sont représentés par des flèches dont la taille est proportionnelle à la taille des gènes. Les flèches vertes représentent les gènes composant le module de régulation ; celles en bleu, le module de conjugaison et celles en rouge, le module de recombinaison. L'intégrase est localisée dans le module de recombinaison et est le gène situé à proximité immédiate du gène codant l'ARNt Lysine (anticodon CTT). Les gènes représentés en bleu ciel appartiennent à un opéron bactériocine putatif, ceux en jaune codent des protéines pouvant être impliquées dans la réponse au stress oxydant, ceux en rose codent des protéines à motif LPxTG pouvant être exposées à la surface cellulaire bactérienne et ceux en orange représentent les deux gènes qui codent un système toxine antitoxine putatif. La flèche violette représente le gène codant le facteur CAMP II putatif. Les flèches blanches représentent des gènes dont la fonction est inconnue.

2. Réponse au stress oxydant

Des gènes codant des protéines pouvant être impliquées dans la réponse au stress oxydant ont été détectés par analyse informatique au sein d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} (Figure 28). Ainsi, une protéine de type NRAMP et une glutarédoxine pourraient être produites par l'élément mobile.

2.1. Protéine de type NRAMP

Une analyse de la séquence protéique codée par le gène SAL_2078 (numéro d'accession GenBank: ZP_00790022) présent sur ICE_*515_tRNA*^{Lys} indique son appartenance à la famille des protéines de type NRAMP. Cette famille de protéines est ubiquitaire chez les procaryotes mais également chez les eucaryotes. Elle permet le transport de métaux divalents (Fe^{2+} et Mn^{2+}).

SAL_2078 code une protéine de 522 aa possédant une masse prédite de 57,4 kDa et un pI de 8,9. SAL_2078 est présent chez les 5 souches de *S. agalactiae* possédant un ICE (515, COH1, 18RS21, 2603 V/R et FSL S3-026) mais est absent des autres souches de *S. agalactiae* séquencées possédant des éléments mobilisables (CIME ou IME) au locus de l'ARNt Lysine.

SAL_2078 présente une homologie avec une protéine codée par la souche *S. urinalis* 2285-97 (STRUR1999) et avec des transporteurs d'autres espèces bactériennes dont de très nombreuses bactéries à coloration Gram positive (*S. porcinus*, *S. pseudoporcinus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. lactis* subsp *lactis*, *S. macedonicus* et *S. infantarius*). Par ailleurs, la protéine de type NRAMP putative codée par ICE_*515_tRNA*^{Lys} présente également une homologie avec les protéines NRAMP de mammifères. Des alignements de séquences révèlent 35 % d'identité protéique avec une protéine NRAMP humaine (numéro d'accession GenBank : CAA57541), 34 % avec celle d'une souris (numéro d'accession GenBank : NP_038640) et 34 % avec celle d'un bovin (numéro d'accession GenBank : NP_777077).

Les protéines NRAMP ont été largement étudiées et elles jouent un rôle clé dans l'homéostasie du fer, du manganèse et d'autres métaux. Chez les eucaryotes, elles sont impliquées dans la défense contre certains pathogènes. Dans les macrophages, ces protéines permettent la séquestration de cations, co-facteurs essentiels de catalases et superoxydes dismutases des eucaryotes et procaryotes, pour les protéger contre leur propre production d'oxygène réactif mais également pour priver les bactéries pathogènes de ces métaux [207]. Les protéines NRAMP bactériennes et eucaryotes peuvent donc entrer en compétition pour le même substrat au sein du microenvironnement phagosomal [127]. Par ailleurs, il a été montré que l'expression d'un gène codant une protéine de la famille NRAMP chez des souches de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium et d'*E. coli* augmente lors d'une invasion de macrophages mais également que les mutants ont une capacité de survie plus élevée au sein des macrophages [207]. Ainsi, la protéine SAL_2078 pourrait contribuer à la survie de *S. agalactiae* et à sa virulence.

2.2. Glutarédoxine

Le gène SAL_2059 (numéro d'accession GenBank: ZP_00789101) présent sur ICE_*515_tRNA*^{Lys} code une protéine qui possède un motif CPYC de type SoxW ce qui suggère son appartenance à la famille des thiorédoxines et plus spécialement à la sous-famille des glutarédoxines. La glutarédoxine putative est composée de 153 aa, possède un poids moléculaire prédit de 17,6 kDa et un pI théorique de 9,6.

Le gène SAL_2059 est présent sur les ICE intégrés à l'extrémité 3' des souches 515, COH1 et FSL S3-026 de *S. agalactiae*. Les trois protéines sont identiques à 100 % chez ces souches.

Des homologues sont présents dans la classe des mammifères. En effet, SAL_2059 présente 30 % d'identité avec une glutarédoxine humaine (numéro d'accession GenBank : 2FLS_A), 26 % avec une thiorédoxine de souris (numéro d'accession GenBank : NP_082615) et 24 % avec une thiorédoxine bovine (numéro d'accession GenBank: Q95108). Des

comparaisons de séquences mettent en évidence une homologie avec un gène présent sur l'ICE RD2 de *S. pyogenes* (38 % d'identité) [371].

Ces protéines utilisent deux cystéines de leur site actif CXXC, pour réduire les protéines disulfurées formées durant le cycle catalytique de la ribonucléotide réductase, ce qui leur confère un rôle important lors de la réplication et de la réparation de l'ADN [20]. Les glutarédoxines sont connues pour être des régulateurs de la fonction cellulaire en cas de stress oxydant. De plus, il a été démontré l'implication d'une thiorédoxine dans la virulence de *Salmonella enterica* [26].

L'étude de ces deux fonctions susceptibles d'être impliquées dans la virulence des streptocoques pourrait également aider à la compréhension de la réponse adaptative de *S. agalactiae* au stress oxydant, stress rencontré au sein des macrophages.

3. Signalisation / compétition

L'analyse *in silico* a révélé, sur l'ICE de la souche *S. agalactiae* COH1, la présence d'un opéron putatif permettant la synthèse et l'export d'un peptide qui pourrait posséder des propriétés antimicrobiennes ou de signalisation (52 aa, 6,1 kDa et pI de 10,0) (Figure 28). En effet, une homologie a été mise en évidence entre cet opéron et celui d'un opéron, nommé *yydFGHIJ,* chez *Bacillus subtilis* qui permet la synthèse, la maturation et l'exportation d'un peptide qui pourrait avoir des propriétés antimicrobiennes et/ou de signalisation (Figure 28) [58].

ICE_*515_tRNA*^{Lys} porte les gènes codant le peptide et les deux sous-unités du transporteur mais pas ceux codant les deux protéines de modifications post-traductionnelles (Figure 29, gènes SAL_2079 à SAL_2081). De même, les ICE des souches 2603 V/R et 18RS21 possèdent uniquement ces trois gènes. L'opéron est complet uniquement chez la souche *S. agalactiae* COH1 (Figure 29, gènes SAN_2145 à SAN_2149). De manière intéressante, les

gènes de cet opéron sur ICE_*COH1_tRNA*^{Lys} ne ne sont pas ordonnés comme ceux de l'opéron de *B. subtilis*. Pour ces raisons, les expériences de caractérisation fonctionnelle du peptide ont été effectuées à partir de la souche COH1 de *S. agalactiae*.

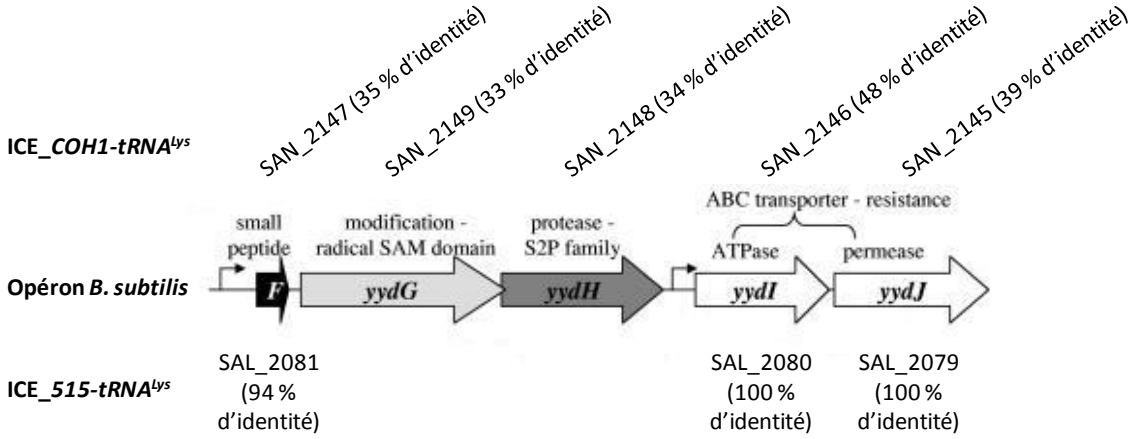


Figure 29. Représentation de l'opéron *yyFGHIJ* de *B. subtilis* et pourcentages d'identité de séquence avec l'opéron présent chez *S. agalactiae* (tiré de [58]).

Les pourcentages d'identité de séquences ont été déterminés par BLASTP et sont indiqués en pourcentage entre l'opéron de B. subtilis *et ICE*_COH1_tRNA^{Lys} *mais également entre les éléments intégratifs conjugatifs ICE*_COH1_tRNA^{Lys} *et ICE*_515_tRNA^{Lys}.

Une recherche par BLASTP a permis de mettre en évidence la présence de gènes identiques aux gènes SAN_2145 à SAN_2149 chez la souche 2285-97 *S. urinalis* (gènes STRUR_2000 à STRUR_2004). Des homologues du peptide existent aussi chez d'autres espèces bactériennes dont *Staphylococcus epidermidis* (46 % d'identité), *S. pseudintermedius* (48 %), *E. faecalis* (39 %), *Campylobacter jejuni* (41 %) et *C. coli* (41 %).

Une analyse de la séquence du produit du gène homologue à *yydF* chez la souche *S. agalactiae* COH1 prédit que le peptide est composé de 14 résidus hydrophobes (sur 52 acides aminés au total). Le logiciel de prédiction des peptides antimicrobiens APD2 (http://aps.unmc.edu/AP/main.php) prédit que le peptide SAN_2147 serait capable de former des hélices alpha intramembranaires, d'interagir avec des membranes et qu'il y a une probabilité que celui-ci soit un peptide antimicrobien [423]. Chez *B. subtilis*, le gène *yydF*

code le précurseur putatif du peptide antimicrobien et/ou de signalisation qui serait exporté. Une oxydoréductase à radical SAM, codée par le gène *yydG*, et une protéase intramembranaire de la famille S2P, codée par le gène *yydH*, seraient impliquées dans les modifications post-traductionnelles du peptide aboutissant à son activation. Les protéines codées par les gènes *yydI* et *yydJ* formeraient les deux sous-unités d'un transporteur de type ABC qui pourrait à la fois assurer une fonction de transporteur du peptide et de protéine d'immunité pour la bactérie productrice [58].

L'ensemble de ces données laisse supposer que l'opéron présent chez la souche COH1 de *S. agalactiae* pourrait permettre la production d'un peptide mature possédant des propriétés antimicrobiennes ou de signalisation.

4. Protéines de surface codées par ICE *515 tRNA^{Lys}*

4.1. Identification des protéines de surface in silico

L'analyse *in silico* d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* a dévoilé la présence de deux gènes, SAL_2056 et SAL_2057, qui sont adjacents et codent deux protéines possédant un motif LPxTG, motif conservé des protéines de surface (Figure 28). Ce motif est généralement reconnu par une sortase, souvent la sortase de classe A chez *S. agalactiae*, qui permet l'incorporation de la protéine dans le peptidoglycane chez les bactéries à coloration Gram positive [259]. Une séquence signal de type YSIRK en région N-terminale permet l'export initial du précurseur de la protéine de surface vers le système de sécrétion Sec [259]. La protéine codée par SAL_2056 possède ce signal tandis que celle codée par SAL_2057 en est dépourvue. SAL_2056 code une protéine de 863 aa et SAL_2057 code une protéine de 753 aa dont les poids moléculaires prédits sont respectivement de 94,2 et 81,7 kDa et les pI théoriques basiques de 9,0 et 9,4 (Tableau 8).

Par ailleurs, un autre gène codant une protéine plus petite qui possède un motif LPxTG a également été mis en évidence lors de l'analyse informatique (Figure 28). SAL_2036

code une protéine de 259 acides aminés. La protéine SAL_2036 a un pI acide (4,5) et une masse de 26,4 kDa (Tableau 8).

4.2. Prévalence et fonctions de ces protéines chez les streptocoques

Le gène SAL_2057 est également présent chez les souches COH1 et FSL S3-026 de *S. agalactiae* mais pas chez les autres souches séquencées. Les gènes SAL_2056 et SAL_2036 sont présents chez deux souches supplémentaires : les souches 18RS21 et 2603 V/R de *S. agalactiae*. Aucun des gènes n'est présent chez les souches possédant des éléments mobilisables tels qu'un IME (A909) ou un CIME (souches H36B et NEM316).

Trois gènes (STRUR_1980, STRUR_1981 et STRUR_1960) présents chez la souche *S. urinalis* 2285-97, possèdent respectivement 63 %, 97 % et 91 % d'identité de séquences avec les gènes SAL_2056, SAL_2057 et SAL_2036. Les gènes STRUR_1980, STRUR_1981 et STRUR_1960 codent des protéines de respectivement 868, 753 et 275 acides aminés, dont les poids moléculaires sont de 94,5, 81,7 et 28 kDa et les pI de 8,39, 9,38 et 4,31. De manière similaire aux protéines d'ICE_*515_tRNA*^{Lys}, STRUR_1980 possède un motif LPxTG et une séquence de type YSIRK tandis que les deux autres protéines chez *S. urinalis* possèdent uniquement le motif LPxTG. Toutes ces données indiquent que les protéines présentes chez *S. urinalis* sont des protéines très proches de celles d'ICE_*515_tRNA*^{Lys}.

Par ailleurs, l'analyse informatique révèle 68% et 29% d'identité protéique entre la protéine codée par le gène SAL_2056 et les protéines codées par les gènes *spy1325* porté par ICE RD2 de *S. pyogenes* MGAS6180 [152, 448] et *prgB* codé par le plasmide pCF10 d'*Enterococcus faecalis* V583 (Tableau 8) [430]. Le gène *spy1325* a une taille de 1352 pb et code un antigène de type I/II ayant un poids de 148,4 kDa et un pI acide (5,4) tandis que *prgB* a une taille de 1305 pb et code une substance d'agrégation de 142,4 kDa et ayant un pI acide (5,9) (Tableau 8).

La protéine Spy1325, également nommée AspA, est impliquée dans la formation de biofilm de *S. pyogenes* et l'adhésion à des protéines humaines. L'injection de la protéine Spy1325 à des souris leur confère une immunité [448]. Le gène *prgB* code une substance d'agrégation qui permet le contact des bactéries et est impliquée dans le mécanisme de conjugaison du plasmide pCF10. Le produit du gène *prgB* est également un facteur de virulence puisqu'il est impliqué dans l'adhésion et l'internalisation d'*E. faecalis* dans des phagocytes, des cellules rénales et épithéliales [430].

Tableau 8. Caractéristiques d'homologues des protéines de surface codées par ICE_*515_tRNA*^{Lys}.

*Comparaison des protéines de surface codées par des éléments génétiques mobiles par rapport aux protéines SAL_2056, SAL_2057 et SAL_2036 codées par ICE*_515_tRNA^{Lys}.

Protéine	Espèce bactérienne	Localisation	Identité protéique	Taille (en acides aminés)	Poids moléculaire	pI
SAL_2056	*S. agalactiae* 515	ICE_*515_tRNA* ^{Lys}	/	863 aa	94,2 kDa	9,0
Spy1325	*S. pyogenes* MGAS6180	ICE RD2	68%	1352 aa	148,4 kDa	5,4
PrgB	*E. faecalis* V583	Plasmide pCF10	29%	1305 aa	142,4 kDa	5,9
GBS0393	*S. agalactiae* NEM316	ICE Tn*GBS1*	83%	933 aa	101,6 kDa	9,1
GBS1143	*S. agalactiae* NEM316	ICE Tn*GBS2*	81%	932 aa	101,7 kDa	9,1
SAL_2057	*S. agalactiae* 515	ICE_*515_tRNA* ^{Lys}	/	753 aa	81,7 kDa	9,4
Spy1326	*S. pyogenes* MGAS6180	ICE RD2	42%	746 aa	80,5 kDa	5,4
GBS0391	*S. agalactiae* NEM316	ICE Tn*GBS1*	44%	753 aa	81,2 kDa	5,8
GBS1145	*S. agalactiae* NEM316	ICE Tn*GBS2*	78%	743 aa	80,4 kDa	9,6
SAL_2036	*S. agalactiae* 515	ICE_*515_tRNA* ^{Lys}	/	259 aa	26,4 kDa	4,5
Spy1306	*S. pyogenes* MGAS6180	ICE RD2	39%	253 aa	27,0 kDa	5,2
PrgC	*E. faecalis* V583	Plasmide pCF10	31%	285 aa	30,1 kDa	4,5
GBS0392	*S. agalactiae* NEM316	ICE Tn*GBS1*	27%	240 aa	25,4 kDa	4,8
GBS1144	*S. agalactiae* NEM316	ICE Tn*GBS2*	33%	236 aa	24,5 kDa	5,1

Des homologues de SAL_2057 (identité supérieure à 30 %) sont trouvés chez de nombreuses espèces d'autres streptocoques dont *S. pyogenes*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, *S. ictaluri* et *S. gallolyticus.* De plus, l'analyse informatique révèle 42 % d'identité protéique entre SAL_2057 et le produit du gène *spy1326* codé par ICE RD2 présent chez la souche *S. pyogenes* MGAS6180 (Tableau 8). De façon analogue aux gènes SAL_2056 et SAL_2057, les

gènes *spy1325* et *spy1326* sont adjacents et portés par ICE RD2 [371]. Chez les ICE Tn*GBS1* et Tn*GBS2* de *S. agalactiae* NEM316, des homologues de SAL_2056 (respectivement GBS0393 et GBS1143) et SAL_2057 (respectivement GBS0391 et GBS1145) sont également présents mais un gène conservé de fonction inconnue les sépare (Tableau 8). Ce troisième gène (GBS0392 sur Tn*GBS1* et GBS1144 sur Tn*GBS2*) code une protéine possédant un motif LPxTG qui présente une homologie (environ 30 % d'identité) avec la protéine SAL_2036 d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} (Tableau 8).

D'autre part, SAL_2036 possède également des homologues chez de nombreux streptocoques, entérocoques et staphylocoques. De manière intéressante, la protéine Spy1306 est homologue au produit du gène SAL_2036 (39 % d'identité protéique) et codée par ICE RD2 de la souche *S. pyogenes* M6180 également (Tableau 8). Enfin, le produit du gène SAL_2036 et la protéine PrgC codée par le plasmide pCF10 d'*E. faecalis* présentent 31 % d'identité protéique (Tableau 8). Des travaux ont suggéré que PrgC pouvait être impliqué dans la mécanistique de transfert de pCF10 au niveau du pore de conjugaison mais sa fonction exacte reste encore inconnue [110, 292].

L'ensemble de ces données indique que des protéines similaires à SAL_2056, SAL_2057 et SAL_2036 sont répandues parmi les streptocoques pathogènes. Ces homologues sont fréquemment retrouvés sur des éléments génétiques mobiles ce qui suggère que les protéines pourraient, en plus d'être impliquées dans l'étape d'adhésion à l'hôte, jouer un rôle dans le transfert conjugatif de l'ICE.

*4.3. Domaines fonctionnels des protéines de surface codées par ICE*_515_tRNA^{Lys}.

SAL_2056 possède, en plus des domaines permettant sa sécrétion et son ancrage au sein de la paroi bactérienne, une région variable et une région C-terminale riche en proline (Figure 30). SAL_2056 possède également, de manière similaire à des régions de TolA, une région très riche en alanine et en lysine. TolA appartient au système protéique Tol-Pal qui est

composé de 5 protéines (TolA, TolB, TolQ, TolR et Pal) [237]. Chez les bactéries à coloration Gram négative, ce système est décrit comme étant impliqué dans le transport d'ADN, le maintien de l'intégrité cellulaire, le transfert d'énergie à travers la membrane cytoplasmique, la formation d'un complexe aux sites de constriction afin de promouvoir l'étape énergétique de la division cellulaire, l'interaction protéine-protéine et la pathogénicité des souches [64, 93, 95, 108, 128, 143, 237, 444]. En particulier, TolA est nécessaire à la translocation d'ADN des bactériophages filamenteux dans le cytoplasme bactérien [204, 431]. De manière intéressante, la délétion du gène *tolA* chez une souche de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium entraîne une diminution de sa survie dans de la bile bovine ou du sérum humain [304]. Par ailleurs, le mutant est atténué dans un modèle d'infections de souris [304].

De plus, SAL_2056 possède un domaine C-terminal similaire à celui de l'antigène de type I/II SspB de *S. gordonii* qui pourrait inclure un pont isopeptide entre un résidu lysine et un résidu asparagine [129]. Ce type de liaison pourrait permettre la stabilité de la protéine de surface et l'adhésion à différents types de substrats.

Deux séquences répétées parfaites de 24 acides aminés NKDAQAKADATNAQLQKDYQAKLA et une séquence répétée imparfaite de 12 acides aminés AKAQANTQAIKD sont localisées dans la région riche en alanine et en lysine (Figure 30). Des études ont montré que les séquences répétées, mais également l'alternance des charges au sein de ces répétitions, pouvaient permettre l'adhésion des protéines de surface à des composants de l'hôte et notamment à la fibronectine [84, 392]. Les répétitions de la protéine SAL_2056 pourraient alors contribuer à l'adhésion à des composants de l'hôte.

Par ailleurs, la protéine SAL_2056 possède un motif conservé LDV incluant les résidus 610 à 612 (Leucine, Acide aspartique et Valine). Le motif LDV permet la liaison des protéines le possédant aux intégrines $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_4\beta_7$ [255, 448]. Les intégrines sont des récepteurs protéiques transmembranaires eucaryotes qui interagissent avec des constituants du milieu extracellulaire, telle la matrice extracellulaire. Les intégrines $\alpha_4\beta_1$ interagissent avec les cellules notamment par l'intermédiaire du motif LDV de la fibronectine [212]. Les motifs d'adhésion aux intégrines, comme le motif LDV, permet aux agents pathogènes d'adhérer et

d'envahir les cellules de l'hôte [62, 63]. Ce motif chez la protéine SAL_2056 pourrait donc permettre l'adhésion aux cellules eucaryotes.

```
        10         20         30         40         50         60
MYKNQNTKGH GFFRKSKAYG LVCGIALAGA FTLATSQVSA DQVTTQATTQ TVTQNQAETV
        70         80         90        100        110        120
TSTQLDKAVA TAKKAAVAVT TTAAVNHATT TDAQADLANQ TQTVKDVTAK AQANTQAIKD
       130        140        150        160        170        180
ATAENAKIDA ENKAESQRVS QLNAQTKAKI DAENKDAQAK ADATNAQLQK DYQAKLAKIK
       190        200        210        220        230        240
SVEAYNAGVR QRNKDAQAKA DATNAQLQKD YQAKLALYNQ ALKAKAEADK QSINNVAFDI
       250        260        270        280        290        300
KAQAKGVDNA EYGNSIMTAK TKPDGSFEFN HDMIDGVKTI GYGKLTGKVN HHYVANKDGS
       310        320        330        340        350        360
VTAFVDSITL YKYEYRNVAQ NAAVNQNIAF RVLTKDGQII FEKKHNGNKT FAETLNKTLQ
       370        380        390        400        410        420
LNLKYELKPH GSSGSVEVFK IHDDWVHDTH GSALVSYVNN NDVVPNVVIP KQPTPPSTEK
       430        440        450        460        470        480
VTPEAEKPVP EKPVEPKFVT PTLKTYTPAQ PKVKPHVSIP EKINYSVSVH PVLVPAANPS
       490        500        510        520        530        540
KAVIDEAGQS VNGKTVLPNA ELNYVAKQDF SQYKGMTASQ GKIAKNFVFI DDYKDDALDG
       550        560        570        580        590        600
KSMKVNSIKA SDGTDVSQLL EMRHVLSTDT LDEKLQTLIK EAGISPVGEF YMWTAKDPQA
       610        620        630        640        650        660
FYKAYVQKGL DVTYNLSFKV KKEFTKGQIQ NGVAQIDFGN GYTGNIVVND LTTPEIHKDV
       670        680        690        700        710        720
LDKEDGKSIN NGTVKLGDEV TYKLEGWVVP TGRSYDLFEY KFVDQLQRTH DLYLRDKVVA
       730        740        750        760        770        780
KVDVTLKDGT VIKKGTNLGE YTETVYNKKT GLYELVFKKD FLEKVARSSE FGADDFVVVK
       790        800        810        820        830        840
RIKAGDVYNT ADFFINGNKV KTETVVTHTP EKPKPVEPQK ATPKAPAKGL PQTGEASVAP
       850        860
LTALGAIILS AIGLAGFKKR KEN
```

Figure 30. Séquence de la protéine SAL_2056 et schématisation des domaines fonctionnels importants.

La protéine SAL_2056 est composée de plusieurs régions. Une première région N-terminale (en vert) correspond au peptide signal qui permet de diriger la protéine vers le système de sécrétion. Une région, en rouge, est riche en résidus alanine et lysine et contient deux séquences répétées de 24 acides aminés et une troisième répétition imparfaite de 12 acides aminés (en gras et souligné). Une région riche en résidus proline est représentée en violet. Dans la partie C-terminale de la protéine, un motif LPxTG est représenté en orange.

L'analyse structurale de la protéine SAL_2056 suggère que celle-ci appartient à la famille des antigènes I/II et qu'elle pourrait être impliquée dans la virulence des souches en participant à l'adhésion aux composants de l'hôte.

La protéine codée par le gène SAL_2057 possède un domaine peptidase C39A (CDsearch, Conserved Domains search). L'activité catalytique du domaine peptidase serait reliée à trois résidus conservés. La protéine SAL_2057 possède ces résidus conservés : une cystéine (résidu 285), une histidine (résidu 378) et un acide aspartique (résidu 394) (Figure 31). Ce domaine peut être impliqué dans la transformation et le transport de bactériocines et de phéromones (incluant les peptides de compétence) et pourrait également être impliquée dans le phénomène d'exclusion de surface qui module l'entrée d'ADN par conjugaison [282].

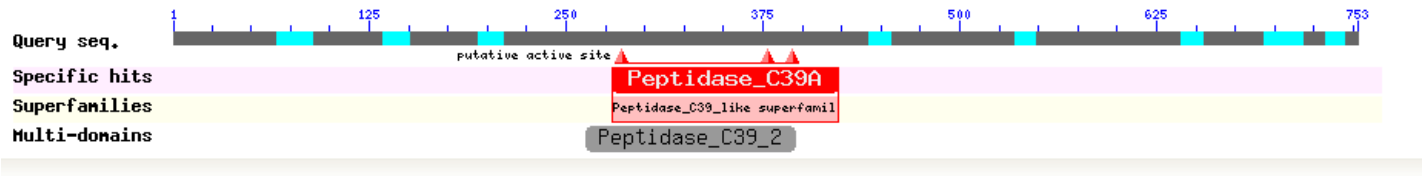


Figure 31. Domaines conservés de la protéine SAL_2057.

Les domaines conservés de la protéine SAL_2057 ont été analysés via le programme Conserved Domain search (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml). Les flèches rouges indiquent les résidus conservés du domaine peptidase C39A.

5. Propriétés hémolytiques

L'analyse informatique des gènes pouvant conférer un avantage sélectif à *S. agalactiae* a révélé la présence d'un gène, SAL_2074, qui code un nouveau facteur CAMP putatif, nommé facteur CAMP II (Figure 28). Le facteur CAMP II est une protéine de 252 aa, de 27,7 kDa et a un pI de 7,8. Le facteur CAMP II est également présent sur les ICE intégrés à l'extrémité 3' du gène codant l'ARNt Lysine des souches COH1 et FSL S3-026 de *S. agalactiae*.

Le facteur CAMP génomique ubiquiste, initialement décrit chez *S. agalactiae*, est codé par le gène SAL_2095 chez la souche 515 (numéro d'accession GenBank : ZP_00790029) et GBS2000 chez la souche NEM316 (numéro d'accession GenBank : NP_736433). Le facteur CAMP est codé par les souches séquencées 2603 V/R (SAG2043), A909 (SAK_1983), H36B (SAI_2082), FSL S3-026 (FSLSAGS3026_11665), CJB111 (SAM_1952), COH1 (SAN_2173) et 18RS21 (SAJ_1945). L'ensemble de ces gènes codent des protéines quasiment identiques (> à 99% d'identité protéique). Ce premier facteur CAMP décrit chez *S. agalactiae* est composé de 255 aa, a une masse prédite de 28,3 kDa et un pI théorique de 7,9. Une analyse protéique par BLASTP révèle 73% d'identité entre les facteurs CAMP génomiques et le facteur CAMP II codé par ICE_*515_tRNA*^{Lys} et ICE_*COHI_tRNA*^{Lys}. Le facteur CAMP génomique et le facteur CAMP II sont donc des protéines apparentées.

D'autre part, le gène STRUR_1995 de la souche 2285-97 de *S. urinalis* code également une protéine identique au facteur CAMP II et présentant 72 % d'identité avec le facteur CAMP génomique bien qu'il ait été montré que cette souche ne présente pas de réaction CAMP positive [79]. De plus, le facteur Uberis (numéro d'accession GenBank : AAA78910.1) présente respectivement 63% et 59% d'identité protéique par rapport aux gènes SAL_2095 (facteur CAMP) et SAL_2074 (facteur CAMP II) (figure 32). Le facteur CAMP de *S. pyogenes* présente respectivement 58 % et 60 % d'identité et le facteur CAMP fonctionnel de *P. acnes* 33 % et 34 % d'identité avec le facteur CAMP II et le facteur CAMP génomique de *S. agalactiae* (Figure 32).

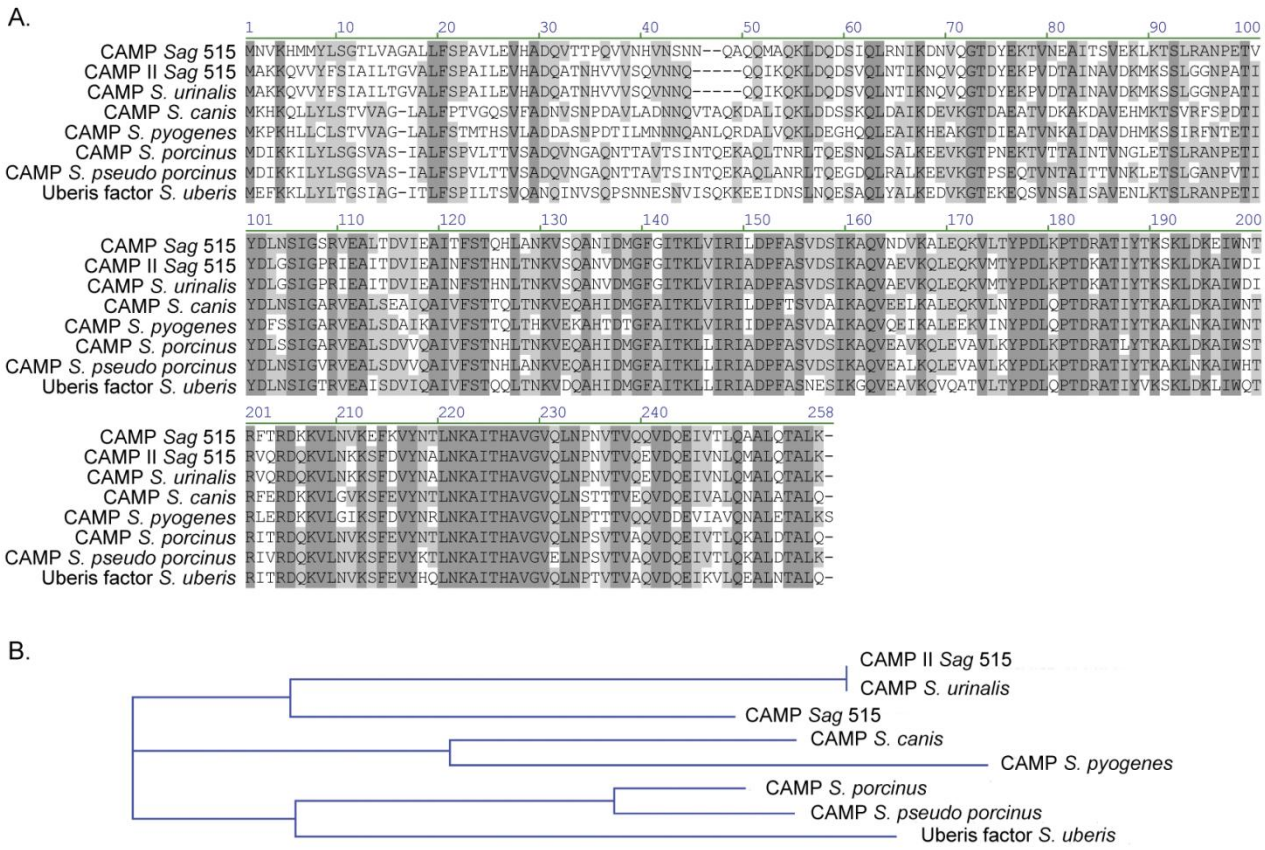


Figure 32. Comparaison des facteurs de streptocoques avec le facteur CAMP II de *S. agalactiae*.

A. Alignement multiple de séquences (Sag, S. agalactiae *;* S. urinalis *;* S. canis *;* S. pyogenes *;* S. porcinus *;* S. pseudo porcinus *et* S. uberis*) ; B. Arbre phylogénétique révélant les relations évolutives entre les alignements de séquences.*

Les alignements de séquences et la construction de l'arbre phylognétique ont été réalisés à l'aide du module AlignX de Vector NTI advance 11 (In Vitrogen). Les résidus conservés apparaissent en gris clair et les acides aminés identiques chez toutes les espèces apparaissent en gris foncé. La position des résidus des séquences est indiquée au dessus des séquences. Le facteur CAMP de P. acnes *est le plus éloigné et n'apparait donc pas sur l'alignement. L'arbre phylogénétique a été construit selon la méthode du plus proche voisin. Chaque branche de l'arbre a une longueur équivalente au nombre de substitutions nécessaires pour passer d'un nœud au suivant.*

II. Analyse de l'expression des gènes d'intérêt

1. Analyse des régions promotrices

Afin de détecter les régions promotrices présentes sur l'ICE, les séquences correspondant à la boite -35 (TTGACA) et à la boite -10 (ou boite de Pribnow, TATAAT) [421], qui sont séparées d'environ 17 pb et permettent la reconnaissance par l'ARN polymérase, ont été recherchées. Les séquences Shine-Dalgarno (ou site de fixation du ribosome ou RBS pour ribosome binding site), permettant l'initiation de la traduction protéique, ont également été recherchées. Le motif Shine-Dalgarno complet chez les procaryotes est long de 3 à 9 nucléotides et est situé de 6 à 12 nucléotides en amont du codon d'initiation ATG. La séquence complète est AAAGGAGG. Elle est, le plus souvent, retrouvée sous forme partielle.

Plusieurs promoteurs putatifs présents sur ICE_*515_tRNA*^{Lys} et permettant de contrôler l'expression des gènes d'intérêt chez la souche 515 ont été mis en évidence par une recherche bioinformatique (Figure 33).

Aucun promoteur n'a été détecté en amont de l'opéron « bactériocine » incomplet chez la souche *S. agalactiae* 515. Néanmoins, l'opéron complet présent chez la souche *S. agalactiae* COH1 possède un promoteur putatif en amont du gène SAN_2149 composé d'une boite -35 (TTGAAA) séparée de 17 pb d'une boite -10 (TATAAT). Chez cette souche, tous les gènes de l'opéron (SAN_2145 à SAN_2149) possèdent un site de fixation ribosomique.

Chez la souche *S. agalactiae* 515, un premier promoteur putatif imparfait (P1) permettrait la transcription du gène SAL_2078 codant la protéine de type NRAMP (Figure 33). En effet, sur cette région se trouve une séquence TTGTAC qui pourrait correspondre à la boite – 35 et une séquence TAATAT situé 16 pb en aval de la boite - 35, représentant une boite de Pribnow putative. Une séquence Shine-Dalgarno (GGAAAGG) est localisée 10 nucléotides en amont du codon d'initiation de la traduction.

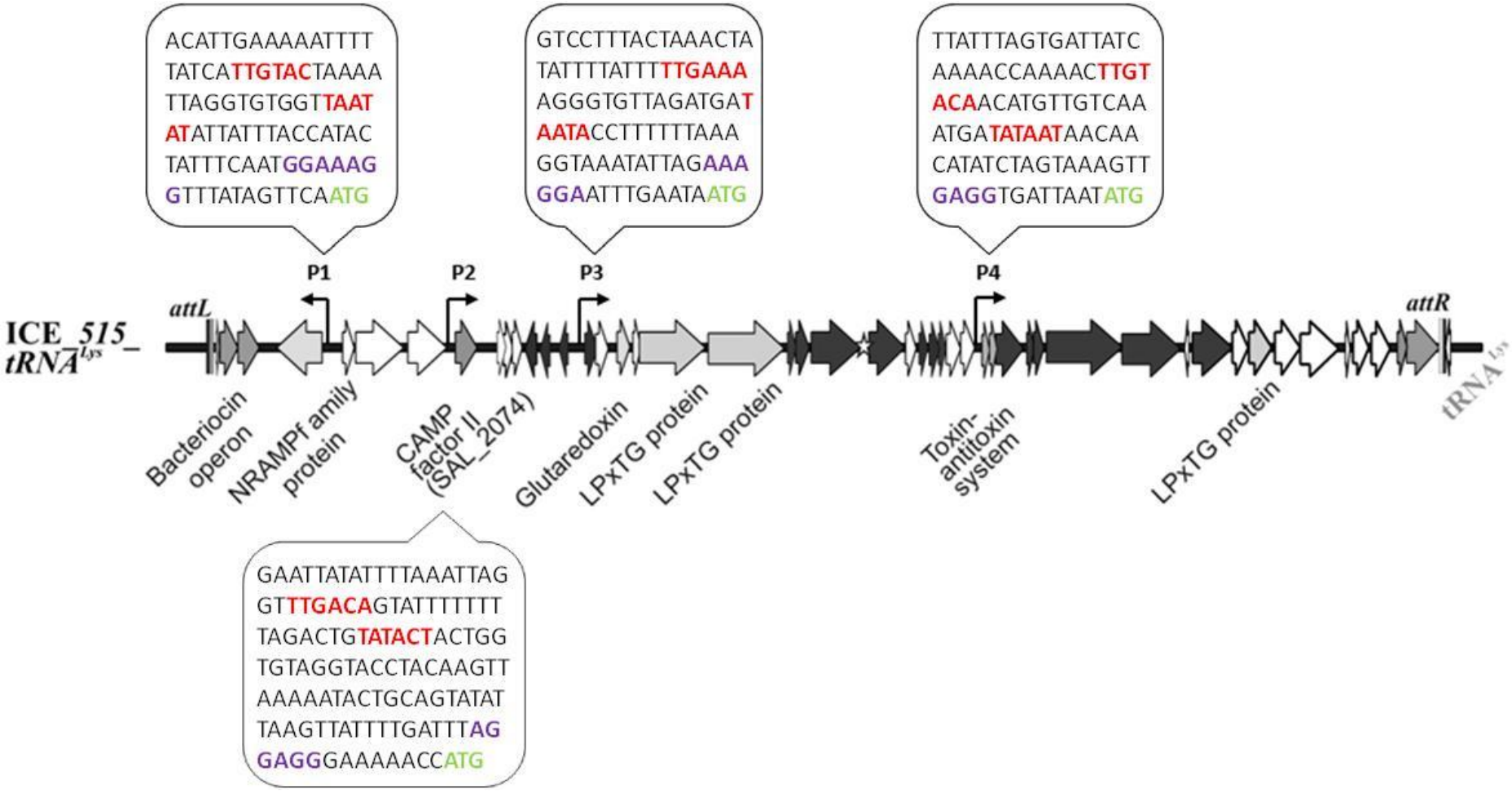


Figure 33. Promoteurs putatifs des gènes d'intérêt situés sur ICE_*515_tRNA^{Lys}*.

*Les promoteurs d'ICE*_515_tRNA^{Lys} *sont représentés par des flèches noires sur le schéma. Les boites -35 et -10 des promoteurs P1 à P4 d'ICE*_515_tRNA^{Lys} *apparaissent en rouge sur la figure, les sites de fixation ribosomiques en violet et les codons d'inititation en vert.*

L'analyse de la région en amont du gène SAL_2074 (facteur CAMP II) indique la présence d'une boite de Pribnow imparfaite (TATACT) localisée 17 pb en aval d'une boite – 35 (TTGACA) (Figure 33, promoteur P2). Un site de fixation ribosomique (AGGAGG) est situé 8 pb en amont du codon d'initiation de SAL_2074. Cette région pourrait permettre la transcription et la traduction du gène SAL_2074.

Un promoteur putatif P3 serait également présent en amont du gène SAL_2061 (séquences TTGAAA et TAATA) (Figure 33). Ce promoteur pourrait permettre de co-réguler l'expression de plusieurs gènes dont SAL_2059, SAL_2057 et SAL_2056, gènes codant la glutarédoxine putative et les deux protéines de surface. En effet, aucune région – 35 et – 10 n'a pu être détectée à proximité des codons d'initiation de ces trois gènes. Des séquences Shine-Dalgarno ont été détectées sur les régions en amont des trois gènes d'intérêt : des séquences GGAAG situées 11 pb en amont de l'ATG des gènes SAL_2059 et SAL_2057 et un motif AGAAAGGAA localisé 8 pb en amont du codon d'initiation du gène SAL_2056.

Un promoteur P4, localisé en amont du gène SAL_2045, pourrait réguler l'expression des gènes codant la toxine et l'antitoxine ainsi que des gènes du module de conjugaison de l'ICE (Figure 33). En effet, des boites – 35 et – 10 ont été identifiées (TTGTACA et TATAAT) et des sites de fixation ribosomiques sont localisés respectivement 6 et 8 nucléotides en amont des codons d'initiation des gènes SAL_2044 (AGG) et SAL_2045 (GAGG).

2. Analyse de la fonctionnalité des promoteurs

Afin de vérifier la fonctionnalité des promoteurs détectés, l'expression des gènes d'intérêt d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} et d'ICE_*COH1_tRNA*^{Lys} a été analysée *in vitro*. L'expression des gènes a été analysée par RT-PCR en phase exponentielle de croissance et en phase stationnaire. Tous les gènes d'intérêt d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} sont exprimés en phase exponentielle de croissance (Figure 34, pistes 1). Les gènes SAN_2147 (peptide), SAL_2074 (facteur CAMP II) et SAL_2044 (toxine) sont également exprimés en phase stationnaire (Figure 34, A, C et E, pistes 2). Dans les conditions expérimentales utilisées, aucun transcrit

du gène SAL_2059 (glutarédoxine) n'a pu être détecté en phase stationnaire (Figure 34, B, piste 2). En utilisant trois réplicats biologiques, un transcrit n'a été obtenu en phase stationnaire de croissance que pour un seul des trois réplicats biologiques pour SAL_2078 (protéine de la famille NRAMP) (Figure 34, D, pistes 2). Le même résultat a été obtenu lors de deux autres expériences indépendantes.

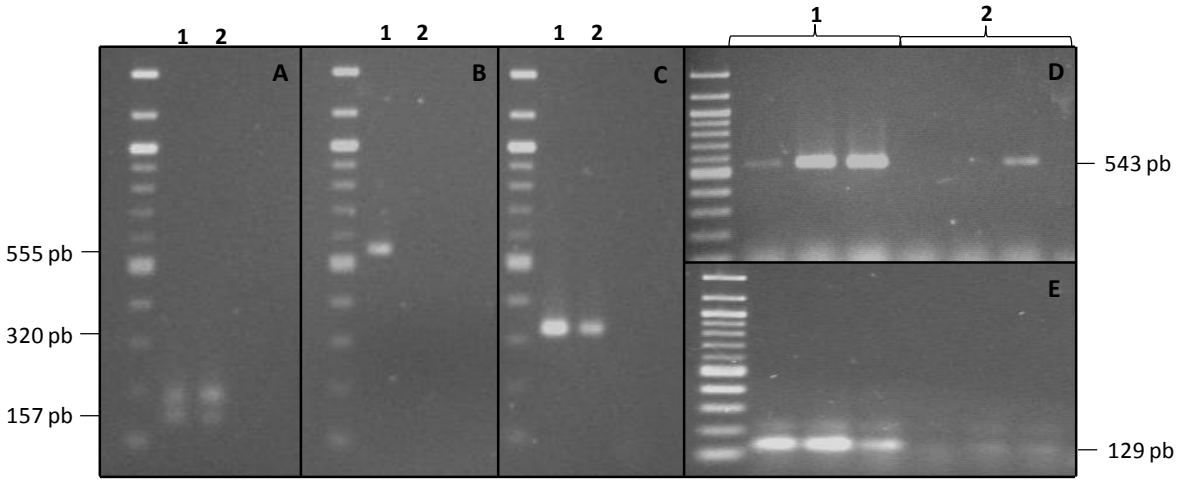


Figure 34. Analyse de l'expression des gènes d'intérêt d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* par RT-PCR.

Des RT-PCR ont été réalisées à partir des ARN extraits des cultures de souchess de S. agalactiae *COH1 (A) et 515 (B, C, D et E). Les gènes analysés sont : (A), SAN_2147 ; (B), SAL_2059 ; (C), SAL_2074 ; (D), SAL_2078 et (E), SAL_2044. Les expériences ont été réalisées en triplicat. Pour les expressions pour lesquelles tous les réplicats sont concordants (A à C), seul le résultat de l'une des trois expériences est présentée. Piste 1 : Phase exponentielle de croissance, Piste 2 : Phase stationnaire.*

Même si les résultats de RT-PCR ne constituent qu'une analyse semi-quantitative, il est à noter que, pour chacune des expériences indépendantes, une même intensité des bandes a été obtenue pour chacun des réplicats des gènes (sauf SAL_2078). L'expression du gène SAL_2044 paraît plus modeste en phase stationnaire qu'en phase exponentielle de croissance. De façon inverse, l'expression du gène SAN_2147 paraît plus élevée en phase stationnaire qu'en phase exponentielle de croissance. Par conséquent, il pourrait exister une corrélation entre la phase stationnaire de croissance et la quantité de transcrits de certains gènes codés par l'ICE.

III. Fonctions impliquées dans l'adaptation des souches

1. Adaptation face à un stress oxydant

Les gènes SAL_2078 et SAL_2059, codés par l'ICE et s'exprimant en conditions standards de culture, pourraient être impliqués dans la réponse à un stress oxydant. Afin de vérifier cette hypothèse, des tests de stress oxydant ont été réalisés. Plusieurs essais de constructions des deux mutants interrompus dans ces gènes ont été infructueux. Les vecteurs contenant les constructions permettant d'interrompre les gènes ont été obtenus et électroporées avec succès chez *S. agalactiae*. Cependant, malgré plusieurs tentatives, la sélection du deuxième évènement de recombinaison, permettant le remplacement du gène et l'élimination du plasmide, n'a pas pu aboutir. Ceci pourrait s'expliquer par la présence d'une forme extrachromosomique d'ICE_*515_tRNA*^{Lys}, comme décrit chez d'autres ICE [61, 230, 371], qui favoriserait un retour au phénotype sauvage. Le rôle des deux gènes dans la résistance au stress oxydant a donc été analysé en comparant une souche sans ICE (souche receveuse NEM316) et une souche portant l'ICE (transconjugant de la souche NEM316 ayant reçu ICE_*515_tRNA*^{Lys} par conjugaison). L'expression des gènes présents sur l'ICE a été analysée par RT-PCR chez la souche NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) et les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus pour la souche *S. agalactiae* 515.

Le taux de survie des deux souches a été examiné suite à un traitement oxydant réalisé avec 20 mM de peroxyde d'hydrogène pendant 45 minutes (Figure 35).

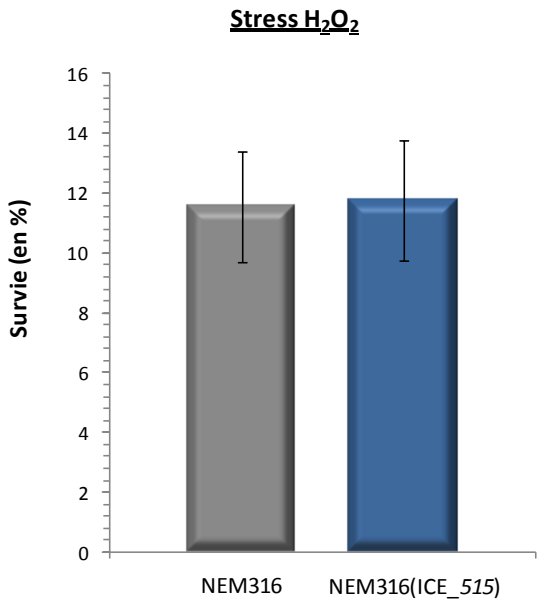


Figure 35. Taux de survie face à un stress oxydant d'une souche de *S. agalactiae* ayant acquis ICE_*515_tRNA*^{Lys}.

Le taux de survie des souches de S. agalactiae *NEM316 et du transconjugant NEM316 (ICE*_515_tRNA^{Lys}*) a été analysé suite à une exposition à 20 mM de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) durant 45 minutes à 37 °C. Le taux de survie est calculé en fonction de la quantité de cellules viables après un traitement en comparaison aux cellules non exposées par le biais d'un comptage des unités formant des colonies après 24 h d'incubation à 37 °C. L'expérience a été réalisée en triplicat et le taux de survie est exprimé en pourcentage.*

Les résultats indiquent que l'acquisition de l'ICE par une autre souche de *S. agalactiae* ne lui apporte pas de bénéfice en termes de survie face à un stress oxydant généré par du peroxyde d'hydrogène (Figure 35).

2. Bactériocine

L'analyse *in silico* de l'ICE intégré à l'extrémité 3' du gène codant un ARNt Lysine chez la souche *S. agalactiae* COH1, a révélé la présence d'un opéron complet qui pourrait avoir un rôle dans la compétition au sein de son microenvironnement. En effet, celui-ci pourrait coder un peptide aux propriétés antimicrobiennes et les fonctions associées à la maturation et au transport de ce peptide. Afin de tester cette hypothèse, des tests antimicrobiens ont été réalisés en comparant la souche COH1 à des souches ne possédant pas l'opéron complet (les souches 515 et NEM316). Des zones d'inhibition de croissance provoquées par la bactériocine putative produite pas les souches de *S. agalactiae* ont été recherchées par une technique de spots en utilisant différentes espèces indicatrices (Figure 36).

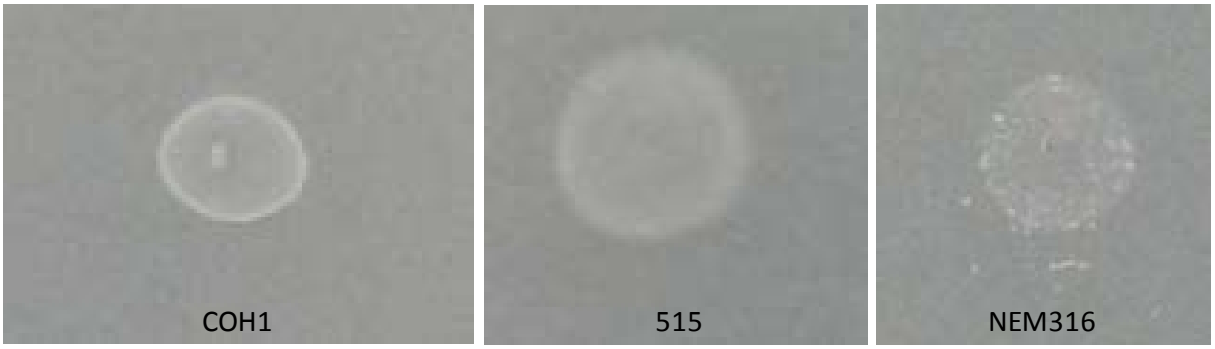


Figure 36. Test antimicrobien en utilisant différentes souches de *S. agalactiae.*

Des spots de cultures d'une nuit des souches de S. agalactiae *ont été déposés sur des géloses. Un millilitre d'une culture d'une nuit des souches indicatrices a été inoculé dans de la gélose molle (contenant 8 % d'agar) maintenue en surfusion. Le mélange a été coulé en surcouche sur les géloses. L'observation a été réalisée après une incubation de 24 heures dans les conditions appropriées. Les photos correspondent à la zone aux alentours des gouttes de chacune des souches testées. Les photos représentent les résultats obtenus avec la souche* L. lactis *MG1363 comme souche indicatrice. Des résultats identiques ont été obtenus avec les souches indicatrices :* E. coli *DH5α et EC101,* S. uberis *21519, 20978, 19118 et 21102,* S. dysgalactiae *subsp.* dysgalactiae *24122 et 24098,* S. canis *20922,* S. suis *19179,* S. pneumoniae *3993 et* S. aureus *24609 et 24465.*

Hormis un aspect de gouttes différent dû à l'inhibition de formation des gouttes par les souches indicatrices, aucune zone d'inhibition révélant une activité antimicrobienne des souches testées de *S. agalactiae* n'a pu être mise en évidence, après 24 heures, en utilisant 14 souches indicatrices différentes dans les conditions utilisées (Figure 36).
D'autres techniques ont été réalisées (méthode de puits au lieu des spots, méthode de stries) mais aucune n'a révélé de phénotype d'inhibition de croissance.

3. Système toxine/antitoxine

Les gènes SAL_2044 et SAL_2045, codés par ICE_*515_tRNA*^{Lys}, sont exprimés en phase exponentielle et stationnaire de croissance. Ces gènes pourraient constituer un système d'addiction permettant le maintien de l'élément chez les bactéries. Une souche interrompue dans le gène SAL_2044 codant la toxine putative a pu être obtenue lors de nos travaux. Cette construction avait pour objectif de réaliser des tests de stabilité de l'ICE en absence du système d'addiction putatif. Néanmoins, des travaux réalisés en parallèle (Travaux de thèse d'Aurore Puymège, UMR1128) et utilisant ce mutant 515ΔSAL_2044 en présence d'un agent provoquant des dommages à l'ADN (mitomycine C), décrit antérieurement comme augmentant le taux d'excision de certains éléments génétiques mobiles possédant des régulateurs similaires à ICE_*515_tRNA*^{Lys} [14, 371], n'ont pas permis d'aboutir à la perte de l'ICE de la souche *S. agalactiae* 515ΔSAL_2044. Ceci suggère que la protéine SAL_2044 pourrait être impliquée dans la stabilité de l'ICE mais qu'elle n'agirait pas seule pour le maintien de l'élément dans la population.

IV. Propriétés d'adhésion conférées par *ICE 515 tRNA^{Lys}* aux souches bactériennes

1. Implication d'ICE *515 tRNA^{Lys}* dans la capacité d'adhésion des souches.

ICE_*515_tRNA^{Lys}* code trois protéines de surface putatives. Chez les bactéries, les protéines de surface sont souvent impliquées dans l'adhésion des cellules bactériennes à des surfaces inertes ou aux composants de leur hôte. L'adhésion est une étape clé de la survie cellulaire et de la colonisation de leur environnement pour les bactéries. Afin de caractériser le rôle que l'ICE pourrait jouer dans ce mécanisme, les protéines de surface codées par l'ICE ont été analysées vis-à-vis de ce processus. La formation de biofilm, l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire et l'adhésion à une agglutinine ont ainsi été évaluées chez la souche *S. agalactiae* NEM316 ayant reçu ICE_*515_tRNA^{Lys}* par conjugaison.

1.1. Implication dans la formation de biofilm.

La formation de biofilm par les bactéries constitue un mécanisme de défense important contre les fluctuations de l'environnement. Il est estimé qu'une majorité des infections causées par des agents bactériens serait la cause de ce type de regroupement communautaire. L'étude de cette propriété est donc importante à des fins prophylactiques.

1.1.1. Implication dans la biomasse des biofilms formés

La capacité de formation de biofilm des souches NEM316 et NEM316 (ICE_*515_tRNA^{Lys}*) de *S. agalactiae* a été évaluée par un test en plaque en polystyrène. La quantité de biomasse intégrée dans le biofilm de la souche possédant ou non ICE_*515_tRNA^{Lys}* a été mesurée par une coloration au cristal violet (Figure 37). Les résultats obtenus à partir de cette technique montrent que, malgré la variabilité entre réplicats

biologiques, la souche possédant l'ICE adhère significativement d'avantage au polystyrène que la souche qui en est dépourvue (test de Mann-Withney, p-value < 0.001). ICE_*515_tRNA*^{Lys} contribue ainsi à l'adhésion à un substrat inerte des souches le possédant.

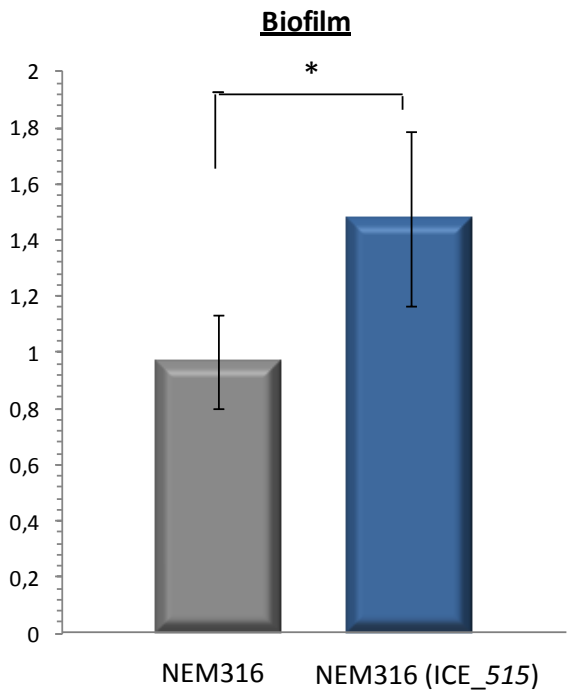


Figure 37. Evaluation de l'implication dans la formation de biofilm d'ICE_*515_tRNA*^{Lys}.

*La biomasse contenue dans les biofilms formés après 24 h en plaques 24 puits à fond plat à 37 °C par les souches NEM316 et NEM316 (ICE*_515_tRNA^{Lys}*) a été évaluée par des mesures spectrophotométriques à une densité optique de 595 nm après une coloration au cristal violet. Les mesures obtenues sont en corrélation avec la quantité de cellules bactériennes adhérées au polystyrène. L'expérience a été réalisée en quadruplat. L'astérisque signale la significativité de la différence de biomasse contenue au sein des biofilms étudiés (test de Mann-Whitney, p-value < 0,001).*

1.1.2. Implication dans l'architecture des biofilms

Les biofilms formés par la souche *S. agalactiae* NEM316 possédant ou non ICE_*515_tRNA*^{Lys} ont été observés en trois dimensions par microscopie confocale à balayage. Cette technique permet d'examiner la structure tridimensionnelle du biofilm formé par les souches (Figure 38). Les cellules vivantes ont été différenciées des cellules commençant à

perdre leur intégrité membranaire à l'aide d'un fluorophore différent (respectivement SYTO 9 et iodure de propidium). Le fluorophore pénétrant dans les cellules non viables se fixe également sur l'ADN extracellulaire contenu dans les échantillons.

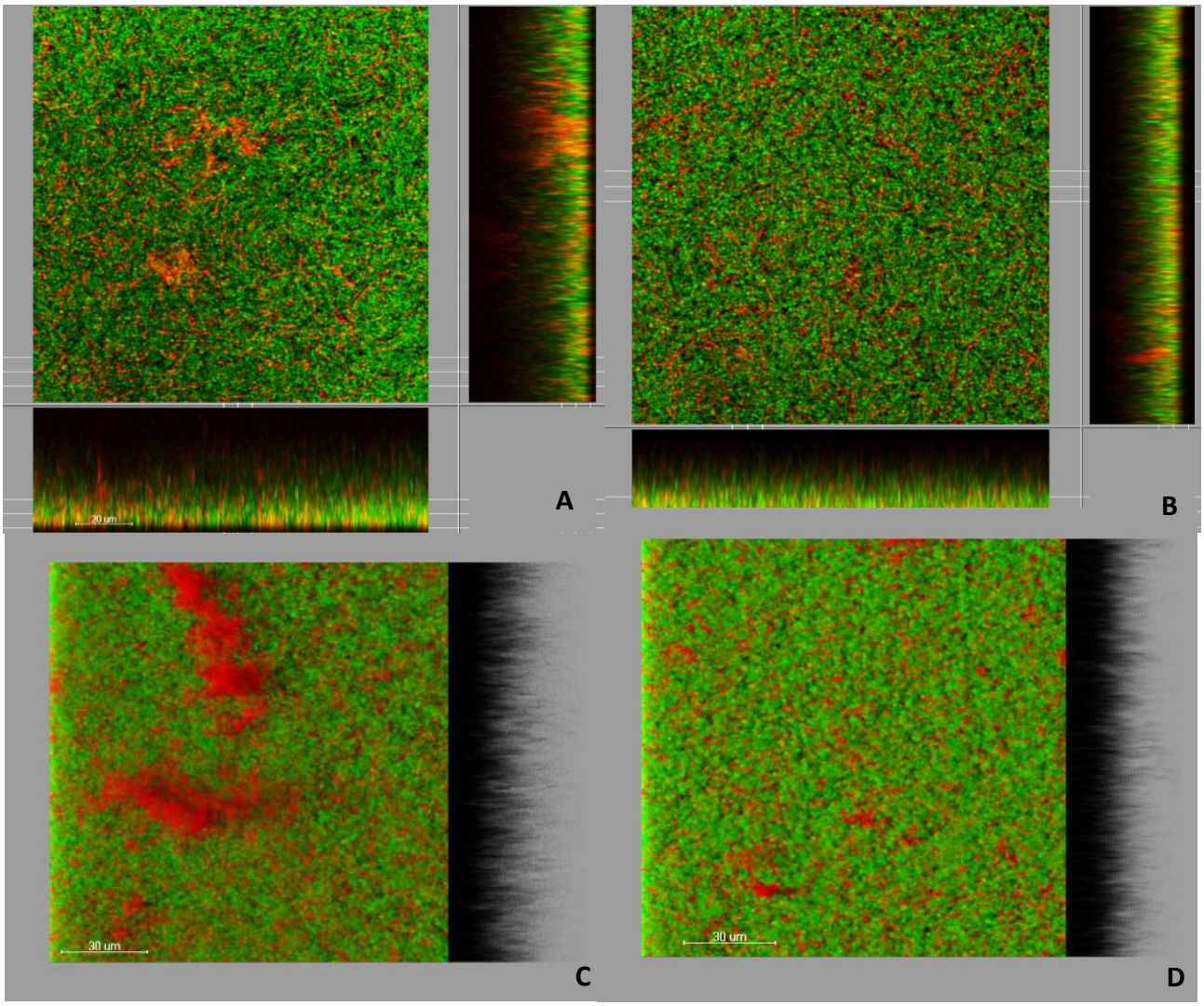


Figure 38. Observation par microscopie confocale à balayage des biofilms formés par *S. agalactiae*.

Les biofilms formés par les souches NEM316 (A et C) et NEM316 (ICE_*515_tRNA^{Lys}) (B et D) ont été observés en microscopie confocale à balayage. Les plans A et B représentent des vues en mode section des biofilms tandis que les plans C et D représentent des vues topographiques des biofilms. Les cellules vivantes ont été marquées à l'aide du fluorophore SYTO 9 (fluorescence verte) et les cellules ayant perdu leur intégrité ainsi que l'ADN extracellulaire ont été marqués avec de l'iodure de propidium (fluorescence rouge). Les vues représentées sur la figure sont représentatives de l'ensemble des observations réalisées.*

Les diverses observations réalisées ont montré que les deux souches forment des biofilms d'une épaisseur maximale similaire comprise entre 40 et 49 µm. Aucune différence du volume occupé par les biofilms des deux souches n'a été observée sur l'ensemble des vues étudiées représentatives des échantillons. Des expériences complémentaires n'ont pas mis en évidence de différence de taille des cellules des deux souches étudiées qui aurait pu expliquer la non concordance des résultats entre la quantification de la biomasse par les révélations au cristal violet et la visualisation en microscopie confocale à balayage. En effet, le nombre d'unité formant des colonies à densité optique équivalente (DO à 600 nm de 0,4 et 0,8) est similaire entre les deux souches.

Le ratio du biovolume rapporté à la surface du biofilm reflète la fraction du biofilm exposée au flux nutritif et est donc une indication de l'adaptation du biofilm à l'environnement [172]. Aucune différence d'exposition des cellules au flux nutritif n'a pu être mise en évidence entre la souche possédant ICE_*515_tRNA*^{Lys} de celle ne le possédant pas. L'observation microscopique a révélé des amas de cellules ayant perdu leur intégrité membranaire (en rouge) uniquement à la surface des biofilms formés par les cellules appartenant à la souche NEM316 ce qui n'est pas le cas pour les biofilms formés par les cellules possédant ICE_*515_tRNA*^{Lys} (Figure 38).

Par ailleurs, la distribution des cellules vivantes portant ICE_*515_tRNA*^{Lys} sur le substrat (0,212) est significativement plus hétérogène (pvalue < 0,05) que celle des biofilms formés par les cellules ne possédant pas l'élément (0,147) [172].

Ces données ne permettent pas de conclure quant à la différence de biomasse contenue dans les biofilms observée entre les deux souches testées par la technique du cristal violet. Néanmoins, certaines caractéristiques conférées par ICE_*515_tRNA*^{Lys} dans la structuration de la communauté microbienne ont été mises en évidence.

1.2. Implication dans l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire.

Des études ont montré que l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales de l'hôte peut cibler des composants de la matrice extracellulaire [242, 286, 381]. L'implication d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} dans l'adhésion à des composants de la matrice extracellulaire a donc été examinée.

1.2.1. Adhésion au fibrinogène

La capacité d'adhésion à différentes concentrations de fibrinogène de la souche NEM316 possédant ou non l'ICE a été évaluée en utilisant un protocole de coloration au cristal violet et une lecture au spectrophotomètre (Figure 39). L'adhésion est corrélée avec l'intensité finale de coloration observée à 570 nm.

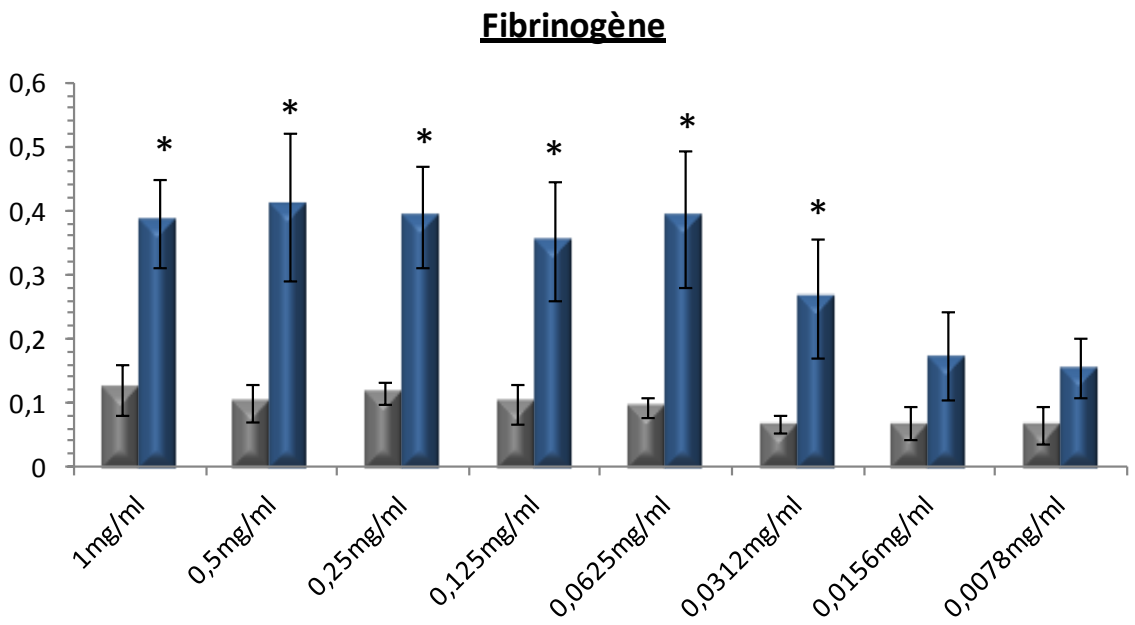


Figure 39. Evaluation de l'implication d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} dans l'adhésion au fibrinogène.

Les souches NEM316 (en gris) et NEM316 (ICE_*515_tRNA^{Lys}) (en bleu) ont été placées durant 3 h à 37 °C dans des microplaques de 96 puits à fond plat préalablement recouvertes avec différentes*

concentrations de fibrinogène. Les cellules bactériennes adhérées ont été quantifiées après des lavages, une coloration au cristal violet et une mesure spectrophotométrique à 570 nm. L'expérience a été réalisée en quadruplat. Le test de Mann-Whitney a été appliqué sur les données brutes et les valeurs significativement différentes entre les souches (p-value < 0,05) sont désignées par un astérisque.

Les résultats indiquent que, jusqu'à une concentration en fibrinogène de 0,0312 mg/ml, la souche possédant l'ICE adhère significativement plus au fibrinogène que la souche qui en est dépourvue (p-value < 0,05). En dessous de cette concentration, aucune différence significative n'est notée dans les conditions utilisées.

ICE_*515_tRNA*^{Lys} confère donc aux souches une capacité d'adhésion plus élevée au fibrinogène.

1.2.2. Adhésion à la fibronectine

L'adhésion à la fibronectine de la souche NEM316 et du transconjugant possédant ICE_*515_tRNA*^{Lys} a également été examinée (Figure 40).

Aucune différence dans l'adhésion à la fibronectine n'a pu être observée entre les souches possédant ou non ICE_*515_tRNA*^{Lys} dans les conditions expérimentales utilisées (p-value > 0.05).

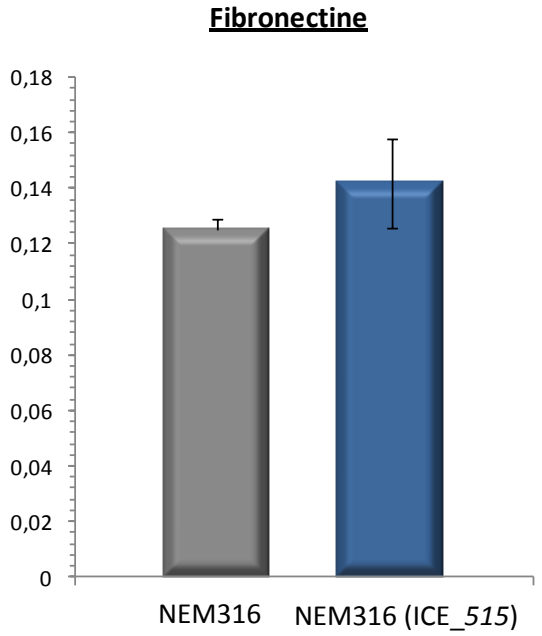


Figure 40. Evaluation de l'implication d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* dans l'adhésion à la fibronectine.

Les souches NEM316 (en gris) et NEM316 (ICE_*515_tRNA^{Lys}) (en bleu) ont été placées durant 3 h à 37 °C dans des microplaques de 96 puits à fond plat préalablement recouvertes avec 0,25 mg/ml de fibronectine. Les cellules bactériennes adhérées ont été quantifiées après des lavages, une coloration au cristal violet et une mesure spectrophotométrique à 570 nm. L'expérience a été réalisée en triplicat.*

1.3. Implication dans l'adhésion à une agglutinine.

Plusieurs antigènes I/II, tels SpaP produite par *S. mutans* et SspA et SspB produites par *S. gordonii*, ont été décrits comme étant impliqués dans l'adhésion à la protéine salivaire Gp340 ce qui pourrait avoir un impact sur la colonisation de l'hôte par les souches pathogènes. La protéine Gp340 est une des protéines majoritaires au niveau salivaire de l'Homme. L'analyse *in silico* a révélé une structure protéique de la protéine SAL_2056 similaire à celle des antigènes I/II décrits dans la littérature. Le rôle d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* dans l'adhésion à de la salive clarifiée a donc été analysé (Figure 41). Néanmoins, dans les conditions expérimentales utilisées, aucune différence dans la formation de biofilm sur des

plaques recouvertes avec de la salive clarifiée à 10 % n'a pu être mise en évidence en fonction de la présence/absence d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} (p-value > 0,05 %).

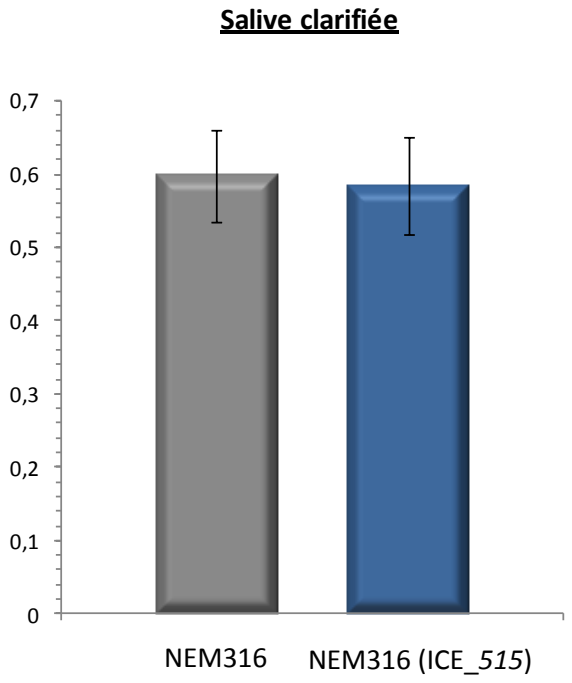


Figure 41. Evaluation de l'implication d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} dans l'adhésion à de la salive clarifiée.

*Les souches NEM316 (en gris) et NEM316 (ICE*_515_tRNA^{Lys}*) (en bleu) ont été placées durant 24 h à 37 °C dans des plaques 24 puits à fond plat préalablement recouvertes avec de la salive clarifiée à 10 %. Les cellules bactériennes adhérées ont été quantifiées après des lavages, une coloration au cristal violet et une mesure spectrophotométrique à 595 nm. L'expérience a été réalisée en quadruplat.*

2. Implication spécifique de l'antigène I/II SAL_2056 dans l'adhésion.

La difficulté à interrompre des gènes codés par l'ICE étudié chez *S. agalactiae*, à laquelle s'ajoute la grande quantité de protéines de surface produites par cette bactérie, nous a amenés à poursuivre notre étude en réalisant une expression des protéines d'intérêt chez une autre espèce bactérienne à coloration Gram positive. La souche

Lactococcus lactis MG1363 a ainsi été choisie comme modèle d'étude puisqu'elle produit peu de protéines extracellulaires mais possède la machinerie nécessaire à l'excrétion et à l'exposition de ces protéines à la surface cellulaire [277, 312, 368].

L'analyse *in silico* a montré que SAL_2056 est une protéine codée par ICE_*515_tRNA*^{Lys} ayant une forte prévalence chez les souches de *S. agalactiae* et possédant des domaines fonctionnels putatifs pouvant conférer des propriétés adhésives. De plus, la famille des protéines à laquelle appartient SAL_2056 paraît ubiquiste chez les streptocoques. Par conséquent, une étude plus approfondie de la protéine SAL_2056 est apparue intéressante.

Pour ces raisons, cette partie des travaux a été centrée sur la caractérisation fonctionnelle de SAL_2056. Afin de déterminer son rôle dans l'adhésion, le gène SAL_2056 a été cloné dans le vecteur pOri23 sous contrôle du promoteur constitutif P23. La transcription du gène a été confirmée par RT-PCR (données non montrées) et les analyses phénotypiques de la souche *L. lactis* MG1363 (pOri23-AgI/II) ont été réalisées.

2.1. Implication de SAL_2056 dans la formation de biofilm

La caractérisation fonctionnelle de la protéine SAL_2056 a débuté par l'étude de son rôle dans la formation de biofilm chez *S. agalactiae*. Un protocole similaire à celui employé pour l'analyse du transconjugant NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) a été utilisé (Figure 42). La biomasse contenue dans le biofilm généré par la souche exprimant SAL_2056 est significativement plus importante (p-value < 0,001). Dans les conditions expérimentales mises en place, SAL_2056 paraît conférer un phénotype de regroupement communautaire bactérien en biofilm.

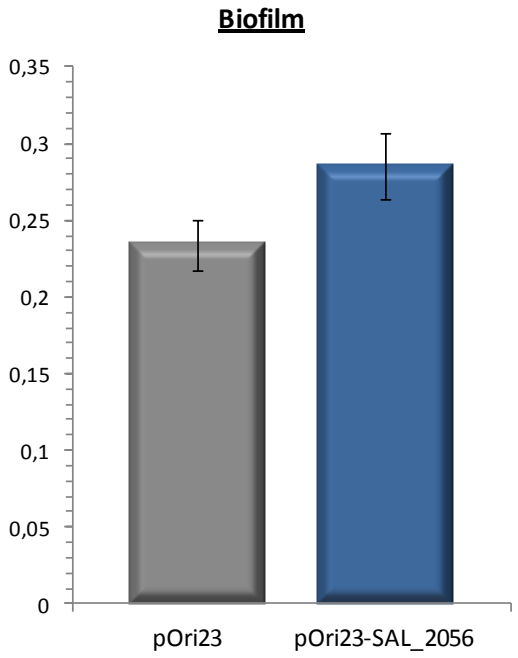


Figure 42. Evaluation de l'implication dans la formation de biofilm de SAL_2056.

La biomasse contenue dans les biofilms formés après 24 h en plaques 24 puits à fond plat à 30 °C par les souches L. lactis *MG1363 (pOri23) et* L. lactis *MG1363 (pOri23-SAL_2056) a été évaluée par des mesures spectrophotométriques après une coloration au cristal violet. Les mesures obtenues à une densité optique de 595 nm sont en corrélation avec la quantité de cellules bactériennes adhérées au polystyrène. L'expérience a été réalisée en quadruplat.*

La densité optique observée entre la souche possédant l'insert est 1,2 fois plus importante que la souche ne le possédant pas. Il est à noter que la souche NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) adhère 1,5 fois plus au polystyrène que la souche NEM316. D'autres protéines codées par ICE_*515_tRNA*^{Lys} pourraient donc participer au phénotype complet de formation de biofilm conféré par l'ICE.

2.2. Implication de SAL_2056 dans l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire

Les résultats précédents ont montré qu'ICE_*515_tRNA*^{Lys} confère une capacité d'adhésion au fibrinogène mais pas à la fibronectine. L'implication de SAL_2056 dans l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire a donc été examinée. Les résultats présentés représentent les résultats d'adhésion au fibrinogène et à la fibronectine obtenus pour la souche de *L. lactis* MG1363 exprimant ou non la protéine SAL_2056.

2.2.1. Adhésion au fibrinogène

Un test d'adhésion au fibrinogène a montré que la souche *L. lactis* MG1363 (pOri23_SAL_2056) adhère significativement légèrement davantage que la souche ne possédant pas l'insert (p-value < 0,01) (Figure 43).

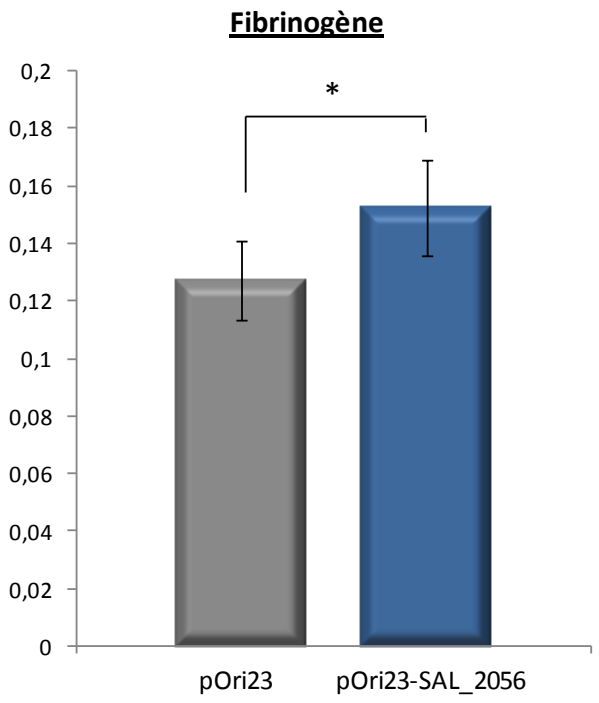


Figure 43. Evaluation de l'implication de SAL_2056 dans l'adhésion au fibrinogène.

Les souches L. lactis *MG1363 (pOri23) et* L. lactis *MG1363 (pOri23-SAL_2056) ont été placées durant 3 h à 30 °C dans des microplaques de 96 puits à fond plat préalablement coatées avec 1 mg/ml de*

fibrinogène. Les cellules bactériennes adhérées ont été quantifiées après des lavages, une coloration au cristal violet et des mesures spectrophotométriques à 570 nm. L'expérience a été réalisée en triplicat. L'astérisque signale la significativité statistique entre les deux souches (test de Mann-Whitney, p-value < 0,01).

La différence d'adhésion au fibrinogène observée entre la souche possédant l'ICE complet et celle ne le possédant pas est nettement plus importante que la différence entre une souche de *L. lactis* exprimant SAL_2056 qu'une ne l'exprimant pas. Il est peu probable que SAL_2056 soit plus exprimé chromosomiquement chez *S. agalactiae* que de manière plasmidique chez *L. lactis*. Ces résultats suggèrent donc fortement que SAL_2056 n'est pas la seule protéine d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} permettant l'adhésion au fibrinogène.

2.2.2. Adhésion à la fibronectine

Les expériences précédentes n'ont pas permis de détecter de rôle d'*ICE_515_tRNA*^{Lys} dans l'adhésion à la fibronectine. De nombreuses études ont montré qu'étant donné le nombre de protéines de surface exprimées par les bactéries pathogènes, le rôle individuel de chacune est souvent délicat à estimer directement chez ces espèces. Dans ces études, l'analyse fine du rôle des protéines de surface passe par la production des protéines chez un hôte hétérologue [277, 317, 409]. Par conséquent, l'analyse du rôle de SAL_2056 dans l'adhésion à la fibronectine chez *L. lactis* MG1363 nous a parue importante.

Des expériences d'adhésion à la fibronectine des souches de *L. lactis* MG1363 exprimant ou non SAL_2056 ont été réalisées et celles-ci ont révélé que SAL_2056 confère une capacité d'adhésion à la fibronectine à *L. lactis* (p-value < 0,001) (Figure 44). L'absence de détection de cette propriété chez *S. agalactiae* pourrait donc s'expliquer par l'abondance des protéines de surface partiellement redondantes produites par *S. agalactiae* dont certaines sont déjà décrites comme permettant à *S. agalactiae* d'adhérer à la fibronectine.

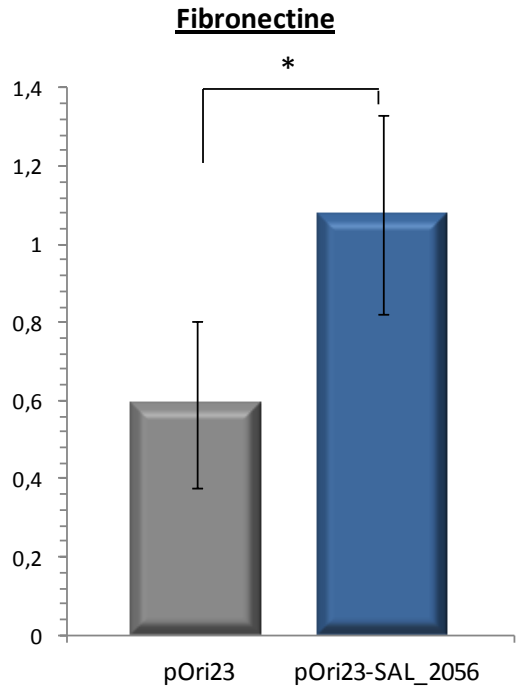


Figure 44. Evaluation de l'implication de SAL_2056 dans l'adhésion à la fibronectine.

Les souches L. lactis *MG1363 (pOri23) et* L. lactis *MG1363 (pOri23-SAL_2056) ont été placées durant 3 h à 30 °C dans des microplaques de 96 puits à fond plat préalablement recouvertes avec 0,25 mg/ml de fibronectine. Les cellules bactériennes adhérées ont été quantifiées après des lavages, une coloration au cristal violet et une mesure spectrophotométrique à 570 nm. L'expérience a été réalisée en quadruplat. L'astérisque signale la significativité statistique entre les deux souches (test de Mann-Whitney, p-value < 0,001).*

2.3. Implication dans l'adhésion aux protéines salivaires

De la même manière que précédemment, le rôle potentiel de SAL_2056 dans la formation de biofilm sur des plaques, recouvertes de salive clarifiée à une concentration de 10 %, a été analysé (Figure 45).

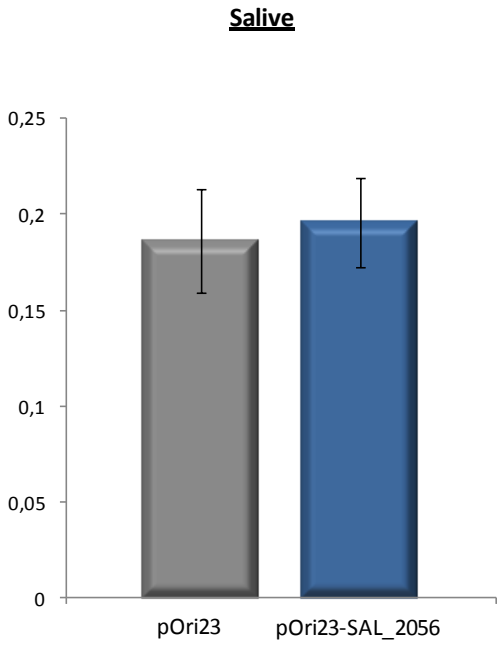


Figure 45. Evaluation de l'implication de SAL_2056 dans l'adhésion à de la salive clarifiée.

Les souches L. lactis *MG1363 (pOri23) et MG1363 (pOri23-SAL_2056) ont été placées durant 24 h à 30 °C dans des plaques 24 puits à fond plat préalablement recouvertes avec de la salive clarifiée à 10 %. Les cellules bactériennes adhérées ont été quantifiées après des lavages, une coloration au cristal violet et une mesure spectrophotométrique à 595 nm. L'expérience a été réalisée en triplicat.*

Dans les conditions expérimentales utilisées, aucune différence entre la souche possédant l'insert ou non n'est observable (p-value > 0.05). La protéine SAL_2056, contrairement à d'autres antigènes I/II décrits, ne paraît pas permettre l'adhésion aux protéines salivaires.

L'ensemble des expériences d'adhésion des différentes souches de *S. agalactiae* de *L. lactis* suggère que d'autres protéines que SAL_2056 codées par ICE_*515_tRNA*^{Lys} sont responsables des propriétés d'adhésion conférées par l'ICE à *S. agalactiae* (formation de biofilm et adhésion au fibrinogène). L'analyse des promoteurs a montré que les gènes SAL_2056 et SAL_2057 pourraient être co-transcrits et l'analyse par BLASTP a indiqué que des homologues des deux gènes sont également adjacents chez d'autres espèces comme sur ICE RD2 de *S. pyogenes* [371] et sur l'élément de *S. urinalis* 2285-97 [79].

Par ailleurs, sur les ICE Tn*GBS1* et Tn*GBS2* de *S. agalactiae* NEM316, les trois homologues des gènes codant les protéines de surface d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} sont adjacents. Ceci pourrait indiquer un rôle conjoint des protéines dans l'adhésion et/ou l'agrégation cellulaire. Une construction permettant l'expression de la protéine SAL_2057 a été initiée mais celle-ci n'a pu aboutir dans le temps imparti et doit être achevée afin de répondre en partie à cette hypothèse.

V. Propriétés hémolytiques conférées par ICE *515 tRNA^{Lys}* aux souches

1. Production du facteur CAMP II par ICE *515 tRNA^{Lys} chez* S. agalactiae

L'analyse *in silico* a révélé la présence d'un nouveau facteur CAMP (facteur CAMP II) au locus tRNA Lysine chez trois souches de *S. agalactiae* parmi celles qui sont séquencées (*S. agalactiae* 515, COH1 et FSL S3-026). Afin d'étudier le rôle additif que pourrait conférer ce nouveau facteur co-hémolytique putatif aux souches de *S. agalactiae*, des tests CAMP sur géloses au sang ont été réalisés. Les souches de *S. agalactiae* testées pour leur capacité à produire une réaction synergique d'hémolyse en présence de sphingomyélinase produite par *S. aureus* sont la souche 515, possédant les 2 facteurs CAMP, la souche NEM316, possédant uniquement le facteur CAMP génomique, et le transconjugant NEM316 (ICE_*515_tRNA^{Lys}*) qui possède également les deux facteurs CAMP (le facteur CAMP génomique et le facteur CAMP II acquis par le transfert conjugatif de l'ICE) (Figure 46).

Toutes les souches examinées de *S. agalactiae* présentent une hémolyse caractéristique liée à la production d'un facteur CAMP (Figure 46). Néanmoins, aucune différence dans la taille de la zone de la co-hémolyse n'a pu être mise en évidence entre la souche NEM316 et celle portant ICE_*515_tRNA^{Lys}*.

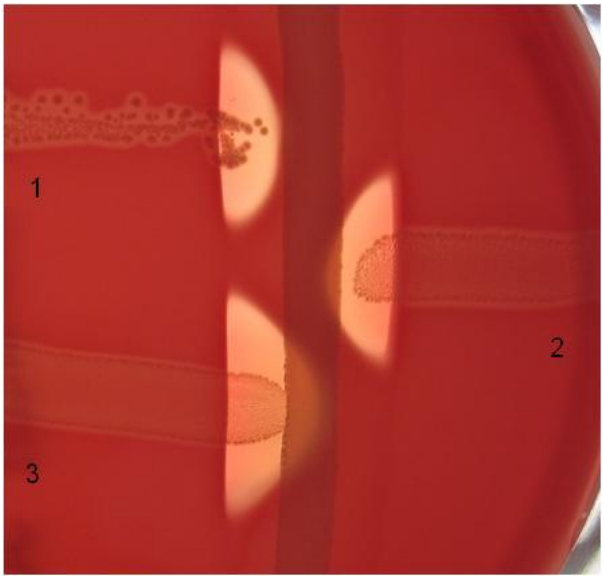


Figure 46. Test CAMP sur les souches de *S. agalactiae.*

Un aliquot de culture d'une nuit de la souche S. aureus *CIP 57.10 a été strié verticalement. Perpendiculairement, des aliquots de culture d'une nuit de la souche* S. agalactiae *NEM316 (1), du transconjugant NEM316 (ICE*_515_tRNA^{Lys}*) (2) et de la souche 515 (3) ont été striés. Les réactions de synergie représentant un résultat positif au test CAMP sont détectées par la présence d'une zone hémolytique importante et caractéristique en forme de flèche.*

Une analyse permettant d'examiner plus précisément l'impact de la production d'un nouveau facteur CAMP sur la capacité de *S. agalactiae* à produire une réaction co-hémolytique en présence de sphingomyélinase a été réalisée. La mesure de l'activité du ou des facteurs CAMP chez *S. agalactiae* a été réalisée en microplaques à partir des surnageants de culture filtrés des souches *S. agalactiae* 515, NEM316 et NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) (Figure 47). L'utilisation des surnageants filtrés permet d'éliminer l'impact de la β-hémolysine, ubiquiste chez *S. agalactiae*, sur l'activité hémolytique observée puisque celle-ci reste attachée à la paroi cellulaire bactérienne.

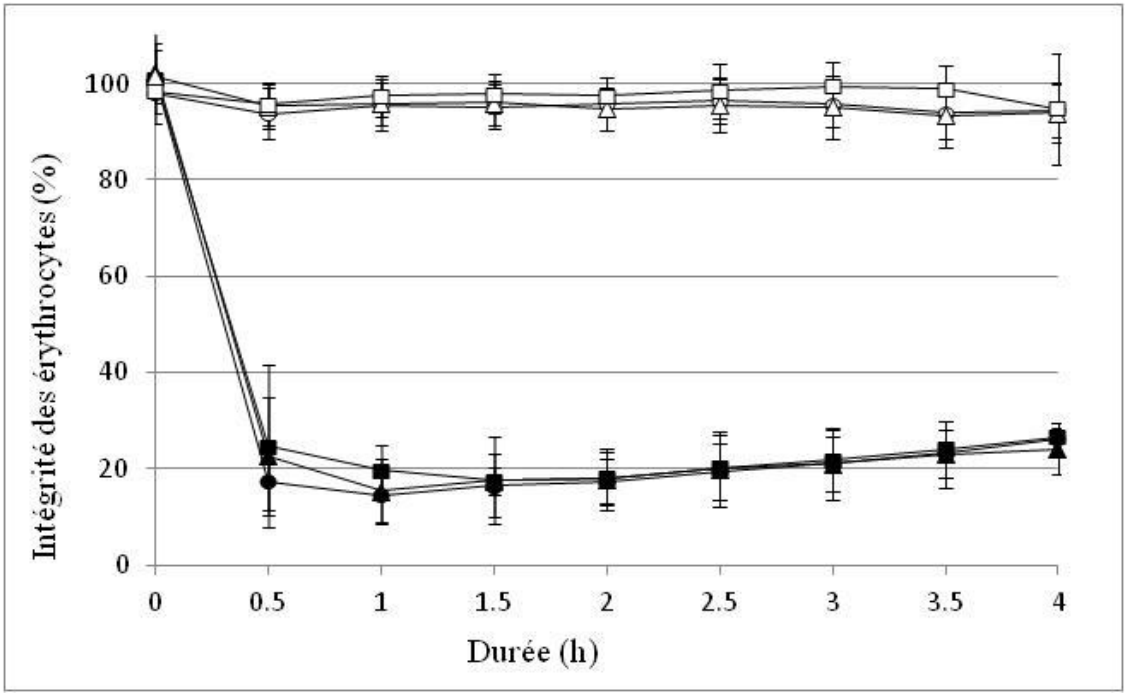


Figure 47. Mesure de l'activité co-hémolytique du (des) facteur(s) CAMP chez *S. agalactiae*.

L'activité co-hémolytique du ou des facteur(s) CAMP produit(s) par les souches de S. agalactiae *est corrélée avec la diminution de l'intégrité des érythrocytes de mouton concentrés à 1 %. Cette perte d'intégrité est visualisée comme une diminution de la densité optique observée par spectrophotométrie. L'activité du ou des facteur(s) CAMP a été évaluée à partir des surnageants de culture des souches 515 (cercles vides, sans traitement à la sphingomyélinase de* S. aureus *et cercle plein avec traitement), NEM316 (triangles vides sans traitement et triangles noirs avec traitement) et pour le transconjugant NEM316 (ICE*_515_tRNA^{Lys}*) (carrés vides sans prétraitement et carrés pleins avec traitement).*

L'activité co-hémolytique a été mesurée à une densité optique de 630 nm toutes les 30 minutes après homogénéisation en utilisant un lecteur de microplaques (Biotek). L'expérience a été réalisée en triplicat en utilisant trois échantillons biologiques indépendants.

Le suivi de la diminution de l'intégrité des érythrocytes de mouton suite à un traitement avec de la sphingomyélinase de *S. aureus* et une incubation en présence de surnageant filtré de cultures des souches de *S. agalactiae* a encore une fois confirmé la

production et la sécrétion de facteur(s) CAMP par les souches 515, NEM316 et NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) (Figure 47). L'activité du (ou des) facteur(s) CAMP permet de lyser, en 30 minutes, environ 80 % des érythrocytes de mouton concentrés à 1 %. Néanmoins, l'activité co-hémolytique paraît refléter celle du facteur CAMP génomique puisqu'aucune activité additionnelle n'a été observée pour la souche NEM316 possédant ICE_*515_tRNA*^{Lys} qui code le facteur CAMP II par rapport à la souche sauvage NEM316. De plus, aucune activité additionnelle n'est observée lorsque les surnageants utilisés lors de l'expérience sont dilués jusqu'à 16 fois.

L'hème est l'un des deux co-facteurs, avec la ménaquinone, qui est indispensable à la mise en place de la respiration chez *S. agalactiae*. La respiration favorise la croissance de *S. agalactiae* [441]. L'hypothèse selon laquelle le facteur CAMP, en permettant le rejet d'hème dans l'environnement, pourrait participer à la respiration de *S. agalactiae* a été creusée. Des tests ont été réalisés en utilisant différentes conditions de culture induisant ou non la respiration (condition statique et condition aérobie avec ajout de ménaquinone et/ou d'hème). La croissance bactérienne a été évaluée par une mesure spectrophotométrique à une densité optique de 600 nm et la biomasse formée par une mesure du poids sec. Aucune différence n'a été relevée entre la souche possédant l'ICE de celle ne le possédant pas. Néanmoins, le pH est resté similaire dans toutes les conditions mises en place ce qui suggère qu'aucune condition utilisée n'a permis la mise en place de la respiration chez *S. agalactiae*. D'autres essais devront être réalisés pour confirmer les résultats obtenus.

2. Sécrétion du facteur CAMP II chez *S. agalactiae*

Les expériences précédentes ont montré que le facteur CAMP II ne semble pas conférer d'activité co-hémolytique supplémentaire chez les souches de *S. agalactiae* exprimant déjà le facteur CAMP I génomique. Afin de vérifier que le facteur CAMP II est effectivement sécrété, des précipitations de surnageants de culture des souches NEM316 et NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) ont été réalisées afin d'observer l'ensemble des protéines

sécrétées par une séparation électrophorétique par SDS-PAGE (Figure 48). Les expériences ont été réalisées en parallèle en milieu de culture BHI et MCD (Milieu Chimiquement Défini, [234]). Les surnageants ont été précipités 250 fois en milieu BHI et 1000 fois en milieu MCD.

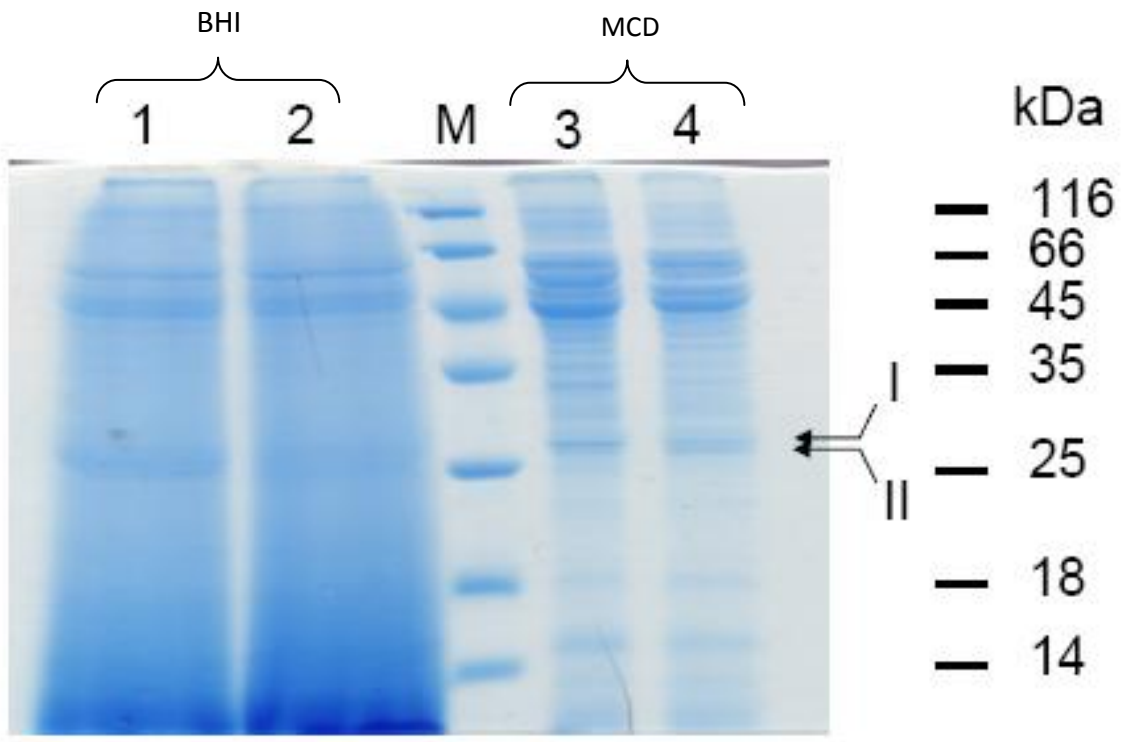


Figure 48. Séparation électrophorétique des protéines sécrétées des souches de *S. agalactiae* par SDS-PAGE.

*Les surnageants de culture dans du BHI (puits 1 et 2) et du MCD (puits 3 et 4) d'une nuit des souches NEM316 (1 et 3) et NEM316 (ICE*_515_tRNA^{Lys}*) (puits 2 et 4) ont été précipités à l'aide d'un protocole utilisant de l'acide trichloroacétique et séparés par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide) dans un gel de séparation de 12 %. La bande I représente le facteur CAMP I génomique tandis que la bande II représente le facteur CAMP II.*

Les résultats obtenus semblent indiquer que les protéines collectées après précipitation des surnageants de culture en milieu BHI se dégradent plus vite que celles récupérées du milieu MCD (Figure 48). La séparation des protéines sécrétées retrouvées dans les surnageants de culture en milieu MCD montre que la souche NEM316

(ICE_*515_tRNA*^{Lys}) produit une protéine supplémentaire en milieu MCD par rapport à la souche NEM316, qui possède une taille approximative similaire à celle attendue pour le facteur CAMP II (27,7 kDa).

Afin de confirmer la sécrétion du facteur CAMP II par la souche NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}), les bandes du SDS-PAGE correspondant aux protéines d'intérêt des surnageants de culture de MCD ont été découpées et traitées afin d'être analysées par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse. Les résultats de spectrométrie ont montré que le facteur CAMP II (27,7 kDa) est sécrété de manière très similaire voire à un niveau légèrement supérieur par rapport au facteur CAMP I génomique (28,3 kDa) (rang 4 pour le facteur CAMP II et 6 pour le facteur CAMP I).

3. Fonctions hémolytiques conférées par le facteur CAMP II à des souches non pathogènes

Les expériences précédentes n'ayant pas pu mettre en évidence de propriétés co-hémolytiques du facteur CAMP II chez *S. agalactiae* dans les conditions expérimentales mises en place, la construction du mutant interrompu dans le gène SAL_2074 a été initiée. Cependant, comme pour la plupart des autres gènes étudiés, les nombreuses tentatives de sélection de la double recombinaison sont restées infructueuses. Dans ces conditions, afin d'étudier la fonctionnalité du facteur CAMP II, un vecteur d'expression permettant la production hétérologue de la protéine d'intérêt chez une souche hôte a été construit. La fonctionnalité du facteur CAMP II a été ainsi analysée en utilisant la souche *Lactococcus lactis* MG1363 comme souche productrice. Le gène SAL_2074 est exprimé sous le contrôle du promoteur constitutif P23 en utilisant le vecteur pOri23 [317]. L'expression de SAL_2074 par *L. lactis* MG1363 a été confirmée par RT-PCR en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance (Figure 49).

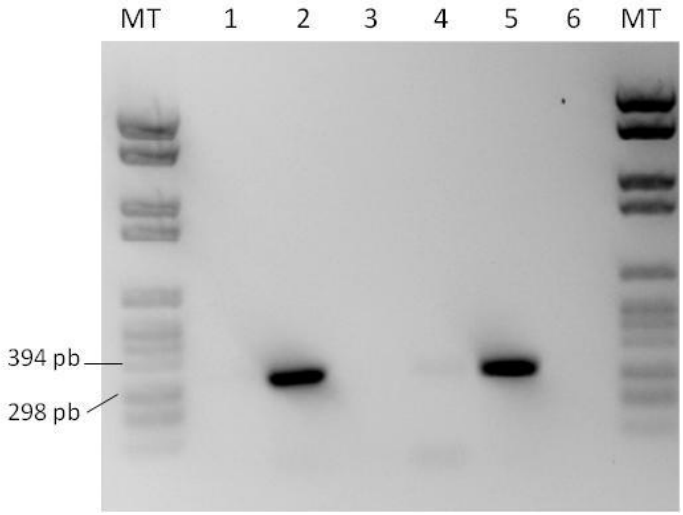


Figure 49. Analyse de l'expression de SAL_2074 par le vecteur pOri23 chez *L. lactis.*

L'expression de SAL_2074 a été examinée par RT-PCR sur les ARN extraits des souches MG1363 de L. lactis *exprimant ou non SAL_2074 en phase stationnaire de croissance. Les puits 1 et 2 correspondent respectivement aux RT-PCR réalisées à partir des ARN extraits de* L. lactis *MG1363 (pOri23) et* L. lactis *MG1363 (pOri23-camp^{515}). Les puits 3 et 4 sont les témoins de rétrotranscription de ces souches, pour lesquels, la retrotrancriptase n'a pas été ajoutée au mélange réactionnel. Le puits 5 est le témoin positif et correspond à la RT-PCR réalisée à partir de l'ARN extrait de la souche* S. agalactiae *515. Le puits 6 est le témoin négatif pour lequel de l'eau a été ajouté au mix réactionnel. Le marqueur de taille (MT) est le marqueur VI (Roche Applied Science). Des résultats identiques ont été obtenus par RT-PCR à partir des ARN extraits des souches en phase exponentielle de croissance (données non montrées).*

Afin d'observer la fonctionnalité du facteur CAMP II, des tests CAMP ont été effectués en utilisant les souches *L. lactis* MG1363 (pOri23) et *L. lactis* MG1363 (pORI23-camp^{515}) (Figure 50).

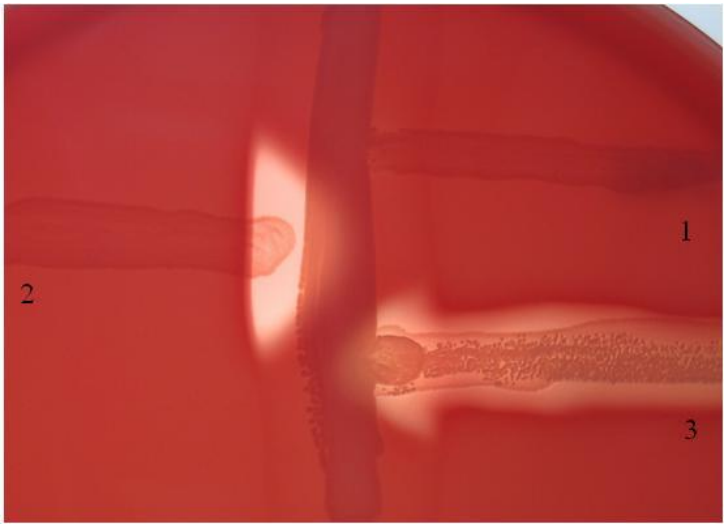


Figure 50. Test CAMP à partir des souches de *Lactococcus lactis* exprimant ou non le facteur CAMP II.

Un aliquot de culture d'une nuit de la souche CIP 57.10 de S. aureus *a été strié verticalement. Perpendiculairement, des stries à partir des cultures d'une nuit de la souche* L. lactis *MG1363 (pOri23) (1), du transformant* L. lactis *MG1363 (pOri23-camp515) (2) et de la souche témoin* S. agalactiae *515 (3) ont été réalisées.*

Une hémolyse caractéristique en forme de flèche, similaire à celle de la souche *S. agalactiae* 515, a été observée pour la souche *de L. lactis* MG1363 (pOri23-camp^{515}) contrairement au contrôle négatif MG1363 (pOri23) (Figure 50). Ces résultats prouvent que le facteur CAMP II est donc bien un facteur co-hémolytique et, qu'il est fonctionnel chez une espèce non pathogène telle que *L. lactis* MG1363. La fonctionnalité du facteur CAMP II a été confirmée par une titration co-hémolytique (Figure 51). Chez *L. lactis* MG1363, le facteur CAMP II permet de lyser environ 80 % des érythrocytes de mouton concentrés à 1 % en 30 minutes.

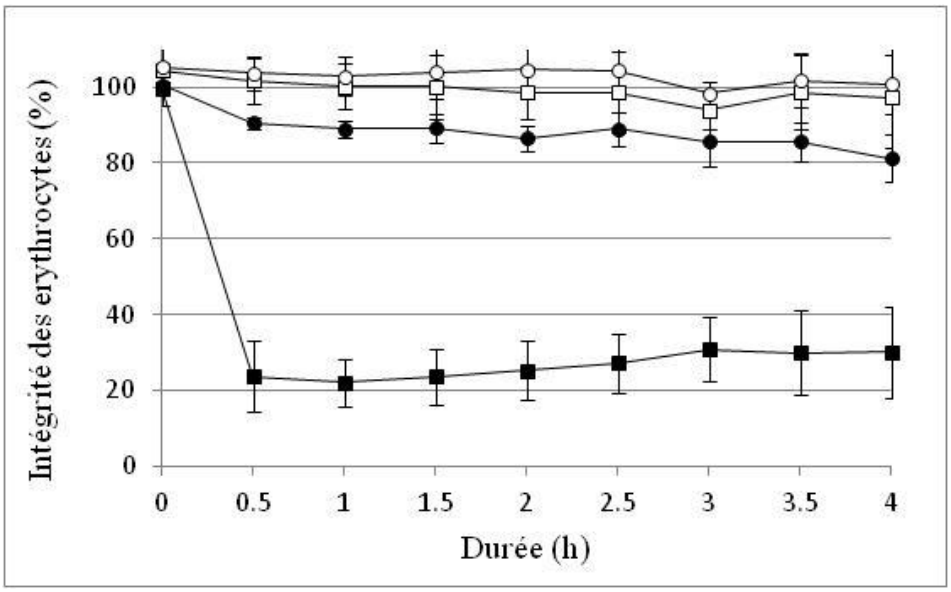


Figure 51. Mesure de l'activité co-hémolytique du facteur CAMP II chez *L. lactis*.

L'activité co-hémolytique du facteur CAMP est corrélée avec la perte d'intégrité des érythrocytes de mouton concentrés à 1 %. Cette perte d'intégrité est visualisée par une diminution de la densité optique observée par spectrophotométrie. L'activité co-hémolytique a été évaluée pour les souches de L. lactis *MG1363 (pOri23) (cercles vides, sans traitement à la sphingomyélinase de* S. aureus *et cercle plein avec traitement), MG1363 (pOri23-camp^{515}) (carrés vides sans traitement et carrés noirs avec traitement). L'activité co-hémolytique a été mesurée à une densité optique de 630 nm toutes les 30 minutes après homogénéisation en utilisant un lecteur de microplaques (Biotek). L'expérience a été réalisée en triplicat en utilisant trois échantillons biologiques indépendants.*

ICE_*515_tRNA^{Lys}* est un élément pouvant transférer de manière autonome entre souches de *S. agalactiae*. Par conséquent, cet élément pourrait permettre la dissémination du gène codant cette toxine formant des pores dans les membranes des érythrocytes dans les populations bactériennes ne possédant pas de facteur CAMP.

VI. Dissémination des fonctions codées par les ICE de la famille d'ICE *515 tRNA^{Lys}*

Les résultats décrits ci-dessus ont révélé que des gènes portés par ICE_*515_tRNA^{Lys}* codent des facteurs de virulence impliqués soit lors de l'étape d'adhésion, soit dans les propriétés hémolytiques de la souche hôte. Dans la suite logique de ces travaux, la transmissibilité potentielle de traits phénotypiques importants dans la virulence des souches pathogènes et véhiculés par les ICE de la famille d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* a été étudiée.

1. Transmission de fonctions codées par les ICE de la famille d'ICE *515 tRNA^{Lys}* à *S. uberis*

Des travaux antérieurs au sein de l'équipe ont mis en évidence une souche de *S. uberis* (19608) qui possède une intégrase proche de celle de la souche 515 de *S. agalactiae* [161]. Le génome complet de la souche de *S. uberis* 19608 a été séquencé en collaboration avec l'équipe du Professeur P. Glaser (équipe Génomique et évolution bactérienne, Institut Pasteur, Paris) afin d'obtenir la séquence d'ADN complète de l'élément génétique mobile putatif de cette souche.

Le séquençage a confirmé la présence d'un ICE intégré à l'extrémité 3' du gène codant l'ARNt Lysine chez la souche 19608 (ICE_*SUB19608_tRNA^{Lys}*) (Figure 52). Néanmoins, la totalité de la séquence de l'ICE putatif n'a pas pu être obtenue lors de ce séquençage. Des séquençages sont actuellement réalisés afin de combler les séquences manquantes de l'ICE. La taille totale de l'élément pourra ainsi être déterminée.

Le séquençage complet de *S. uberis* 19608 a permis d'obtenir un contig de 17391 pb qui inclut un module complet de conjugaison et de recombinaison (excisionase et intégrase) (Figure 52). L'intégrase, comme chez la souche *S. agalactiae* 515, est située à proximité immédiate du site de recombinaison *attR* (Figure 52). Le gène codant l'intégrase de l'ICE

intégré à l'extrémité 3' du gène codant l'ARNt Lysine chez *S. uberis* (ICE_*SUB19608_tRNA*^{Lys}) présente 87 % d'identité avec celui d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} tandis que le gène codant l'excisionase d'ICE_*SUB19608_tRNA*^{Lys} présente, quant à lui, 89 % d'identité avec celui d'ICE_*515_tRNA*^{Lys}.

Le module de conjugaison est complet et proche de ceux appartenant à la famille d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} de *S. agalactiae* et pourrait permettre le transfert de l'élément.

Le séquençage de l'extrémité 5' d'ICE_*SUB19608_tRNA*^{Lys} a révélé la présence d'un gène codant une protéine de virulence de la famille ESAT-6 (Early Secreted Antigenic Target-6) (Figure 52).

Les protéines de la famille ESAT-6, petites protéines sécrétées d'environ 95 acides aminés, ont été caractérisées pour la première fois chez *M. tuberculosis* [295]. Divers travaux montrent que ces protéines sont impliquées dans la virulence de *M. tuberculosis* en intervenant dans la survie cellulaire et dans la multiplication de *M. tuberculosis* chez l'hôte [181, 236, 295, 386, 428]. Par ailleurs, le gène est absent de toutes les souches vaccinales atténuées de *M. tuberculosis* connues [44]. Les protéines de la famille ESAT-6 sont également importantes dans la pathogenèse de *S. aureus* [57]. Les protéines de cette famille ont été retrouvées dans les génomes de *B. subtilis*, *B. anthracis*, *Clostridium acetobutylicum* et *Listeria monocytogenes* [295]. Lors des premières phases d'infection chez l'Homme et chez plusieurs espèces animales (primates, vaches et cochons d'Inde notamment), de nombreux épitopes, présents sur les protéines de la famille ESAT-6, sont de très importantes cibles en vue de l'activation de la réponse immunitaire [44]. D'autre part, il est important de noter qu'une étude transcriptomique a montré que le gène GBS1074 codant une protéine de la famille ESAT-6 chez *S. agalactiae* NEM316 était surexprimé quand la souche croît dans du fluide amniotique humain [370]. Néanmoins, aucun rôle précis des protéines ni aucune étape spécifique d'intervention des protéines lors de l'infection n'ont pu être mis en évidence jusque là [44].

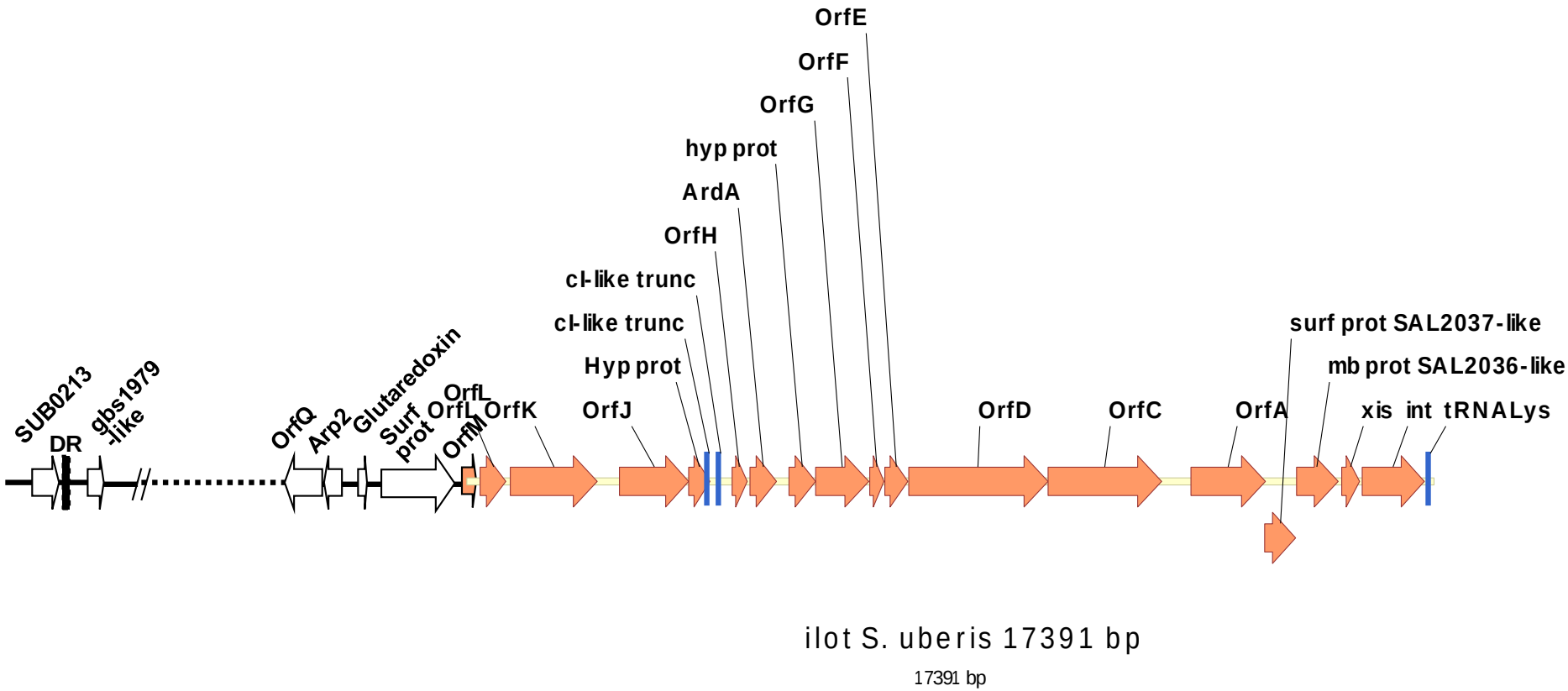


Figure 52. Schéma de l'élément intégré à l'extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Lys} chez *S. uberis* 19608.

Les gènes sont indiqués en dessus des flèches les représentant. Les ORF A à Q font partie du module de conjugaison. Le gène codant l'excisionase (xis) et l'intégrase (int) constituent le module de recombinaison. La partie du module de conjugaison en orange ainsi que le module de recombinaison ont une taille de 17391 pb.

Des gènes codant des protéines de la famille ESAT-6 sont également présents sur les éléments mobilisables intégrés à l'extrémité 3' du gène codant l'ARNt^{Lys} des souches séquencées de *S. agalactiae* d'origine humaine: A909 (IME), NEM316 (CIME), H36B (CIME) et sur l'élément de la souche CJB111 (Tableau 9). Chez ces souches, les gènes sont identiques entre eux. Le gène codant la protéine de la famille ESAT-6 codé par ICE_*SUB19608_tRNA*^{Lys} présente 95 % d'identité avec ceux codés par les IME et CIME chez *S. agalactiae*.

Les souches de *S. agalactiae* qui possèdent des ICE à ce locus ne possèdent pas ce gène au sein de celui-ci. Néanmoins, des homologues de cette protéine sont présents sur tous les îlots génétiques intégrés au site d'intégration correspondant au gène *rpsI* des souches de *S. agalactiae* dont les séquences sont disponibles [40] (Tableau 9). Tous les gènes intégrés au niveau du locus *rpsI*, qui codent ces protéines, présentent 94 % d'identité avec ceux intégrés à l'extrémité 3' du gène codant l'ARNt Lysine.

Tableau 9. Gènes codant les protéines de la famille ESAT-6 chez des souches séquencées de *S. agalactiae.*

Le nom des gènes codant des protéines de la famille ESAT-6 chez différentes souches de S. agalactiae *ainsi que leur site d'intégration sont indiqués.*

	Localisation		
	Chromosomique	Elément génétique mobile	
		Locus *rpsI*	Locus tRNA^{Lys}
18RS21	SAJ_1078	SAJ_0309	
515	SAL_1145	SAL_0265	
2603 V/R	SAG1039	SAG0230	
A909	SAK_1128 et SAK_1129	SAK_0290	SAK_1956
NEM316	GBS1074	GBS0223	GBS1979
H36B	SAI_1115 et SAI_1116	SAI_0230	SAI_2308
CJB111	SAM_1055 et SAM_1056	SAM_0231	SAM_1929

Par ailleurs, des gènes homologues sont également présents sur des régions ne correspondant à aucun élément génétique mobile (Tableau 9). Les souches 18RS21, 515, 2603 V/R et NEM316 possèdent un gène homologue tandis que les souches A909, H36B et CJB111 possèdent deux gènes homologues. De manière très intéressante, les deux gènes homologues de chacune des souches A909, H36B et CJB111 sont adjacents et présentent une identité très forte ce qui suggère un évènement de duplication de gènes. Les gènes homologues codant des protéines de la famille ESAT-6 qui ne sont pas intégrés au sein d'un îlot génomique présentent tous approximativement 85 % d'identité avec ceux intégrés au locus *rpsI*.

Les protéines de la famille ESAT-6 sont donc prévalentes chez *S. agalactiae* et les ICE de la famille d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} ont pu contribuer à leur dissémination, notamment chez *S. uberis*.

Les séquençages visant à permettre d'obtenir la séquence complète de l'ICE_*SUB19608_tRNA*^{Lys} vont être poursuivis afin de déterminer la présence éventuelle d'autres gènes codant des fonctions d'intérêt (adaptation et/ou virulence).

2. Recherche de réaction synergique type CAMP II chez des souches de streptocoques d'origine vétérinaire

La propriété co-hémolytique conférée par ICE_*515_tRNA*^{Lys}, plus facilement détectable que les autres fonctions codées par l'élément, a été utilisée pour la suite de l'évaluation du transfert inter-espèces des ICE de la famille d'ICE_*515_tRNA*^{Lys}. Ainsi, une large collection de streptocoques d'origine vétérinaire a été étudiée afin d'examiner la capacité des souches à générer une réaction co-hémolytique de type CAMP avec *S. aureus*. Cette collection a inclu des souches de *S. uberis* (n=449), *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (n=162), *S. bovis* (n=31), *S. suis* (n=26) et *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (n=9). Les souches sont toutes issues du réseau national d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance chez les animaux en France (RESAPATH) mises en collection à l'ANSES de Lyon. La plupart d'entre

elles, notamment les souches de *S. uberis* et *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, sont des souches infectieuses issues de mammites bovines.

Vingt-trois souches, soit 3,4 % des souches totales de la collection étudiée, présentent un phénotype CAMP positif dont vingt souches de *S. uberis* (4,4 %), une souche de *S. bovis* (3,2 %), une souche de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (11,1 %) et une souche de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (0.6 %) (Tableau 5, page 101). Les souches de streptocoques CAMP positives ont été collectées à travers 11 départements français entre 1984 et 2010 (Figure 53). Les souches ont été principalement isolées de bovins d'une région au Nord Ouest de la France et de l'Est.

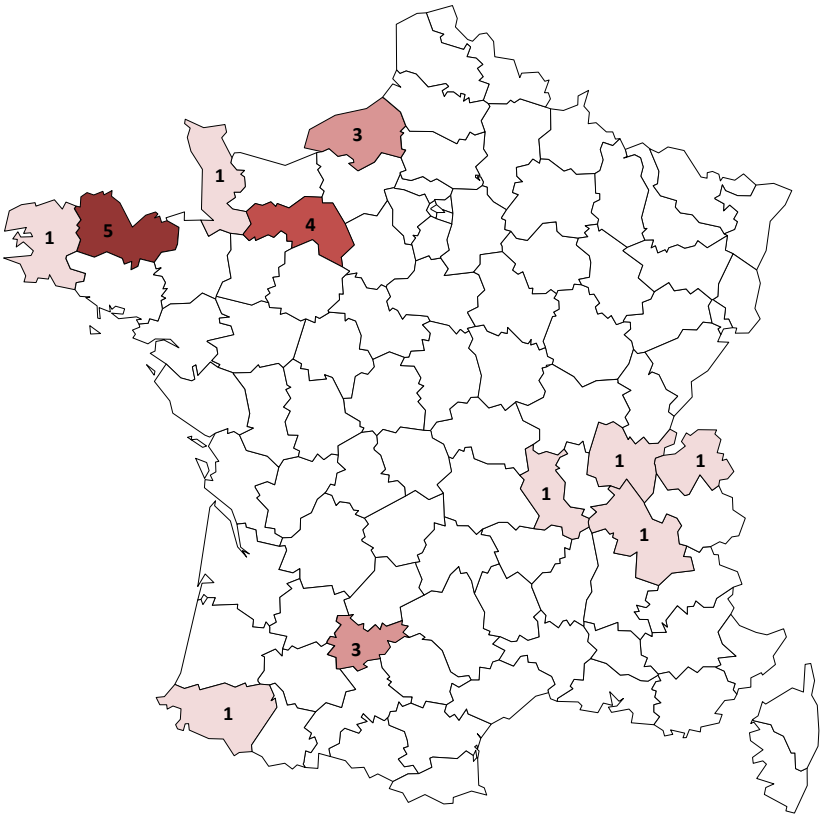


Figure 53. Origine des isolements en France des streptocoques présentant une réaction synergique co-hémolytique de type CAMP.

Carte de France permettant de visualiser la localisation de l'isolement des streptocoques CAMP positifs. Les numéros indiquent le nombre de souches CAMP positives prélevées dans le département.

3. Détection du gène codant le facteur CAMP II chez les souches de terrain

Les gènes codant les facteurs responsables de la réaction co-hémolytique chez les souches de terrain ont été recherchés par PCR en utilisant des amorces conçues à partir des séquences du gène SAL_2074 codant le facteur CAMP II (CAMP factor II *Bam*HI Fwd et CAMP factor II *Nsi*I Rev) (Tableau 6, page 107). Une amplification positive a été observée pour la souche 7434 de *S. bovis* et la souche 20591 de *S. dysgalactiae* subsp*. equisimilis* (Tableau 5, page 101). Les produits PCR obtenus à partir de l'ADN génomique des souches de *S. bovis* et *S. dysgalactiae* subsp*. equisimilis* ont été séquencés. L'analyse des séquençages a révélé une très forte identité nucléotidique (supérieure à 96 %) entre les gènes codant les facteurs CAMP de ces souches et le gène codant le facteur CAMP II présent sur ICE*_515_tRNA*^{Lys}.

Afin de caractériser les facteurs CAMP produits par les souches de terrain d'origine vétérinaire de *S. uberis* et *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, des amplifications d'ADN ont été effectuées en utilisant des amorces conçues à partir de la séquence du facteur Uberis produit par quelques souches de *S. uberis* déjà décrites. Toutes les souches de *S. uberis* testées (n=20) ont présenté un signal d'amplification positif. Les amplifiats ont été séquencés pour dix souches choisies aléatoirement et les séquences obtenues ont montré que les facteurs produits par les souches de terrain de *S. uberis* étaient similaires au facteur Uberis déjà décrit (identité nucléotidique supérieure à 97 %).

Il est à noter que, dans cette étude, seul le facteur produit par *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* n'a pas pu être caractérisé. La conception de nouvelles amorces ou la réalisation d'une banque d'ADN pourrait permettre de caractériser le gène responsable de la réaction co-hémolytique chez *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Des facteurs type CAMP ont déjà été décrits chez d'autres streptocoques comme *S. pyogenes*, *S. uberis*, *S. porcinus* et *S. canis*. Des BLAST protéiques indiquent que ces homologues présentent des homologies significatives avec le facteur CAMP de *S. agalactiae* (de 34 à 99 %). Néanmoins, ces travaux suggèrent une dissémination plus large que

considérée jusqu'alors des facteurs CAMP parmi les streptocoques puisque ceci est la première description chez *S. bovis* et *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Par ailleurs, *S. bovis* est une espèce décrite comme n'ayant pas la capacité de lyser les érythrocytes. L'acquisition du facteur CAMP par une nouvelle espèce comme *S. bovis* pourrait lui permettre d'acquérir du fer environnemental par le biais de la réaction co-hémolytique, de mettre en place un métabolisme respiratoire et de s'adapter à de nouveaux environnements.

4. Fonctionnalité du facteur CAMP II chez des streptocoques de terrain

Puisque les transferts inter-espèces se produisent dans les habitats naturels, de tels évènements ayant été détectés chez des souches de *S. uberis* et *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, [161], le facteur CAMP II pourrait conférer des propriétés co-hémolytiques à des souches pathogènes ne possédant pas encore de facteur CAMP si ICE_*515_tRNA*^{Lys} était transféré. Afin de vérifier cette hypothèse, des souches de terrain du réseau RESAPATH ont été examinées pour leur capacité d'acquérir une telle fonction.

Dans cet objectif, le vecteur pOri23 permettant l'expression du gène SAL_2074 codant le facteur CAMP II sous le contrôle du promoteur P23 a été transféré par électroporation chez les souches *S. bovis* 1052 et *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* 593 qui ne présentaient pas de réaction synergique type CAMP lors des criblages des souches de la collection du RESAPATH (Tableau 5, page 101). Le phénotype hémolytique des deux transformants obtenus a été évalué par des tests CAMP. Une zone d'hémolyse synergique caractéristique similaire à celle observée pour la souche témoin *S. agalactiae* 515 a été observée pour chacun des deux transformants en comparaison des souches sauvages (Figure 54A). Ce résultat a été confirmé par une mesure de l'activité co-hémolytique en microplaques (Figure 54B).

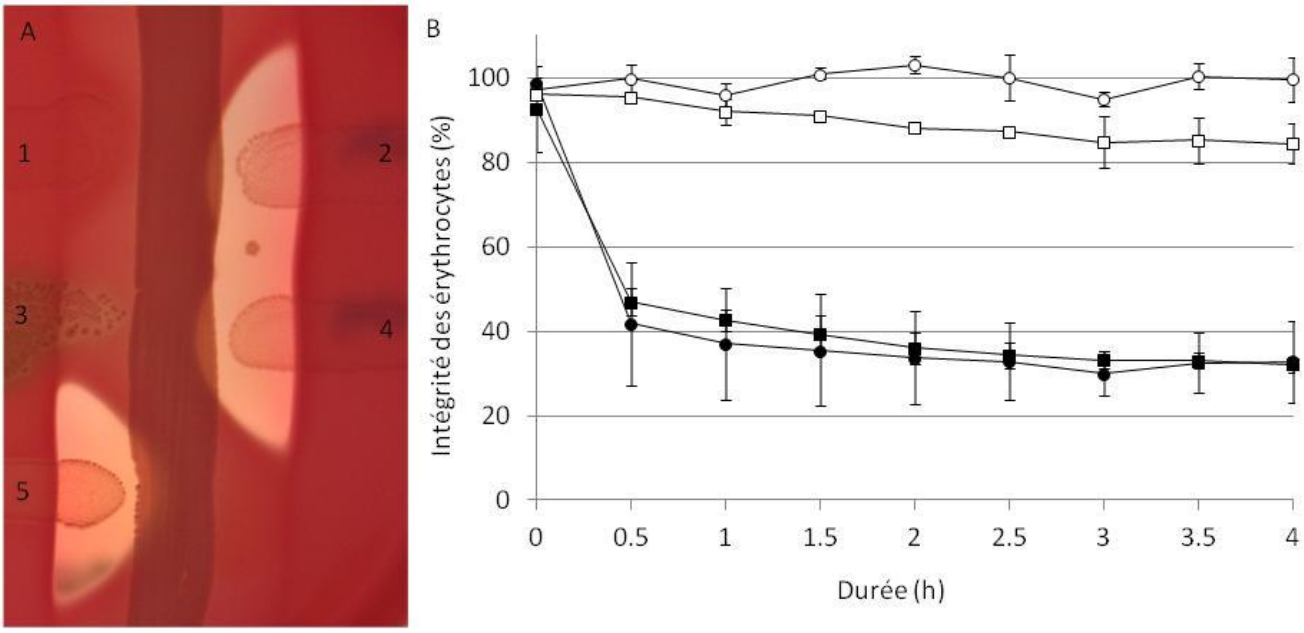


Figure 54. Expression du facteur CAMP II chez des streptocoques pathogènes.

A. Tests CAMP à partir des cultures des souches S. bovis *1052 (pOri23) (1),* S. bovis *1052 (pOri23-camp^{515}) (2),* S. dysgalactiae *subsp.* dysgalactiae *593 (pOri23) (3),* S. dysgalactiae *subsp.* dysgalactiae *593 (pOri23-camp^{515}) (4) et* S. agalactiae *515 (contrôle positif) (5).*

B. Mesure de l'activité co-hémolytique des souches de S. bovis *1052 wt (cercles pleins avec pOri23-camp^{515} et cercles vides sans l'insert) et de* S. dysgalactiae *subsp.* dysgalactiae *593 (cercles pleins avec pOri23-camp^{515} et cercles vides sans l'insert). La perte d'intégrité des érythrocytes due à l'activité du facteur CAMP II a été évaluée par des mesures spectrophotométriques à une DO de 630 nm toutes les 30 minutes en utilisant un lecteur de microplaques (Biotek). L'expérience a été réalisée en triplicat en utilisant trois échantillons biologiques indépendants. Des contrôles ont été effectués sans prétraitement à la sphingomyélinase.*

Pris collectivement, ces résultats confirment la fonctionnalité du facteur CAMP. Etant donné le protocole mis au point (utilisation uniquement du surnageant pour les titrations co-hémolytiques), ces résultats confirment également que le facteur CAMP II peut être produit et sécrété par *S. bovis* et *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

5. Présence d'éléments intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARNt Lysine chez les souches de terrain CAMP positives

*5.1. Recherche de l'intégrase des ICE de la famille d'ICE*_515_tRNA^{Lys}

Une recherche d'éléments génétiques intégrés à l'extrémité 3' du gène codant l'ARNt Lysine (anticodon CTT) a été réalisée pour les souches de streptocoques de terrain présentant un phénotype CAMP positif afin de déterminer une éventuelle corrélation entre le portage de gènes codant un facteur CAMP et la présence d'éléments génétiques intégratifs et conjugatifs à ce locus. Par conséquent, la présence de gènes codant des intégrases a été recherchée chez ces souches. Dans cette optique, des amorces ont été conçues à partir des séquences des intégrases portées par ICE_*515_tRNA^{Lys}* et ICE_*SUB19608_tRNA^{Lys}* et ont été utilisées pour des PCR utilisant comme matrice l'ADN génomique total extrait des souches de terrain (Tableau 5, page 101). Les amorces conçues à partir d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* sont ICE_*515_tRNA^{Lys}* integrase Fwd et Rev tandis que celles conçues à partir de la séquence d'ICE_*SUB19608_tRNA^{Lys}* sont listées comme ICE_*SUB19608_tRNA^{Lys}* integrase Fwd et Rev (Tableau 6, page 107).

Vingt et une souche sur les vingt trois souches examinées possèdent une intégrase similaire à celle d'ICE_*SUB19608_tRNA^{Lys}* (Tableau 10). Les souches positives portant l'intégrase incluent les souches de *S. bovis* 7434, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 20591 *et S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* 24084. Seules les amplifications réalisées à partir de l'ADN génomique des souches 21459 et 22492 de *S. uberis* n'ont pas présenté de signal positif d'amplification dans les conditions testées.

Tableau 10. Résultats des amplifications par polymérase en chaine obtenus en vue de l'évaluation de la dissémination des fonctions conférées par ICE_*515_tRNA*^{Lys}.

Les PCR ont été réalisées dans des conditions standards à partir de l'ADN génomique extrait des souches de streptocoques de terrain. Un signe « + » signifie la présence du gène chez la souche correspondante et un signe « - » signifie l'absence de ce gène.

		Intégrase ICE_*515_tRNA* ^{Lys}	Intégrase ICE_*SUB19608_tRNA* ^{Lys}	Site *att* R ICE_*515_tRNA* ^{Lys}	Facteur CAMP, SAL_2074	Facteur Uberis, U34322.1	Protéine NRAMP, SAL_2078	Peptide antimicrobien, SAN_2147	Toxine du système TA, SAL_2044	Protéine de surface, SAL_2057
S. uberis	21639	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	21457	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	21459	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	21468	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	21512	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	22492	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	19827	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	19843	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	19908	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	19909	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	1352	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	1825	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	11535	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	12538	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	19623	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	20576	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	20965	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	19168	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	20222	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	16193	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	19608	-	+	+	-	+	-	-	-	-
S. bovis	7434	-	+	+	+	-	-	+	-	+
S. equisimilis	20591	-	+	+	+	-	-	-	-	-

*5.2. Recherche du site de recombinaison droit (*attR*) des ICE de la famille d'ICE*_515_tRNA^{Lys}

Afin de confirmer la présence d'un gène codant une intégrase à proximité du gène codant l'ARNt Lysine, des amplifications supplémentaires ont été réalisées. Ainsi, une amorce a été conçue pour s'hybrider sur le gène codant l'ARNt Lysine (tRNA^{Lys} AAA Rev) (Tableau 6, page 107). Le couple d'amorces « ICE_*SUB19608_tRNA^{Lys}* integrase Fwd » et « tRNA^{Lys} AAA Rev » permet d'amplifier la région intergénique putative située entre le gène codant l'intégrase et le gène codant l'ARNt Lysine. Cette région intergénique doit comprendre le site de recombinaison droit (*attR*) de l'élément s'il y a présence d'un élément génétique mobile (Figure 55).

Des signaux d'amplification positifs de taille attendue par rapport au contrôle positif (souche *S. agalactiae* 515) ont été obtenus pour 17 des 23 souches testées dont *S. bovis* 7434 et *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 20591 (Tableau 10). Afin de confirmer la présence du site *attR*, les produits PCR obtenus ont été séquencés. L'analyse des séquences a permis de déterminer la présence d'un site *attR* de séquence très proche de celui d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* pour 15 des 17 souches dont *S. bovis* 7434. Les sites *attR* de ces souches présentent ainsi de 78 à 86 % d'identité par rapport au site de recombinaison d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* (Tableau 11, page 194). Les séquences des régions intergéniques des souches *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 20591 et *S. uberis* 20222 sont celles qui diffèrent le plus de celle de la souche *S. agalactiae* 515 (Figure 56, page 195).

De manière notable, les essais d'amplification à partir de l'ADN génomique de la souche *S. uberis* 21459 n'ont pas permis d'amplifier le gène codant l'intégrase mais une amplification du site *attR* a été obtenue. Ceci pourrait s'expliquer par une divergence de la séquence du gène codant l'intégrase ne permettant pas l'hybridation de l'amorce ICE_*SUB19608_tRNA^{Lys}* Rev.

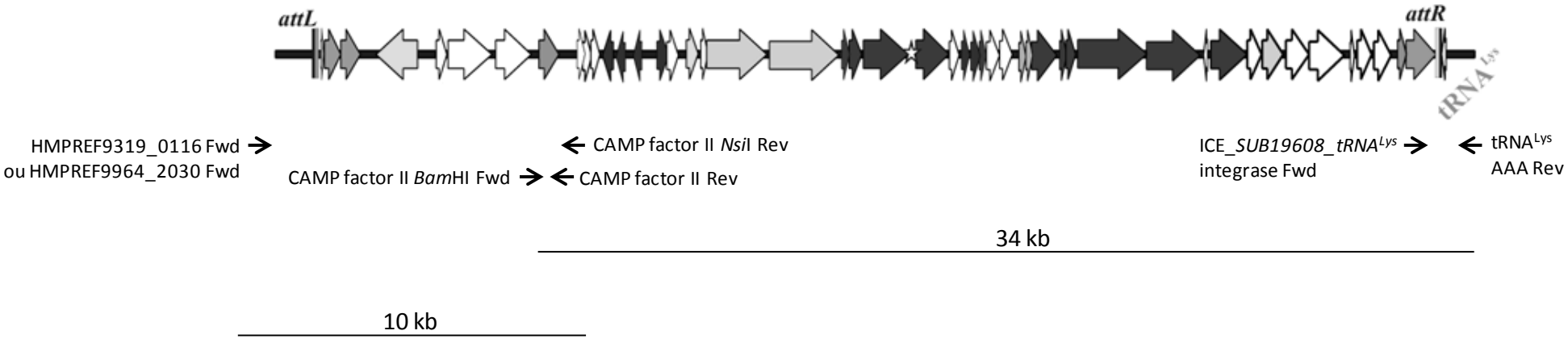


Figure 55. Emplacement sur ICE_*515_tRNA^{Lys}* des amorces utilisées dans la détection des sites de recombinaison *attR* des éléments intégrés chez les souches de terrain, des PCR « long range » et des PCR nichées.

Par ailleurs, les souches 21457, 21468, 19908 et 19909 de *S. uberis* possèdent un gène codant l'intégrase mais aucune amplification de la région intergénique entre l'intégrase et l'ARNt^{Lys} n'a pu être visualisée dans les conditions testées. Les amorces utilisées dans ces travaux étant très spécifiques, elles ne permettent donc peut-être pas l'amplification de séquences un peu plus divergentes.

Tableau 11. Identité de séquences entre les sites de recombinaison *attR* des souches de terrain et celui d'ICE_*515_tRNA^{Lys}*.

Le pourcentage d'identité de séquence et le pourcentage de couverture des séquences des sites attR *des souches de terrain et le site* attR *d'ICE*_515_tRNA^{Lys} *ont été obtenus en alignant les séquences par BLAST (bl2seq).*

Souches	Identité de séquences	Couverture de la séquence
S. uberis 21639	85%	100%
S. uberis 21459	85%	100%
S. uberis 21512	85%	100%
S. uberis 19827	85%	100%
S. uberis 19843	82%	100%
S. uberis 1352	85%	100%
S. uberis 1825	85%	100%
S. uberis 11535	85%	100%
S. uberis 12538	85%	100%
S. uberis 19623	78%	79%
S. uberis 20576	85%	100%
S. uberis 20965	86%	86%
S. uberis 19168	82%	85%
S. uberis 20222	69%	90%
S. uberis 16193	85%	100%
S. bovis 7434	85%	100%
S. equisimilis 20591	54%	70%

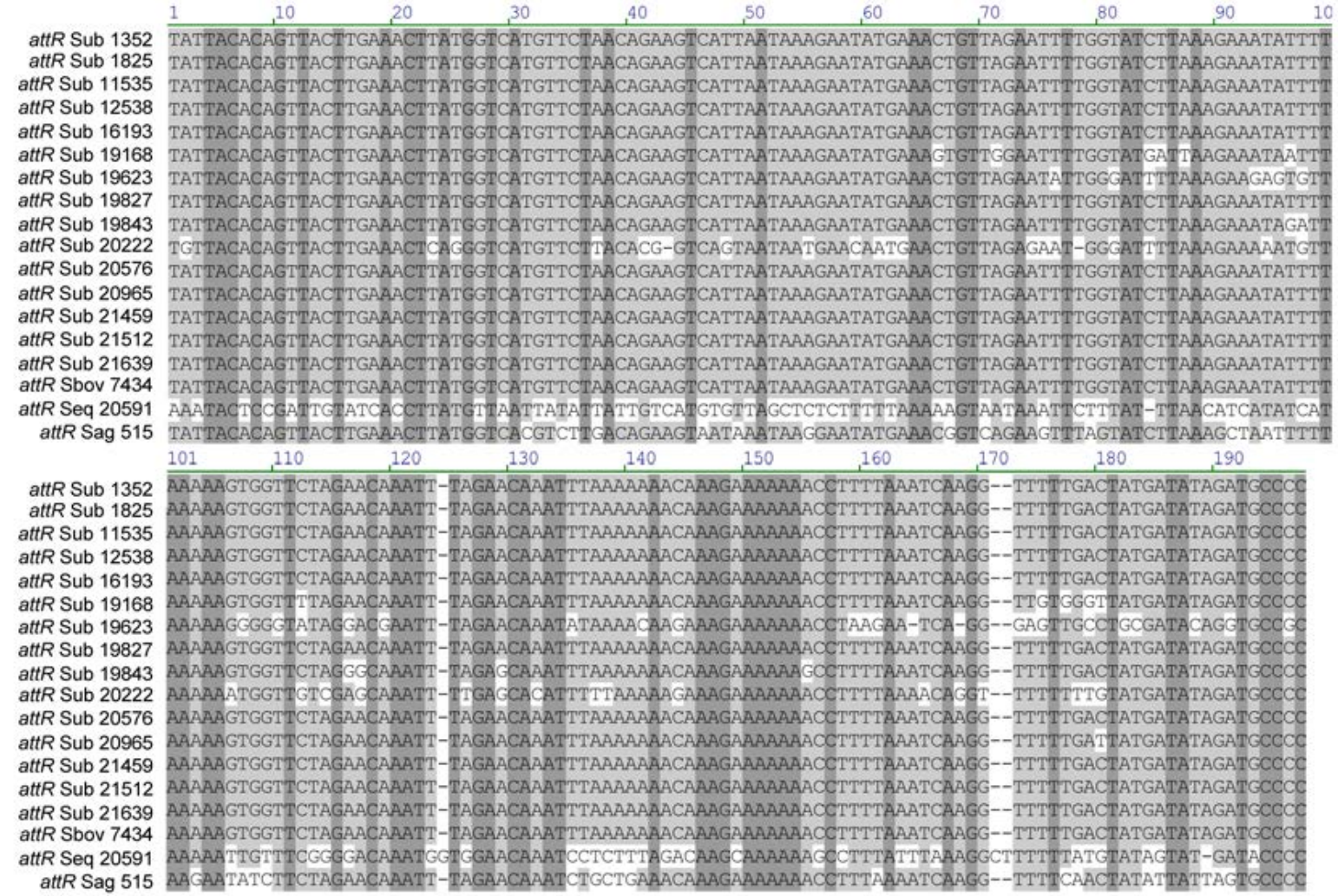


Figure 56. Alignement avec le site *attR* d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} des séquences des sites *attR* présents à l'extrémité 3' des gènes codant des ARNt Lysine chez les souches de streptocoques isolés du RESAPATH présentant un phénotype CAMP positif.

L'alignement a été réalisé en utilisant le logiciel Vector NTI (InVitrogen).

6. Corrélation entre la présence du gène codant le facteur CAMP II et la présence d'ICE ou d'éléments similaires chez les souches de terrain

La prospection de la collection de souches de différentes espèces de streptocoques ayant révélé que certaines souches possédaient un facteur CAMP II mais également des éléments indiquant qu'elles possédaient un élément intégré à l'extrémité 3' du gène codant un ARNt Lysine (gène codant l'intégrase et/ou site *attR*), nous avons voulu déterminer s'il existait une corrélation entre la présence du gène codant le facteur CAMP II et d'éléments intégrés à ce locus. Pour ceci, les cibles ont été les éléments intégrés chez les souches *S. bovis* 7434 et *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 20591.

Afin d'établir une relation entre le portage d'ICE ou d'éléments similaires et la présence du gène SAL_2074 (facteur CAMP II), des PCR permettant d'amplifier des fragments d'ADN plus larges ont été réalisées. Afin d'obtenir la position des gènes SAL_2074 par rapport au gène codant l'ARNt Lysine, des PCR permettant l'amplification de grands fragments (PCR « long range ») ont été entreprises afin d'amplifier la région génomique située entre les gènes codant l'ARNt Lysine et les facteurs CAMP II présents chez *S. bovis* et *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (Figure 55, page 193). Malgré de nombreuses tentatives, cette région n'a pas pu être amplifiée. Il est à noter que chez la souche 515 de *S. agalactiae*, cette région a une longueur de plus de 34 kb ce qui pourrait expliquer la difficulté à amplifier un fragment d'une taille si importante chez les souches de terrain (Figure 55, page 193).

Afin de surmonter cette difficulté, d'autres PCR « long range » ont été réalisées en utilisant une amorce s'hybridant dans le gène situé à l'extrémité 5' de l'élément intégré (HMPREF9319_0116 Fwd pour la souche de *S. bovis* 7434 ou HMPREF9964_2030 Fwd pour la souche de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 20591) et une amorce s'hybridant au niveau du gène SAL_2074 (CAMP factor II *Nsi*I Rev pour les deux souches) (Tableau 6, page 107). Des amplifiats d'environ 10 kb ont été obtenus pour chacune des deux souches de streptocoques. Chez la souche *S. agalactiae* 515, cette région a également une taille d'environ 10 kb (Figure 55, page 193).

Dans le but de confirmer la correspondance de l'amplifiat avec la région d'intérêt et ôter tout doute d'aspécifité d'amplification, des PCR nichées ont été réalisées en utilisant les produits d'amplification des PCR « long range » comme matrice. Les amorces utilisées pour les PCR nichées sont les amorces permettant d'amplifier le gène SAL_2074 (CAMP factor II *Bam*HI Fwd et CAMP factor II Rev) (Tableau 6, Figure 107). Celles-ci ont confirmé la présence du gène SAL_2074 au sein du produit d'amplification des PCR « long range ». Par conséquent, ceci signifie que les gènes codant les facteurs CAMP II de *S. bovis* et *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* sont localisés sur un élément génétique intégré à l'extrémité 3' du gène codant un ARNt Lysine.

Ainsi, les deux tiers des souches produisant un facteur type CAMP II portent un élément intégré à l'extrémité 3' du gène codant un ARNt Lysine. Cette corrélation suggère que la dissémination du gène codant le facteur CAMP II chez différentes espèces de streptocoques est liée au transfert de l'ICE portant ce gène.

7. Recherche d'autres fonctions disséminées par ICE *515 tRNA^{Lys}* chez les streptocoques

Les gènes codant d'autres fonctions que des propriétés co-hémolytiques conférées par ICE_*515_tRNA^{Lys}* ont été recherchés chez les souches présentant un phénotype CAMP positif. Cette recherche a été mise en place à l'aide d'amplifications par PCR en utilisant des amorces spécifiques des gènes SAL_2078, SAN_2147, SAL_2044 et SAL_2057 codant respectivement la protéine de type NRAMP, le peptide antimicrobien, la toxine du système toxine-antitoxine et une des protéines de surface (Tableau 6, page 107). SAL_2057 a été choisi par rapport à SAL_2056 car elle présente moins de variabilité d'une souche à une autre de *S. agalactiae* mais également moins de variabilité entre celle codée par l'ICE

présent chez la souche 515 de *S. agalactiae* et celle codée par l'élément de la souche de *S. urinalis* 2285-97.

Cette analyse a révélé que la souche *S. uberis* 21457 possède un gène homologue à SAL_2044 (toxine du système toxine/antitoxine putatif) et que la souche *S. bovis* 7434 possède des gènes dont des régions sont homologues à SAN_2147 (peptide) et SAL_2057 (protéine de surface) (Tableau 10).

Pour conclure, en plus du facteur CAMP II, d'autres gènes de l'ICE ont été détectés chez les streptocoques. Cependant, seules les souches présentant un phénotype CAMP positif ont été examinées vis-à-vis de la présence dans leur génome de gènes initialement décrits chez ICE_*515_tRNA*^{Lys}. Par conséquent, les gènes codant des fonctions de virulence et/ou d'adaptation de l'élément pourraient être bien plus répandus que ces travaux ne l'indiquent déjà.

DISCUSSION et PERSPECTIVES

I. ICE *515 tRNA^{Lys}*, vecteur de virulence ?

L'étude des fonctions portées par ICE_*515_tRNA^{Lys}* a permis de mettre en évidence plusieurs gènes qui confèrent un phénotype particulier à la souche hôte dont un facteur CAMP et des protéines de surface. Ces fonctions jouent un rôle dans la virulence et pourraient être à l'origine de l'émergence de nouvelles bactéries pathogènes suite au transfert de l'ICE.

1. Rôle des protéines de surface codées par ICE_*515_tRNA^{Lys}*

*1.1. Présence de plusieurs gènes portés par ICE*_515_tRNA^{Lys} *codant des protéines de surface*

Cette étude a débuté par la mise en évidence de trois gènes codant des protéines de surface chez les ICE appartenant à la famille d'ICE_*515_tRNA^{Lys}*, et notamment un gène codant un antigène I/II putatif. La caractérisation des phénotypes conférés par les protéines de surface codées par l'ICE est donc apparue comme essentielle pour évaluer l'impact de leur dissémination sur la virulence des streptocoques. Les résultats obtenus à l'issue de ces travaux ont montré qu'ICE_*515_tRNA^{Lys}* a une influence sur l'architecture des biofilms formés et confère des propriétés d'adhésion au fibrinogène d'origine humain. Ces propriétés sont conférées en partie par la protéine SAL_2056 codée par l'ICE. D'autre part, SAL_2056 est une protéine qui lie la fibronectine d'origine humaine.

L'étude fonctionnelle et structurale des protéines de surface produites par les streptocoques est essentielle dans la compréhension de leur mécanisme de virulence. De plus, l'obtention d'informations supplémentaires sur la structure moléculaire des adhésines pourrait permettre la recherche de nouveaux modèles vaccinaux, d'anticorps recombinants et d'antagonistes à l'adhésion afin de prévenir les infections liées aux streptocoques. En particulier, pour lutter contre *S. mutans*, les stratégies de recherche de vaccins les plus

prometteuses passent par l'utilisation de peptides dérivés de protéines liant le glucane (GbpB pour Glucan-binding protein B) et des antigènes de type I/II [35].

*1.2. Répartition des gènes d'ICE*_515_tRNA^{Lys} *codant des protéines de surface chez les autres souches de* S. agalactiae

Contrairement aux protéines de la famille Alp, aux protéines Srr, FbsA, FbsB et HgvA, la présence des gènes d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* codant les protéines de surface n'est pas dépendante du sérotype capsulaire ni du type MLST des souches de *S. agalactiae* [242, 336, 358, 396]. En effet, les gènes SAL_2056 et SAL_2036 sont présents à la fois chez des souches appartenant au sérotype capsulaire Ia, II, III et V et aux complexes clonaux ST17, ST19, ST23, ST67 ou ST110 (respectivement les souches COH1, 18RS21, 515, FSL S3-026 et 2603 V/R). Le gène SAL_2057 est quant à lui retrouvé chez les souches 515 et COH1 appartenant également à des sérotypes capsulaires et des complexes clonaux différents de *S. agalactiae*.

Les sérotypes capsulaires et les complexes clonaux ne paraissent donc pas influencer la répartition des gènes codant les protéines de surface d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* et les gènes SAL_2036 et SAL_2056 sont présents sur l'ensemble des ICE des souches séquencées de *S. agalactiae*.

*1.3. Rôle d'ICE*_515_tRNA^{Lys} *et SAL_2056 dans l'agrégation cellulaire ?*

Il a été montré que les protéines de surface jouent un rôle privilégié dans la formation des biofilms [286]. Par ailleurs, ce type d'agrégation cellulaire est un élément majeur permettant d'augmenter le taux des échanges de matériel génétique [6, 308]. Une souche possédant l'ICE a donc été étudiée et l'analyse du phénotype biofilm par une technique de révélation au cristal violet a révélé que la présence d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* était corrélée à une augmentation de la biomasse contenue dans les biofilms formés par la souche hôte. Cette technique a également révélé que, de manière similaire à d'autres

antigènes I/II chez d'autres espèces de streptocoques, cette propriété serait en partie conférée par le gène SAL_2056 codant l'antigène I/II. Néanmoins, l'analyse par microscopie confocale des biofilms n'a pas permis de mettre en évidence de différences entre les volumes des biofilms formés par les souches possédant ou non l'ICE. Par ailleurs, aucune différence de taille des cellules n'a été observée entre les deux souches puisque le nombre d'unités formant des colonies est identique à densité optique équivalente entre la souche possédant l'ICE de celle ne le possédant pas.

La technique de révélation au cristal violet des cellules composant le biofilm a déjà été décriée par certains auteurs qui considèrent cette technique comme semi-quantitative puisque des dépôts de cellules planctoniques agrégées peuvent être pris en compte dans les résultats obtenus [375]. Néanmoins, ces auteurs considèrent que l'étude par microscopie confocale à balayage révèle plus l'architecture des biofilms qu'elle ne permet de quantifier la biomasse [375]. La réalisation des deux techniques en parallèle paraît alors nécessaire pour une évaluation fine de la formation des biofilms par les souches étudiées [375]. Dans notre cas, ICE_*515_tRNA*^{Lys} pourrait produire des protéines permettant l'agrégation cellulaire (SAL_2036, SAL_2056 et SAL_2057), ce qui conduirait à une augmentation du dépôt de cellules planctoniques par force gravitationnelle et permettrait d'expliquer l'absence de concordance entre les résultats obtenus avec les deux techniques.

*1.4. ICE*_515_tRNA^{Lys} *et l'adhésion à des composants de la matrice extracellulaire*

De nombreuses études ont montré que l'adhésion aux cellules épithéliales est souvent reliée à la capacité des souches à adhérer à des composants de la matrice extracellulaire [242, 286]. Les protéines majeures de la matrice extracellulaire étant le collagène, le fibrinogène et la fibronectine, l'adhésion à ces composants de la souche chez laquelle ICE_*515_tRNA*^{Lys} a été transféré a été examinée. Les résultats montrent que, comme

d'autres souches de *S. agalactiae* déjà décrites, la souche étudiée adhère peu voire pas du tout collagène (données non montrées) [104]. Par ailleurs, des études antérieures ont déjà dévoilé la capacité de *S. agalactiae* à adhérer au fibrinogène et à la fibronectine. Plusieures protéines de surface de *S. agalactiae* qui lient ces protéines ont été décrites. Les souches 515 et NEM316 de *S. agalactiae* possèdent les protéines FbsA, FbsB, GADPH, CspA et la peptidase C5a, lesquelles sont capables d'interagir avec le fibrinogène et/ou avec la fibronectine [96, 114, 298, 310, 355]. Les travaux réalisés au cours de cette thèse dévoilent une nouvelle protéine produite par certaines souches de *S. agalactiae* ayant des propriétés identiques. En effet, SAL_2056, qui appartiendrait à la famille des antigènes I/II, confère un pouvoir d'adhésion au fibrinogène et la fibronectine. La contribution de SAL_2056 dans l'adhésion à la fibronectine est majeure tandis que sa contribution à l'adhésion au fibrinogène est mineure. En effet, les résultats ont montré qu'elle ne participe que partiellement au phénotype d'adhésion au fibrinogène conféré par l'ICE complet. L'étude se poursuivra par la caractérisation du (ou des) autre(s) élément(s) permettant de rendre compte de l'intégralité du phénotype d'adhésion au fibrinogène observé quand une souche possède ICE_*515_tRNA*^{Lys}.

L'absence de différence significative dans l'adhésion à la fibronectine de *S. agalactiae* par l'intermédiaire d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} pourrait être liée à la quantité des autres protéines de surface produites par *S. agalactiae*. La fonction de l'une des protéines de surface pourrait être ainsi substituée par une autre ayant un rôle similaire. Pour cette raison, l'utilisation d'espèces bactériennes hôtes comme moyen d'expression des protéines d'intérêt paraît indispensable pour une meilleure compréhension de l'ensemble des mécanismes de virulence des bactéries, dont *S. agalactiae*. Ces travaux confirment une nouvelle fois que *L. lactis* est un modèle idéal d'étude pour les protéines sécrétées ou exposées à la surface des bactéries à coloration Gram positive. En effet, cette espèce possède la machinerie qui permet la sécrétion et l'ancrage des protéines extracellulaires au sein de la paroi tout en produisant elle-même très peu de ce type de protéines [277, 312, 368].

Une nouvelle protéine de surface adhésive codée par ICE_*515_tRNA*^{Lys} a été décrite lors de ces travaux. Elle possède différentes propriétés adhésives qui pourraient impliquer les domaines fonctionnels identifiés lors de l'analyse *in silico* (page 143). Il serait très intéressant de produire des protéines recombinantes dépourvues de ces domaines afin de déterminer les régions protéiques impliquées dans l'adhésion. Notamment, les deux répétitions directes de 24 acides aminés et la répétition imparfaite de 12 acides aminés pourraient avoir un rôle important dans les propriétés d'adhésion conférées par la protéine. Par conséquent, il paraît important de réaliser une construction permettant l'expression d'une protéine recombinante de SAL_2056 dépourvue de ces répétitions chez *Lactococcus lactis* et d'analyser le phénotype de cette souche dans les mêmes conditions que les expériences menées durant ces travaux en comparaison de la souche produisant la protéine SAL_2056 dans son intégralité.

Par ailleurs, ces travaux complètent les connaissances sur les antigènes I/II. SAL_2056, contrairement à la majorité des protéines de cette famille, ne confère pas de pouvoir adhésif aux protéines salivaires. Les antigènes I/II ont été initialement décrits dans la littérature chez des streptocoques oraux. La particularité de SAL_2056 pourrait être en partie due au fait que l'adhésion à ce type de protéine n'est pas essentielle à la survie de *S. agalactiae* et que la protéine de surface a évolué en fonction des besoins adaptatifs de la bactérie.

D'une part, la protéine homologue à SAL_2056 codée par l'ICE de *S. urinalis* ne présente que 63 % d'identité protéique avec cette dernière alors que les autres gènes des ICE codent des protéines presque identiques. Le transfert entre la souche de *S. urinalis* et *S. agalactiae* paraît récent au vu des identités de séquences observées pour les autres gènes présents chez ces ICE. Néanmoins, les gènes codant les antigènes I/II de ces espèces paraissent avoir divergé très rapidement en comparaison des autres fonctions. Ceci suggère que les protéines de surface codées par les ICE de la famille d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} sont plus soumises à la divergence due à leur environnement en fonction des espèces pathogènes et de leurs hôtes privilégiés que les autres fonctions codées par l'ICE.

Les ICE de la famille d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} sont présents chez des streptocoques issus d'hôtes divers. La protéine FbsB issue d'un isolat humain de *S. agalactiae* est capable d'adhérer aussi bien à du fibrinogène humain qu'à du fibrinogène isolé de bovin [96]. FbsB et ces deux types de fibrinogène interagissent par l'intermédiaire de deux régions différentes de la protéine bactérienne [96]. Il serait alors très intéressant d'étudier la capacité d'adhésion des protéines de surface codées par l'ICE à des protéines de la matrice extracellulaire isolées d'autres mammifères comme les chevaux ou les bovins. La dissémination de propriétés conférant l'habilité à réussir cette première étape de la colonisation chez différents hôtes pourrait engendrer des problèmes sanitaires au niveau humain et vétérinaire. Une étude plus approfondie des mécanismes par lequel ICE_*515_tRNA*^{Lys} confère des propriétés d'adhésion est donc nécessaire.

*1.5. Rôle des autres protéines de surface codées par ICE*_515_tRNA^{Lys} : *implication dans l'adhésion et le transfert conjugatif?*

Les résultats des expériences réalisées suggèrent que SAL_2056 n'est pas la seule protéine codée par ICE_*515_tRNA*^{Lys} pouvant conférer des propriétés d'adhésion à *S. agalactiae*. En effet, la production de SAL_2056 seule n'est pas suffisante pour observer le même phénotype que lorsqu'ICE_*515_tRNA*^{Lys} est complet. Deux autres gènes (SAL_2057 et SAL_2036) codant des protéines à motif LPxTG sont également présents sur l'ICE et pourraient participer aux phénotypes observés.

Le gène SAL_2057 est adjacent au gène SAL_2056. L'analyse des promoteurs a suggéré que ces deux gènes sont co-transcrits. Cette hypothèse reste à être confirmée. De plus, la protéine SAL_2057 possède un domaine peptidase C39A putatif qui pourrait être impliqué dans la maturation d'une bactériocine ou d'une phéromone et/ou dans le mécanisme d'exclusion de surface lors de la conjugaison entre deux bactéries [111].

L'exclusion de surface permet de mettre fin au processus de conjugaison, très coûteux en énergie, si la bactérie receveuse possède déjà l'élément génétique mobile.

L'analyse *in silico* a révélé l'association de gènes homologues à SAL_2036, SAL_2056 et SAL_2057 sur d'autres éléments génétiques mobiles. En effet, les gènes *spy1325* et *spy1326* portés par l'ICE RD2 de *S. pyogenes* sont également adjacents et un homologue du gène SAL_2036 est également présent sur cet ICE. De plus, des homologues des gènes SAL_2056 et SAL_2057 sont situés sur les ICE Tn*GBS1* et Tn*GBS2* et les gènes ne sont séparés que par un gène dont la fonction est inconnue mais qui présente une homologie avec le gène SAL_2036 d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} (identité d'environ 30 %).

L'ensemble de ces données suggère que les protéines SAL_2036, SAL_2056 et SAL_2057 pourraient jouer un rôle conjoint dans le transfert conjugatif. La construction d'un vecteur permettant l'expression des deux protéines SAL_2056 et SAL_2057 simultanément a été entreprise. Cette construction permettra d'analyser l'interaction entre ces deux protéines. La réalisation d'une troisième construction en vue de l'expression de SAL_2036 pourrait être intéressante pour une meilleure compréhension de l'interaction probable des trois protéines de surface et de leur éventuelle implication dans le transfert conjugatif de l'ICE.

2. ICE *515 tRNA*^{Lys} et compétitivité de *S. agalactiae*

L'analyse *in silico* avait suggéré la présence de plusieurs gènes pouvant avoir un rôle dans la compétitivité de *S. agalactiae*, notamment dans la réponse à un stress oxydant et dans la production d'une bactériocine.

2.1. Survie face à un stress oxydant

La recherche *in vitro* d'une résistance à un stress oxydant généré par du peroxyde d'hydrogène chez une souche de *S. agalactiae* ayant acquis l'ICE, n'a pas permis de mettre

en évidence de phénotype particulier. Dans les conditions testées, aucun élément ne permet donc de conclure sur le lien entre les gènes SAL_2059 et SAL_2078 et la résistance au stress oxydant qui aurait pu contribuer à la survie de *S. agalactiae* au sein des macrophages. D'autres systèmes pourraient permettre à *S. agalactiae* d'acquérir les métaux divalents nécessaires à l'activité de la superoxyde dismutase et à la réparation de l'ADN suite à l'exposition à des radicaux libres. En effet, une recherche informatique révèle que la souche NEM316 de *S. agalactiae* produit déjà une protéine NRAMP (NP_735216) et également deux thiorédoxines putatives (NP_736339 et NP_734839). De plus, la souche 515 possède également deux gènes codant des transporteurs de métaux divalents putatifs appartenant à la famille des protéines NRAMP (respectivement ZP_00791124 et ZP_00789259). Le rôle de ces protéines n'a pas encore été confirmé expérimentalement.

Chez *S. agalactiae*, aucun effet additionnel de la protéine NRAMP et de la glutarédoxine codées par l'ICE n'est mesurable dans les conditions testées. D'autres substances, comme le paraquat, permettent de générer un stress oxydant et il serait intéressant d'étudier des conditions supplémentaires de survie face à un stress oxydant afin de confirmer les résultats. Par ailleurs, une étude de l'impact de l'acquisition de l'ICE par la souche *S. agalactiae* NEM316 dépourvue des gènes chromosomiques codant les deux transporteurs de métaux divalents et la thioredoxine pourrait être intéressante. Ceci pourrait permettre une caractérisation plus fine de la fonction des deux protéines codées par l'ICE. L'influence de la protéine pourrait également être étudiée par le biais de la production chez un hôte hétérologue non pathogène comme *L. lactis*. Si une différence de survie est notée entre une souche produisant la protéine SAL_2078 de type NRAMP et une souche en étant dépourvue, une approche *in vivo* permettant d'étudier la survie des souches dans des macrophages sera intéressante à tester.

2.2. Compétition inter-espèces

La souche COH1 de *S. agalactiae* a été utilisée afin de tester l'activité antimicrobienne d'un peptide codé par l'ICE. En effet, la souche 515 est dépourvue des deux gènes codant des protéines qui pourraient être impliquées dans la maturation du

peptide (protéase et enzyme de modification). Préalablement, l'analyse des transcrits des gènes a suggéré une augmentation de l'expression du peptide en phase stationnaire de croissance. Une corrélation avec la densité cellulaire pourrait notamment être envisagée. De manière générale, lorsque la densité cellulaire augmente, il est fréquent d'observer une augmentation de la production d'antibiotiques dans un but de compétition entre espèces et une augmentation de la quantité de molécules signal permettant une synchronisation de l'expression des gènes au sein d'une population bactérienne. Il est à noter que les voies de régulation des bactériocines et des molécules impliquées dans le quorum sensing sont similaires et que les protéines possèdent de nombreuses caractéristiques communes [4, 86, 282].

Des zones d'inhibition de croissance ont été recherchées par différentes méthodes en utilisant des souches indicatrices. Néanmoins, les expériences réalisées n'ont pas pu permettre de mettre en évidence d'activité antimicrobienne du peptide SAN_2147 codé par l'ICE. La thèse de la production d'une molécule signal est donc privilégiée. Une des hypothèses serait que cette molécule pourrait intervenir dans la régulation du transfert de l'ICE de manière similaire au peptide signal PhrI codé par ICE*Bs1* chez *B. subtilis*. La régulation de l'excision et du transfert d'ICE*Bs1* est en partie sous le contrôle de PhrI permettant une dissémination productive de l'ICE [5]. Le peptide PhrI inhibe la protéine RapI qui est un activateur de l'excision et du transfert d'ICE*Bs1*. Plus la densité de cellules possédant ICE*Bs1* est élevée, plus PhrI s'accumule dans l'environnement. PhrI est alors internalisé à l'aide d'un transporteur spécifique et le peptide agit comme une molécule signal intracellulaire. Par conséquent, l'excision et le transfert d'ICE*Bs1* sont inhibés lorsque la majorité des cellules environnantes possèdent déjà l'ICE [5]. L'hypothèse d'une implication du peptide SAN_2147 dans la régulation du transfert conjugatif pourrait coincider avec le fait que des homologues du gène SAN_2147 sont présents sur les autres ICE intégrés à l'extrémité 3' du gène codant l'ARNt Lysine (souches 515, 18RS21 et 2603 V/R) mais que le gène est absent chez les éléments ne possédant pas les modules complets permettant la recombinaison, la régulation ou la conjugaison de l'élément (souches A909, NEM316, H36B et CJB111).

2.3. Survie en biofilm

Les observations par microscopie confocale ont montré que l'architecture du biofilm formé par la souche *S. agalactiae* NEM316 était modifiée quand celle-ci avait acquis ICE_*515_tRNA*^{Lys}. En effet, chez la souche ne possédant pas ICE_515_tRNA^{Lys}, les cellules ayant perdu leur intégrité sont présentes en amas, amas non observés pour les cellules possédant l'ICE. Une des hypothèses des différences observées est que des fonctions codées par l'ICE, dont le système toxine-antitoxine, pourraient permettre de mettre en place un mécanisme de survie des cellules au sein du biofilm. L'augmentation de la quantité d'ADN extracellulaire corrélée avec une perte d'intégrité des cellules pourrait constituer un mécanisme de survie quand les conditions nutritionnelles deviennent restrictives en stimulant l'acquisition d'ADN exogène pouvant conférer des avantages adaptatifs.

Les systèmes toxine antitoxine (TA) ont initialement été décrits comme permettant le maintien de plasmides dans les populations bactériennes. Néanmoins, ces systèmes ont été trouvés en abondance dans les chromosomes de nombreuses espèces bactériennes. Leur impact sur le pouvoir adaptatif bactérien reste ambigu puisqu'aucun rôle spécifique n'a été mis en évidence pour certains systèmes [250, 411, 419]. Néanmoins, les stress environnementaux, tels la privation en source de carbone et en acides aminés ou la phagocytose par les macrophages, ont été montrés comme stimulant l'expression de certains de ces systèmes chez différentes espèces [73, 323]. Chez *E. coli*, l'implication de plusieurs de ces systèmes dans la compétitivité lors d'une infection a été démontrée. Entre autre, un mutant ne produisant plus le système YoeB/YefM, similaire au système SAL_2044/SAL_2045 d'ICE_*515_tRNA*^{Lys}, est affecté dans la colonisation de vessie de souris [288]. De manière intéressante, certains systèmes TA chromosomiques d'*E. coli* sont impliqués dans la survie en cas de stress tels la présence d'antibiotiques, la privation en acides aminés et la présence dans un environnement oxydant [288]. Chez cette espèce, le système MqsR/MqsA est impliqué dans la formation de biofilms [425]. Cette implication passe par la régulation du gène *yigK.* La délétion de ce gène entraine une augmentation de la formation de biofilm par la souche jusqu'à 8 heures d'incubation mais une diminution du biofilm est constatée au-delà de cette durée. Des constats identiques ont été observés vis-à-

vis de l'implication de six autres systèmes TA d'*E. coli*, dont un est porté par un prophage, dans la formation de biofilm [425].

Chez *P. aeruginosa*, un système TA est également impliqué dans la sélection de cellules persistantes qui sont résistantes aux antibiotiques [235]. Les cellules bactériennes persistantes représentent une faible part de la population bactérienne qui est viable après un traitement sans qu'aucune mutation génétique ne soit liée à cette résistance. Plusieurs systèmes TA ont été décrits comme impliqués dans la persistance des cellules bactériennes [425]. L'induction d'un stade de dormance par les systèmes TA est ainsi liée à la persistance de certaines cellules de la population [425]. Certaines toxines représentent des régulateurs globaux de la transciption par leur activité sur les ARNm. La Toxine MqsR affecte la physiologie des cellules en dégradant les ARNm ce qui induit le stade de dormance. L'antitoxine associée affecte également la physiologie bactérienne en régulant d'autres systèmes cellulaires, dont d'autres systèmes TA [425].

Il est à noter qu'aucun rôle direct du système SAL_2044/SAL_2045 n'a pu être mis en évidence dans le maintien de l'ICE. Il serait intéressant de creuser la piste selon laquelle ce système pourrait être lié à la mise en place d'un mécanisme de survie des cellules en biofilm ou face à un stress environnemental, tel un stress oxydant.

3. Le facteur CAMP II : un nouveau facteur co-hémolytique

3.1. Le facteur CAMP II, un facteur de virulence ?

Ces travaux ont permis la découverte d'un nouveau facteur CAMP (facteur CAMP II) venant s'ajouter au facteur CAMP ubiquiste de *S. agalactiae*. Les analyses ont montré que le facteur CAMP II est exprimé et sécrété dans le milieu extracellulaire de manière similaire au facteur CAMP I chromosomique. La β-hémolysine/cytolysine, également ubiquiste des souches de *S. agalactiae*, reste, elle, ancrée dans la paroi cellulaire. Certaines souches de *S. agalactiae* peuvent posséder ainsi jusqu'à trois protéines hémolytiques ou co-hémolytiques (la β-hémolysine/cytolysine et un ou deux facteurs CAMP). Dans certaines

conditions, le facteur CAMP chromosomique et la β-hémolysine/cytolysine sont exprimés simultanément [272]. Dans d'autres conditions, l'expression d'un gène est stimulée tandis que l'expression de l'autre est inhibée [321]. Par ailleurs, le facteur CAMP chromosomique est produit durant l'invasion de l'hôte [47, 197]. Ainsi, une régulation différentielle des facteurs hémolytiques en fonction des besoins de *S. agalactiae* au sein de son microenvironnement naturel pourrait lui permettre une meilleure survie et/ou colonisation de l'hôte.

La production du facteur CAMP II chez des souches non pathogènes ou des souches ne possédant pas initialement de facteur CAMP a confirmé l'action du facteur CAMP II sur la paroi d'érythrocytes de mouton en synergie avec la sphingomyélinase staphylococcale. Néanmoins, la production d'un facteur CAMP II additionnel chez une souche de *S. agalactiae* possédant déjà le premier facteur CAMP n'engendre pas une réaction synergique co-hémolytique plus importante. Les résultats de spectrométrie de masse éliminent l'hypothèse de l'absence de sécrétion ou de la faible production du facteur CAMP II par les souches de *S. agalactiae*. La production d'un seul des facteurs CAMP pourrait avoir une activité suffisante pour lyser très rapidement la totalité des érythrocytes.

La classification du facteur CAMP en tant que facteur de virulence, malgré le fait que celui-ci est ubiquiste et paraît donc très important chez les souches de *S. agalactiae*, est encore aujourd'hui controversée dans la littérature [170, 197, 372]. Hensler *et al*. ont mis en doute la classification du facteur CAMP en tant que facteur de virulence sur la base de résultats obtenus en utilisant un mutant du gène *cfb* de la souche COH1 de *S. agalactiae* [170]. Les travaux de thèse apportent un éclairage nouveau sur ces résultats en mettant en évidence la présence du gène codant le facteur CAMP II sur l'ICE de la souche COH1. Il ne peut donc pas être exclu que ce second facteur CAMP confère une activité hémolytique en cas de perte du facteur CAMP chromosomique et contribue à la virulence d'espèces qui en sont dépourvues. Afin de conclure sur la clasification du facteur CAMP en tant que facteur de virulence, de nouveaux tests devront être réalisés en interrompant également le gène codant le facteur CAMP II de la souche COH1 de *S. agalactiae*.

Le facteur CAMP, en tant que co-hémolysine, peut contribuer à la lyse des érythrocytes et entraîner un rejet d'hème dans l'environnement bactérien. L'hème est l'un des co-facteurs, avec la ménaquinone, qui est nécessaire à la respiration chez *S. agalactiae* [441]. Il a été montré que le passage de *S. agalactiae* en métabolisme aérobie permettait d'accroître la biomasse et favorisait la dissémination et la virulence des souches [440-442]. L'hypothèse de l'impact d'un deuxième facteur CAMP sur la disponibilité en hème et donc sur la croissance de *S. agalactiae* a été explorée mais aucune modification de la densité optique ou de la quantité de biomasse formée par *S. agalactiae* en 24 h de culture n'a pu être mise en évidence en utilisant différentes conditions de culture (condition statique, condition aérobie avec ajout de ménaquinone ou d'hème et condition aérobie avec les deux co-facteurs). Néanmoins, le pH est resté similaire dans toutes les conditions mises en place ce qui suggère que *S. agalactiae* n'a pas mis en place de respiration dans les conditions expérimentales utilisées. Par ailleurs, lorsque *S. agalactiae* développe la respiration, sa croissance est plus importante dans du sang humain [441]. Il serait donc intéressant de tester cette hypothèse et de comparer la croissance de *S. agalactiae* dans du sang humain avec celle dans du sang de mouton dont la paroi des érythrocytes est plus riche en sphingomyéline donc plus sensible aux facteurs CAMP. D'autres expériences sont donc nécessaires pour infirmer ou confirmer cette hypothèse.

Par ailleurs, cette hypothèse pourra être testée chez la souche de *L. lactis* exprimant de façon hétérologue le facteur CAMP II puisque cette espèce possède la voie métabolique permettant la biosynthèse de la ménaquinone mais pas celle permettant la biosynthèse de l'hème. Par conséquent, l'acquisition d'hème extracellulaire par *L. lactis* est nécessaire à la mise en place du métabolisme respiratoire [142].

L'analyse des voies métaboliques (en utilisant la base de données du logiciel KEGG 2 PATHWAY accessible à l'adresse : www.genome.jp) des souches de streptocoques dont le génome a été séquencé a montré que *S. uberis*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* et *S. parauberis* possèdent le gène codant la cytochrome bd oxydase et pourraient être capables de réaliser la respiration de la même manière que *S. agalactiae*. D'autre part, les voies métaboliques permettant la biosynthèse de la ménaquinone et de l'hème sont incomplètes chez ces espèces (KEGG2 PATHWAY et BLASTP) [300]. Les expériences pourraient donc également être réalisées chez ces espèces.

3.2. Lien entre l'isolement et la dissémination de gènes codant les facteurs CAMP

Il a été montré précédemment que le facteur CAMP chromosomique est présent chez quasiment toutes les souches de *S. agalactiae* étudiées [120, 138, 205, 309, 324]. Ces travaux ont montré que le facteur CAMP II est retrouvé chez des souches de *S. agalactiae* mais également chez deux autres espèces, *S. bovis* et *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, jusqu'alors jamais décrites comme possédant un tel type de facteur co-hémolytique. La souche de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* est β-hémolytique tandis que la souche de *S. bovis* n'est pas hémolytique. De manière notable, *S. bovis* est décrite comme étant une espèce non hémolytique et aucun facteur hémolytique ou co-hémolytique n'avait encore été décrit chez cette espèce à notre connaissance. Par ailleurs, un gène codant un facteur CAMP II a également été retrouvé dans le génome d'une souche de *S. urinalis* par une analyse *in silico*. Chez des espèces ne possédant pas de facteur CAMP, l'acquisition par transfert horizontal du facteur CAMP II pourrait leur permettre d'accéder à de nouvelles sources de fer qui est un des composants clé du métabolisme bactérien et contribue à la virulence de certaines espèces [356]. L'augmentation exponentielle des données de séquences génomiques pourrait permettre la détection de nouvelles espèces susceptibles de posséder le facteur CAMP II porté par ICE_*515_tRNA*^{Lys}.

Ces travaux ont également mis en évidence une répartition espèce-dépendante des facteurs co-hémolytiques puisque toutes les souches de *S. uberis* ne possèdent que le facteur Uberis déjà décrit dans la littérature mais ne possèdent ni le facteur CAMP chromosomique ni le facteur CAMP II de *S. agalactiae*. Les espèces, ayant acquis récemment un ICE apparenté à ICE_*515_tRNA*^{Lys} par transfert horizontal, possèdent le facteur CAMP II codé par l'élément génétique mobile.

Les souches possédant un facteur type CAMP (facteur Uberis ou facteur CAMP II) ont été retrouvées essentiellement au sein de deux régions françaises. Le point le plus chaud paraissant être le Nord Ouest de la France composé des départements de la Seine Maritime, de l'Orne, des Côtes d'Armor, du Finistère et de la Manche. C'est dans cette région, et plus précisément dans l'Orne, où la souche *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 20591 a été isolée.

La souche de *S. bovis* a, elle, était isolée du département de Tarn et Garonne. Ainsi, les isolats produisant un facteur CAMP paraissent se concentrer prioritairement dans certaines zones. Les éléments à notre disposition ne nous permettent malheureusement pas de tirer de conclusions épidémiologiques mais il pourrait être intéressant d'approfondir cet aspect.

La souche *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 20591, chez laquelle a été détecté le facteur CAMP II, a été isolée d'une infection du liquide synovial chez un cheval en 2007. La souche *de S. bovis* 7434, qui possède également le facteur CAMP II, a été isolée d'un cas de mammite en 1993. La souche de *S. urinalis* 2285-97 a été isolée d'une infection urinaire chez un patient de 55 ans [79]. La souche 515 de *S. agalactiae* isolée en 1977 provient du fluide cérébrospinal d'un nouveau-né tandis que la souche COH1 a été isolée d'un cas de septicémie et la souche FSL S3-026, d'un cas de mammite en 1987. Ces trois dernières souches sont celles qui possèdent également le facteur CAMP II sur les ICE intégrés à l'extrémité 3' du gène codant l'ARNt^{Lys}. La première chose remarquable est la longue période d'isolement des souches chez lesquelles on retrouve le facteur CAMP II, ce qui signifie que le facteur CAMP II a été conservé au sein de la population de streptocoques. Par ailleurs, les hôtes eucaryotes chez lesquels on retrouve des isolats portant le gène codant le facteur CAMP II sont divers. Tout de même, il est à noter que toutes les espèces possèdent un réservoir commun puisque toutes peuvent être pathogènes chez le bovin et provoquer des mammites. Toutes, sauf *S. uberis*, sont également des pathogènes d'autres mammifères dont l'Homme. Ces éléments révèlent des transferts horizontaux entre différentes espèces bactériennes isolées de différents environnements.

Sur les six souches portant le facteur CAMP II, quatre sont issues d'hôtes dont la membrane des érythrocytes possède une teneur faible en sphingomyéline (homme, 27 % et cheval, 10 %) qui sont donc insensibles à l'action de la sphingomyélinase des espèces bactériennes productrices (dont *S. aureus*). Ces hôtes sont ainsi théoriquement insensibles au facteur CAMP II et la question de l'importance de la production d'un facteur type CAMP, par des souches en produisant déjà un ou par des souches dont l'hôte privilégié est insensible, reste à élucider.

Les facteurs CAMP sont actifs sur les membranes des érythrocytes lorsque celles-ci ont été affaiblies sous l'action d'une sphingomyélinase. Par conséquent, il serait très intéressant de rechercher la présence simultanée lors d'une infection et/ou le portage commensal d'espèces bactériennes (*S. aureus, B. cereus, Listeria* sp., *M. tuberculosis, C. perfringens* etc.) produisant cette enzyme par les hôtes colonisés également par des streptocoques CAMP positifs.

Par ailleurs, les cellules eucaryotes, notamment les macrophages, produisent de la sphingomyélinase qui hydrolyse également la sphingomyéline en céramide, pouvant ainsi rendre sensibles les érythrocytes à l'activité des facteurs CAMP [410]. La sphingomyélinase est présente dans la plupart des tissus humains. Chez les hôtes eucaryotes, certaines fonctions sont régulées par une communication intracellulaire impliquant tout une voie de signalisation à laquelle appartient la sphingomyélinase [410]. Celle-ci joue notamment un rôle dans le développement tissulaire, l'apoptose, dans la résistance aux stress des cellules eucaryotes mais également dans la phagocytose et l'élimination des cellules bactériennes [410]. Les cellules bactériennes possédant un facteur CAMP pourraient utiliser cette propriété afin d'exercer leur effet cytotoxique. *Propionibacterium acnes* est capable d'induire la production de sphingomyélinase par des kératinocytes et des macrophages ce qui pourrait permettre au facteur CAMP de *P. acnes* d'être actif [280]. Il serait intéressant de réaliser une telle étude chez *S. agalactiae*.

3.3. Le facteur CAMP comme moyen d'identification de S. agalactiae *?*

De nombreux gènes présentant une forte identité nucléotidique avec le gène *cfb* sont présents parmi les streptocoques et d'autres espèces bactériennes. Les résultats des travaux de thèse ont confirmé que le facteur CAMP n'est pas une caractéristique unique de *S. agalactiae*. Originellement, le test CAMP était considéré comme hautement spécifique de *S. agalactiae*. Pendant longtemps décrit comme un test fiable pour l'identification des cette espèce, le test CAMP sur gélose au sang comme moyen d'identification de *S. agalactiae*

apparait de moins en moins fiable au vu de la découverte d'autres facteurs hémolytiques synergiques produits par d'autres espèces bactériennes.

Par ailleurs, les résultats de ces travaux montrent la proximité des séquences entre les gènes codant les différents facteurs CAMP. Cet élément renforce l'idée que la détection de routine de *S. agalactiae* par la mise en place d'un test CAMP sur géloses au sang ou par des méthodes d'amplification par polymérase en chaine devrait toujours être confirmée par d'autres méthodes génotypiques ou phénotypiques.

II. ICE *515 tRNA^{Lys}*, élément clé dans la dissémination de fonctions chez les streptocoques

1. Importance des échanges de matériel génétique entre streptocoques : ICE *515 tRNA^{Lys}*, un partenaire important.

*1.1. Ubiquité d'ICE*_515_tRNA^{Lys} *chez* S. agalactiae *et dynamisme génomique*

Des expériences *in vitro* ont montré la capacité d'excision et de transfert d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* vers d'autres souches de *S. agalactiae* dont la souche NEM316. Le re-transfert de l'ICE de la souche NEM316 l'ayant acquis vers une autre souche receveuse de *S. agalactiae* a également été démontré (A. Puymège, S. Bertin, S. Chuzeville, G. Guédon et S. Payot, soumis). ICE_*515_tRNA^{Lys}* est donc un élément génétique mobile qui permet la dissémination de fonctions chez *S. agalactiae*.

Des travaux *in vivo* ont révélé la dissémination d'éléments apparentés à ICE_*515_tRNA^{Lys}* dans les populations de *S. agalactiae* d'origine humaine mais également bovine [161]. L'analyse *in silico* a également révélé la présence des gènes étudiés dans ces travaux chez la souche d'origine bovine FSL S3-026. Ces données montrent que des échanges ont eu lieu entre souches provenant d'hôtes différents et que, malgré la faiblesse de la diversité génétique mise en évidence dans la littérature des souches bovines par rapport aux souches d'origine humaine de *S. agalactiae* [24, 30, 327, 390], ces dernières échangent du matériel génétique avec les souches de *S. agalactiae* d'origine humaine par transfert horizontal.

Le maintien de l'élément dans des souches provenant d'hôtes variés suggère que les protéines codées par l'ICE pourraient avoir un spectre large d'action et que leurs fonctions conféreraient des avantages sélectifs à différents types de population de *S. agalactiae*. Une analyse épidémiologique de la répartition des gènes impliqués dans des fonctions d'adaptation et/ou de virulence codées par les éléments en fonction du type d'hôte

privilégié serait intéressante. Il serait également important d'étudier les fonctions codées par des éléments portés par des isolats issus d'hôtes différents ou par des souches commensales afin de distinguer les fonctions conservées en fonction de l'environnement de la souche bactérienne. Ces études permettraient de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans la virulence des souches et d'établir des stratégies de lutte efficaces contre *S. agalactiae*.

La souche NEM316 possède déjà un CIME intégré à l'extrémité 3' du gène ARNt^{Lys}. Il a été montré qu'ICE_*515_tRNA*^{Lys} s'intègre préférentiellement au site *attR* de CIME_*NEM316_tRNA*^{Lys} par un phénomène d'accrétion. ICE_*515_tRNA*^{Lys} est donc capable de mobiliser CIME_*NEM316_tRNA*^{Lys} en *cis* et le transfert simultané des deux éléments a été obtenu (A. Puymège, S. Bertin, S. Chuzeville, G. Guédon et S. Payot, soumis). Il serait alors également intéressant d'étudier la capacité d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} à mobiliser d'autres éléments génétiques mobiles comme des plasmides ou d'autres CIME et IME de manière similaire à d'autres éléments décrits dans la littérature afin d'établir un rôle putatif plus large de l'implication de cette famille d'ICE dans la dynamique génomique des souches de *S. agalactiae* [42, 87, 174, 231].

Sachant qu'il a été montré que des molécules d'ADN pouvant atteindre des milliers de kb peuvent être échangés par conjugaison [268], il est possible d'envisager qu'ICE_*515_tRNA*^{Lys} puisse mobiliser par un système de type Hfr des fragments chromosomiques encore plus larges [42].

De ce fait, en plus du transfert des fonctions codées par ICE_*515_tRNA*^{Lys} lors du mécanisme de conjugaison, d'autres fonctions supplémentaires pourraient être transférées à d'autres souches à travers une mobilisation d'ADN.

D'autre part, une analyse génomique des données des souches séquencées a montré que chaque séquençage supplémentaire de souches de *S. agalactiae* apporterait la mise en évidence de 33 nouveaux gènes dépendants d'une souche [400]. Ceci suggère que l'acquisition de données génomiques de nouvelles souches de *S. agalactiae* pourrait

permettre de caractériser de nouveaux gènes disséminables par les éléments intégrés à l'extrémité 3' du gène codant l'ARNt^{Lys}.

L'analyse des gènes pouvant apporter des avantages à *S. agalactiae* révèle aussi la diversité des bagages génétiques au niveau des modules fonctionnels des éléments génétiques mobiles. Une étude approfondie des fonctions pouvant être conférées par ces éléments est donc importante pour évaluer l'ampleur des échanges génétiques possibles conférant des fonctions impliquées dans l'adaptation et/ou la virulence des souches.

*1.2. Dissémination des fonctions d'ICE_*515_tRNA^{Lys} *parmi différentes espèces de bactéries*

Ces travaux ont également confirmé la dissémination d'éléments apparentés à ICE_*515_tRNA^{Lys}* chez différentes espèces de streptocoques et mis en évidence un autre vecteur de la variabilité phénotypique des streptocoques. Au préalable, des travaux avaient révélé le transfert de ces éléments chez des souches de *S. uberis* et *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* [161]. Ces travaux ont permis de confirmer la proximité des éléments avec ICE_*515_tRNA^{Lys}*. De plus, les gènes d'ICE_*COH1_tRNA^{Lys}* pouvant conférer des avantages sont présents sur l'élément intégré à l'extrémité 3' du gène codant également un ARNt^{Lys} chez la souche *S. urinalis* 2285-97. L'analyse informatique a révélé la proximité de certains gènes d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* avec des gènes appartenant à d'autres espèces chez qui la présence de l'ICE n'a pas encore été démontrée. Le transfert de ces éléments est également possible vers des souches de *S. uberis*, *S. bovis* et *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* puisque des gènes homologues à ceux d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* ont été trouvés sur les éléments portés par ces souches. Des travaux récents ont révélé de manière additionnelle que le transfert d'ICE_*515_tRNA^{Lys}* était également possible *in vitro* vers une souche de *S. pyogenes* (A. Puymège, S. Bertin, S. Chuzeville, G. Guédon et S. Payot, soumis).

Les éléments intégrés à l'extrémité 3' des gènes codant les ARNt^{Lys} appartenant à la famille d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} sont donc capables de se transférer vers d'autres espèces, non seulement en conditions de laboratoire mais également dans l'environnement. Ces éléments génétiques pourraient donc contribuer de manière importante à l'évolution et à l'adaptation de nombreuses espèces de streptocoques.

La plupart du temps, le degré de similarité des séquences des gènes de ménage entre espèces proches est élevé. Sachant que la recombinaison homologue est possible jusqu'à 25 % de divergence, ces gènes de ménage représentent alors une cible de choix pour la sélection d'intégration des éléments génétiques mobiles facilitant les échanges génétiques entre espèces proches. Ces travaux ont confirmé le choix d'intégration privilégiée des éléments appartenant à la famille d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} au locus situé à l'extrémité 3' du gène codant l'ARNt^{Lys} chez *S. bovis*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* et *S. uberis* et la conservation des sites de recombinaison *attR* bordant ces éléments génétiques.

En conclusion, le site localisé à l'extrémité 3' de l'ARNt^{Lys} paraît être un point chaud d'intégration d'ICE chez les streptocoques. Les échanges génétiques entre espèces proches sont importants et les éléments apparentés à ICE_*515_tRNA*^{Lys} paraissent être des vecteurs de gènes très efficaces pouvant conférer diverses fonctions importantes (facteur CAMP II, protéines de surface, etc...) contribuant ainsi à la plasticité génomique des souches. L'adaptation des souches pathogènes à des environnements nouveaux et/ou à des conditions fluctuantes est un souci majeur de santé publique. Par exemple, les mesures prophylactiques prises pour réduire le nombre de cas de mammites dans le milieu vétérinaire a permis de diminuer le nombre de cas imputés à *S. agalactiae* et à *S. aureus* mais pas ceux imputés à *S. bovis* et à *S. uberis*. L'échange abondant de matériel génétique entre streptocoques pourrait leur permettre d'acquérir le bagage génétique nécessaire à la survie dans ces nouvelles conditions.

*1.3. Mode de transfert d'ICE*_515_tRNA^{Lys}

Afin de déterminer plus finement la possibilité de transfert des éléments appartenant à la famille d'ICE_*515_tRNA*^{Lys}, il est nécessaire de réaliser des études approfondies sur le mécanisme par lequel celui-ci se transfère. Certaines protéines de surface décrites dans ces travaux pourraient être impliquées lors du transfert mais leur rôle reste à être déterminé. La stabilité de l'interaction entre la bactérie donneuse et la bactérie receveuse, la régulation et le taux d'excision d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} sont des éléments importants pour l'efficacité du transfert. Ces critères sont donc des éléments qui doivent être étudiés afin d'évaluer l'activité de l'ICE *in vivo*.

La concordance entre l'état physiologique des cellules pourrait également être déterminante au déroulement des échanges génétiques. La production de signaux permettant une synchronisation de l'expression des gènes des souches serait un élément favorable au transfert. L'analyse *in silico* a montré que l'ICE codait un peptide capable de se lier aux membranes, pouvant être maturé et transporté par un transporteur de type ABC dans le milieu extracellulaire. Le rôle du peptide n'a pu être éclairci durant ces travaux mais il serait très intéressant de creuser la piste selon laquelle le peptide exporté pourrait être impliqué dans un mécanisme de communication cellulaire régulant les transferts horizontaux.

Par ailleurs, la difficulté rencontrée pour la réalisation des mutants suggère une réplication extra-chromosomique de l'élément. Jusqu'ici, la distinction entre plasmides et éléments intégratifs et conjugatifs était essentiellement basée sur le maintien extra-chromosomique des plasmides. En effet, les plasmides étaient décrits comme les seuls éléments réplicatifs extrachromosomiques et les ICE décrits comme se répliquant avec le réplicon dans lequel ils sont intégrés. Néanmoins, depuis peu de temps, l'idée progresse que les ICE auraient la capacité de répliquer de manière non intégrés dans un réplicon bactérien. Chez les éléments décrits, cette réplication n'est pas impliquée dans le maintien mais interviendrait dans sa stabilité. En effet, une réplication transitoire de l'ICE après son excision dans la cellule donneuse et/ou à son arrivée dans la cellule receveuse pourrait augmenter les succès de son transfert [61, 371]. ICE_*515_tRNA*^{Lys} pourrait ainsi, en plus

d'ICE*St3* de *S. thermophilus* et RD2 présent chez *S. pyogenes*, représenter un nouveau cas de réplication extra-chromosomique des ICE. Le calcul du nombre de copies par cellules bactériennes d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} permettrait de corroborer cette hypothèse.

Il a été décrit dans la littérature que l'évolution des ICE s'effectue par l'échange, la délétion et l'acquisition de modules fonctionnels [53, 140, 407]. Les travaux de thèse présentent un nouvel exemple de dynamique évolutive des ICE par échange modulaire. L'ICE séquencé de la souche *S. uberis* 19608 porte des modules de recombinaison et de conjugaison similaire à celui des ICE de la famille d'ICE_*515_tRNA*^{Lys}. La séquence de l'ICE est encore incomplète et en cours de séquençage mais il a été montré qu'un gène qui code une protéine de virulence de la famille ESAT-6 est situé à l'extrémité 5' de l'ICE de *S. uberis* 19608. Des homologues de ce gène sont présents sur les éléments mobilisables (IME et CIME) intégrés à l'extrémité 3' d'un gène codant un ARNt^{Lys} des souches séquencées de *S. agalactiae* (H36B, A909, NEM316). Les séquençages doivent être achevés pour conclure mais ces éléments suggèrent des échanges entre les modules de différents éléments intégratifs.

2. Les barrières au transfert d'ICE_*515_tRNA*^{Lys}

De nombreux travaux ont décrit les barrières existantes au transfert horizontal entre les espèces bactériennes. Malgré ces barrières, ICE_*515_tRNA*^{Lys} dissémine les fonctions qu'il code dans la population de *S. agalactiae* et vers d'autres espèces.

Le transfert d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} paraît être limité à des espèces relativement proches telles les autres espèces pathogènes de streptocoques et entérocoques. Néanmoins, il est à noter qu'aucun transfert de l'ICE n'a pu être mis en évidence dans la collection de souches de *S. suis* du Resapath testée. Ces résultats sont cohérents avec les

travaux antérieurs qui avaient montré que *S. suis* est une espèce chez laquelle les échanges génétiques paraissent limités [176].

De nombreux essais réalisés en conditions de laboratoire n'ont pas permis d'obtenir le transfert d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} avec les espèces bactériennes *S. salivarius*, *S. thermophilus*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* subsp *dysgalactiae*, *S. mutans* et *E. faecalis*. Seuls quelques transconjugants de *S. pyogenes* ont pu être obtenus. Par ailleurs, même des transferts entre différentes souches de *S. agalactiae* se produisent à des fréquences faibles. En effet, seulement 0,4 x 10^{-7} à 7 x 10^{-7} transconjugants des souches NEM316 et COH1 sont obtenus par cellules donneuses de *S. agalactiae* 515 (travaux de thèse d'Aurore Puymège, Laboratoire de Génétique et Microbiologie, UMR INRA-UHP 1128). Les taux de conjugaison sont dix fois plus faibles par rapport à ceux obtenus pour ICE*St3* de *S. thermophilus* et RD2 de *S. pyogenes* [14, 371]. Ce faible taux de transfert pourrait être du à la présence d'un élément au site d'intégration d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} chez la bactérie receveuse ce qui diminuerait le taux de transfert [13].

Les systèmes de restriction-modification et la présence de nombreux loci CRISPR chez les streptocoques pourraient également être responsables de la faible capacité d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} à se transférer. Il a été montré que *S. agalactiae* possède un système CRISPR1 très dynamique et diversifié qui est conservé au sein de cette espèce puisque 8 souches séquencées de *S. agalactiae* possèdent le locus ainsi que 351 souches de terrain isolées de l'Homme ou de l'animal [245]. De nombreux espaceurs différents (949 au total) composent l'ensemble des systèmes CRISPR détectés chez ces souches, chacune des souches étudiées portant de 1 à 33 espaceurs différents. Chacun des systèmes comporte 4 gènes codant les protéines Cas associées [245]. Un second système, CRISPR2 est présent chez quelques souches seulement et est moins conservé. CRISPR2 est présent chez 3 des souches séquencées de *S. agalactiae* (515, COH1 et FSL S3-026). Vingt et un espaceurs différents seulement composent ce deuxième locus suggérant que celui-ci est moins actif que CRISPR1 et a été perdu chez la plupart des souches. La diversité des CRISPR de *S. agalactiae* permet une caractérisation fine de la population et une identification de la provenance géographique [245]. Une majorité de séquences des espaceurs est homologue à des éléments génétiques mobiles, dont les éléments intégrés à l'extrémité 3' d'un gène codant

l'ARNt Lysine (anticodon CTT) et des prophages. Par ailleurs, d'autres espaceurs CRISPR correspondent à des séquences d'autres streptocoques et notamment de *S. pyogenes* [245].

L'analyse des espaceurs des systèmes CRISPR présents chez la souche A909 de *S. agalactiae* indique que trois des espaceurs ciblent des séquences présentes sur ICE_*515_tRNA*^{Lys}. Cela pourrait expliquer le fait qu'aucun transconjugant n'a été obtenu en utilisant cette souche comme receveuse lors des tests de transfert. Les systèmes CRISPR de *S. agalactiae* pourraient représenter des facteurs empêchant les échanges des éléments de la famille d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} au sein de la population et limiter également la dissémination des fonctions conférées par l'élément. En conclusion, les CRISPR peuvent être considérés comme des facteurs limitant la dissémination de tels facteurs au sein des populations bactériennes [260].

Un autre facteur pouvant limiter le transfert est la capacité d'intégration d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} dans le génome de la cellule receveuse. La souche de *S. bovis* ainsi que 13 des 15 souches de *S. uberis* dont la séquence du site de recombinaison droit *attR* a été obtenue possèdent un site *attR* ayant une identité supérieure à 82 % par rapport au site *attR* d'ICE_*515_tRNA*^{Lys}. Il est à noter que les sites *attR* de 10 souches de *S. uberis* et la souche de *S. bovis* sont identiques à 100 % ce qui suggère des évènements récents de transfert entre ces deux espèces.

Les éléments des deux autres souches de *S. uberis* et celui de la souche de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* sont bordés par un site de recombinaison *attR* présentant une identité plus faible par rapport à celui d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} (respectivement 69 %, 78 % et 54 %). Ces identités de séquences plus faibles ne permettent théoriquement pas la recombinaison permettant l'intégration d'un élément génétique similaire à celui d'ICE_*515_tRNA*^{Lys}. Ceci pourrait suggérer un évènement ancien de transfert horizontal, les séquences des sites de recombinaison ayant divergé. L'intégration par accrétion à ce locus d'un élément ayant des sites de recombinaison similaires à ICE_*515_tRNA*^{Lys} ne paraît plus réalisable chez ces souches. Par ailleurs, la différence de séquences des sites *attR* entre les différentes souches de *S. uberis* n'est liée ni à une origine géographique spécifique ni à l'année d'isolement des souches.

Une fois transféré et intégré, le maintien de l'élément dans la population va dépendre du ratio entre le coût métabolique engendré par la présence de l'élément et l'apport en avantages évolutifs à la cellule bactérienne en fonction des conditions environnementales. Dans ce sens, les gènes présents sur les éléments de la famille d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} doivent pouvoir être exprimés chez la cellule hôte. Les streptocoques et les entérocoques étant des espèces phylogénétiquement proches où l'utilisation des codons est semblable, les transferts vers ces espèces apparaissent comme ayant effectivement plus de succès théorique.

Par ailleurs, les protéines produites ne doivent également pas avoir d'effets toxiques sur les cellules receveuses. Ce travail a montré que les gènes d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} peuvent s'exprimer aussi bien chez d'autres streptocoques pathogènes (*S. bovis*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* et *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*) mais également chez une espèce non pathogène (*L. lactis*). Chez ces espèces, la machinerie de sécrétion et d'ancrage des protéines est telle que les protéines sont sécrétées et ancrées de manière correcte.

D'autre part, des systèmes de maintien ont été développés par les éléments génétiques mobiles, notamment les systèmes toxine-antitoxine. Les systèmes TA pourraient assurer la stabilité des éléments intégrés dans le génome, tels que les ICE, par nécessité de maintenir l'expression du gène conférant l'immunité contre la toxine à la souche productrice [250]. Par ailleurs, il a déjà été démontré chez *V. cholerae* que lorsque l'élément génétique mobile SXT se trouve sous sa forme extra-chromosomique, une activation du module TA, nommé MosAT, permet de minimiser la fréquence de perte de l'ICE chez les cellules filles [438]. ICE_*515_tRNA*^{Lys} code un système TA où l'antitoxine instable pourrait permettre de contrecarrer la toxicité cellulaire de sa toxine associée. La perte de l'ICE entraînerait donc la mort cellulaire par la toxine stable. Durant ce travail, un mutant interrompu dans le gène codant la toxine d'un système toxine-antitoxine d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} a pu être obtenu. Néanmoins, malgré l'absence de toxicité en cas de perte de l'ICE, aucune souche ayant perdu l'élément au cours de multiples générations n'a pu être obtenue. Des traitements à la mitomycine C, molécule causant des dommages à l'ADN et connue pour augmenter le taux d'excision d'ICE possédant un module de régulation apparenté, n'ont également pas permis

d'obtenir une souche sans ICE. Le système TA n'apparait donc pas être le seul élément qui permet le maintien des ICE de la famille d'ICE_*515_tRNA*^{Lys} chez *S. agalactiae* et les autres streptocoques. Une réplication extra-chromosomique de l'ICE ou l'importance des fonctions codées par l'ICE pour la survie et la réplication des bactéries dans l'environnement pourraient être d'autres éléments permettant le maintien dans la population.

Ainsi, ICE_*515_tRNA*^{Lys}, malgré les nombreuses barrières au transfert horizontal, parvient à se disséminer chez des espèces phylogénétiquement proches. La conservation de l'élément suggère que les fonctions codées par l'élément apportent de la compétitivité aux bactéries qui l'acquièrent.

CONCLUSION

En conclusion, ces travaux ont permis de caractériser chez *S. agalactiae*, un ICE véhiculant des gènes impliqués dans la virulence et dans l'adaptation de cette bactérie à son environnement. Cet élément génétique mobile permet la dissémination de facteurs d'adhésion, voire de facteurs responsables de l'agrégation cellulaire, et d'un facteur co-hémolytique. Une analyse *in silico* montre que l'ICE pourrait également coder un peptide, qui pourrait avoir un rôle dans la communication cellulaire ainsi qu'un facteur de virulence appartenant à la famille des protéines ESAT-6.

La majorité des facteurs de virulence connus de *S. agalactiae*, notamment ceux impliqués dans l'adhésion, sont codés par des gènes ayant une localisation chromosomique, ce qui suggère une présence spécifique d'espèce. Le facteur CAMP était décrit initialement comme un facteur propre à *S. agalactiae*. Celui-ci est également codé par un gène porté par un élément génétique mobile permettant sa dissémination vers d'autres espèces de streptocoques.

La capacité de mobilité intra-espèce de gènes codant des facteurs de virulence chez *S. agalactiae* a déjà été décrite. Ainsi, le gène codant la protéine Lmb permettant la liaison à la laminine et le gène codant la peptidase C5a sont portés par un transposon tandis que les loci permettant la production des pili chez *S. agalactiae* sont situés sur des îlots génomiques [45, 103, 337]. Les travaux de thèse ont confirmé expérimentalement, et pour la première fois, la présence de gènes codant des facteurs de virulence sur un ICE de *S. agalactiae* pouvant être transférés au sein de l'espèce ou vers d'autres espèces.

ICE_*515_tRNA*^{lys} est capable de franchir la barrière d'espèces et de disséminer son bagage génétique chez plusieurs streptocoques identifiés (*S. uberis*, *S. pyogenes*, *S. bovis*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* et *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*). Ces travaux constituent un exemple supplémentaire de contribution des ICE au pouvoir pathogène des souches. Une étude *in vivo* chez l'animal pourrait permettre de confirmer cette hypothèse. De tels transferts de gènes codant des facteurs de virulence par l'intermédiaire des ICE ont

déjà été décrits chez d'autres espèces bactériennes [77, 333, 335, 356]. Chez les Firmicutes, des transferts de facteurs de virulence putatifs ont été mis en évidence entre *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. agalactiae* et *S. suis* par l'intermédiaire des ICE appartenant à la famille d'ICE*Sde3396* [89]. Un transfert d'ICE*Se2* codant un système d'acquisition du fer a été également suggéré entre *S. equi* et *C. difficile* [169, 424]. Néanmoins, les travaux de thèse constituent la première démonstration expérimentale de la fonctionnalité de protéines impliquées dans la virulence chez des souches de terrain, les gènes codant ces protéines pouvant être transférés par conjugaison via un ICE à une souche non pathogène et à d'autres souches pathogènes.

Les infections dues aux streptocoques pathogènes conduisent à de nombreux problèmes économiques et sanitaires chez l'Homme et les animaux. La dissémination de facteurs de virulence chez ces espèces pourrait engendrer une augmentation de leur pouvoir pathogène. Il paraît alors essentiel de poursuivre les études sur la dissémination potentielle de gènes de virulence via des éléments génétiques mobiles afin de pouvoir appréhender l'émergence de nouveaux pathogènes et de réagir efficacement face à de nouvelles épidémies et d'éviter une situation de crise sanitaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Al Safadi, R., S. Amor, G. Hery-Arnaud, B. Spellerberg, P. Lanotte, L. Mereghetti, F. Gannier, R. Quentin, and A. Rosenau**, Enhanced expression of *lmb* gene encoding laminin-binding protein in *Streptococcus agalactiae* strains harboring IS*1548* in *scpB-lmb* intergenic region. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10794.
2. **Al Safadi, R., L. Mereghetti, M. Salloum, M.F. Lartigue, I. Virlogeux-Payant, R. Quentin, and A. Rosenau**, Two-component system RgfA/C activates the *fbsB* gene encoding major fibrinogen-binding protein in highly virulent CC17 clone group B Streptococcus. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e14658.
3. **Areschoug, T., M. Stalhammar-Carlemalm, I. Karlsson, and G. Lindahl**, Streptococcal beta protein has separate binding sites for human factor H and IgA-Fc. J Biol Chem, 2002. **277**(15): p. 12642-8.
4. **Atkinson, S. and P. Williams**, Quorum sensing and social networking in the microbial world. J R Soc Interface, 2009. **6**(40): p. 959-78.
5. **Auchtung, J.M., C.A. Lee, R.E. Monson, A.P. Lehman, and A.D. Grossman**, Regulation of a Bacillus subtilis mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(35): p. 12554-9.
6. **Babic, A., M.B. Berkmen, C.A. Lee, and A.D. Grossman**, Efficient gene transfer in bacterial cell chains. MBio, 2011. **2**(2).
7. **Banerjee, A., B.J. Kim, E.M. Carmona, A.S. Cutting, M.A. Gurney, C. Carlos, R. Feuer, N.V. Prasadarao, and K.S. Doran**, Bacterial Pili exploit integrin machinery to promote immune activation and efficient blood-brain barrier penetration. Nat Commun, 2011. **2**: p. 462.
8. **Barcelos, A.M., M.A. Teixeira, L.S. Alves, M.A. Vieira, M.L. Bedim, and N.A. Ribeiro**, Infectious endocarditis due to *Streptococcus bovis* in a patient with colon carcinoma. Arq Bras Cardiol, 2010. **95**(3): p. e88-90.
9. **Bartke, N. and Y.A. Hannun**, Bioactive sphingolipids: metabolism and function. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S91-6.
10. **Beaber, J.W., V. Burrus, B. Hochhut, and M.K. Waldor**, Comparison of SXT and R391, two conjugative integrating elements: definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(12): p. 2065-70.
11. **Beck, M., R. Frodl, and G. Funke**, Comprehensive study of strains previously designated *Streptococcus bovis* consecutively isolated from human blood cultures and emended description of *Streptococcus gallolyticus* and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli.* J Clin Microbiol, 2008. **46**(9): p. 2966-72.
12. **Beckmann, C., J.D. Waggoner, T.O. Harris, G.S. Tamura, and C.E. Rubens**, Identification of novel adhesins from Group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. Infect Immun, 2002. **70**(6): p. 2869-76.
13. **Bellanger, X., C. Morel, F. Gonot, A. Puymege, B. Decaris, and G. Guedon**, Site-specific accretion of an integrative conjugative element together with a related genomic island leads to cis mobilization and gene capture. Mol Microbiol, 2011. **81**(4): p. 912-25.
14. **Bellanger, X., A.P. Roberts, C. Morel, F. Choulet, G. Pavlovic, P. Mullany, B. Decaris, and G. Guedon**, Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICE*St1* and ICE*St3* from *Streptococcus thermophilus.* J Bacteriol, 2009. **191**(8): p. 2764-75.
15. **Bensadoun, A. and D. Weinstein**, Assay of proteins in the presence of interfering materials. Anal Biochem, 1976. **70**(1): p. 241-50.
16. **Beres, S.B. and J.M. Musser**, Contribution of exogenous genetic elements to the group A Streptococcus metagenome. PLoS One, 2007. **2**(8): p. e800.
17. **Beres, S.B., R. Sesso, S.W. Pinto, N.P. Hoe, S.F. Porcella, F.R. Deleo, and J.M. Musser**, Genome sequence of a Lancefield group C *Streptococcus zooepidemicus* strain causing epidemic nephritis: new information about an old disease. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e3026.
18. **Bergseng, H., L. Bevanger, M. Rygg, and K. Bergh**, Real-time PCR targeting the sip gene for detection of group B Streptococcus colonization in pregnant women at delivery. J Med Microbiol, 2007. **56**(Pt 2): p. 223-8.

19. **Berkmen, M.B., C.A. Lee, E.K. Loveday, and A.D. Grossman**, Polar positioning of a conjugation protein from the integrative and conjugative element ICE*Bs1* of *Bacillus subtilis.* J Bacteriol, 2010. **192**(1): p. 38-45.
20. **Berndt, C., C.H. Lillig, and A. Holmgren**, Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(4): p. 641-50.
21. **Bernheimer, A.**, Nature and mechanism of action of the CAMP protein of group B streptococci. Infect Immun., 1979. **23**(3): p. 838-44.
22. **Bhaya, D., M. Davison, and R. Barrangou**, CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. Annu Rev Genet, 2011. **45**: p. 273-97.
23. **Biers, E.J., K. Wang, C. Pennington, R. Belas, F. Chen, and M.A. Moran**, Occurrence and expression of gene transfer agent genes in marine bacterioplankton. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(10): p. 2933-9.
24. **Bisharat, N., D.W. Crook, J. Leigh, R.M. Harding, P.N. Ward, T.J. Coffey, M.C. Maiden, T. Peto, and N. Jones**, Hyperinvasive neonatal group B streptococcus has arisen from a bovine ancestor. J Clin Microbiol, 2004. **42**(5): p. 2161-7.
25. **Bishop, E.J., C. Shilton, S. Benedict, F. Kong, G.L. Gilbert, D. Gal, D. Godoy, B.G. Spratt, and B.J. Currie**, Necrotizing fasciitis in captive juvenile *Crocodylus porosus* caused by *Streptococcus agalactiae*: an outbreak and review of the animal and human literature. Epidemiol Infect, 2007. **135**(8): p. 1248-55.
26. **Bjur, E., S. Eriksson-Ygberg, F. Aslund, and M. Rhen**, Thioredoxin 1 promotes intracellular replication and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Infect Immun, 2006. **74**(9): p. 5140-51.
27. **Blumberg, H.M., D.S. Stephens, M. Modansky, M. Erwin, J. Elliot, R.R. Facklam, A. Schuchat, W. Baughman, and M.M. Farley**, Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. J Infect Dis, 1996. **173**(2): p. 365-73.
28. **Boackle, R.J., M.H. Connor, and J. Vesely**, High molecular weight non-immunoglobulin salivary agglutinins (NIA) bind C1Q globular heads and have the potential to activate the first complement component. Mol Immunol, 1993. **30**(3): p. 309-19.
29. **Bohnsack, J.F., J.K. Chang, and H.R. Hill**, Restricted ability of group B streptococcal C5a-ase to inactivate C5a prepared from different animal species. Infect Immun, 1993. **61**(4): p. 1421-6.
30. **Bohnsack, J.F., A.A. Whiting, G. Martinez, N. Jones, E.E. Adderson, S. Detrick, A.J. Blaschke-Bonkowsky, N. Bisharat, and M. Gottschalk**, Serotype III *Streptococcus agalactiae* from bovine milk and human neonatal infections. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(8): p. 1412-9.
31. **Bolduc, G.R., M.J. Baron, C. Gravekamp, C.S. Lachenauer, and L.C. Madoff**, The alpha C protein mediates internalization of group B Streptococcus within human cervical epithelial cells. Cell Microbiol, 2002. **4**(11): p. 751-8.
32. **Boone, T.J., C.A. Burnham, and G.J. Tyrrell**, Binding of group B streptococcal phosphoglycerate kinase to plasminogen and actin. Microb Pathog, 2011. **51**(4): p. 255-61.
33. **Botrel, M.A., M. Haenni, E. Morignat, E. Sulpice, J.Y. Madec, and D. Calavas**, Distribution and Antimicrobial Resistance of Clinical and Subclinical Mastitis Pathogens in Dairy Cows in Rhône-Alpes, France. Foodborne Pathog Dis, 2009. **00**.
34. **Brady, L.J., P.J. Crowley, J.K. Ma, C. Kelly, S.F. Lee, T. Lehner, and A.S. Bleiweis**, Restriction fragment length polymorphisms and sequence variation within the *spaP* gene of *Streptococcus mutans* serotype C isolates. Infect Immun, 1991. **59**(5): p. 1803-10.
35. **Brady, L.J., S.E. Maddocks, M.R. Larson, N. Forsgren, K. Persson, C.C. Deivanayagam, and H.F. Jenkinson**, The changing faces of Streptococcus antigen I/II polypeptide family adhesins. Mol Microbiol, 2010. **77**(2): p. 276-86.
36. **Brady, L.J., D.A. Piacentini, P.J. Crowley, P.C. Oyston, and A.S. Bleiweis**, Differentiation of salivary agglutinin-mediated adherence and aggregation of mutans streptococci by use of

monoclonal antibodies against the major surface adhesin P1. Infect Immun, 1992. **60**(3): p. 1008-17.

37. **Bramley, A.J. and E.M. Hogben**, The adhesion of human and bovine isolates of *Streptococcus agalactiae* (group B) to bovine mammary gland epithelial cells. J Comp Pathol, 1982. **92**(1): p. 131-7.
38. **Bramley, A.J., A.H. Patel, M. O'Reilly, R. Foster, and T.J. Foster**, Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. Infect Immun, 1989. **57**(8): p. 2489-94.
39. **Brenciani, A., E. Tiberi, A. Bacciaglia, D. Petrelli, P.E. Varaldo, and E. Giovanetti**, Two distinct genetic elements are responsible for erm(TR)-mediated erythromycin resistance in tetracycline-susceptible and tetracycline-resistant strains of *Streptococcus pyogenes.* Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(5): p. 2106-12.
40. **Brochet, M., E. Couve, P. Glaser, G. Guedon, and S. Payot**, Integrative conjugative elements and related elements are major contributors to the genome diversity of *Streptococcus agalactiae.* J Bacteriol, 2008. **190**(20): p. 6913-7.
41. **Brochet, M., E. Couve, M. Zouine, T. Vallaeys, C. Rusniok, M.C. Lamy, C. Buchrieser, P. Trieu-Cuot, F. Kunst, C. Poyart, and P. Glaser**, Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae.* Microbes Infect, 2006. **8**(5): p. 1227-43.
42. **Brochet, M., C. Rusniok, E. Couve, S. Dramsi, C. Poyart, P. Trieu-Cuot, F. Kunst, and P. Glaser**, Shaping a bacterial genome by large chromosomal replacements, the evolutionary history of *Streptococcus agalactiae.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(41): p. 15961-6.
43. **Brodeur, B.R., M. Boyer, I. Charlebois, J. Hamel, F. Couture, C.R. Rioux, and D. Martin**, Identification of group B streptococcal Sip protein, which elicits cross-protective immunity. Infect Immun, 2000. **68**(10): p. 5610-8.
44. **Brodin, P., I. Rosenkrands, P. Andersen, S.T. Cole, and R. Brosch**, ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? Trends Microbiol, 2004. **12**(11): p. 500-8.
45. **Broker, G. and B. Spellerberg**, Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and horizontal gene transfer. Int J Med Microbiol, 2004. **294**(2-3): p. 169-75.
46. **Brouwer, M.S., P.J. Warburton, A.P. Roberts, P. Mullany, and E. Allan**, Genetic organisation, mobility and predicted functions of genes on integrated, mobile genetic elements in sequenced strains of *Clostridium difficile.* PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23014.
47. **Brown, J., R. Farnsworth, L.W. Wannamaker, and D.W. Johnson**, CAMP factor of group B streptococci: production, assay, and neutralization by sera from immunized rabbits and experimentally infected cows. Infect Immun, 1974. **9**(2): p. 377-83.
48. **Bruggemann, H., A. Henne, F. Hoster, H. Liesegang, A. Wiezer, A. Strittmatter, S. Hujer, P. Durre, and G. Gottschalk**, The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. Science, 2004. **305**(5684): p. 671-3.
49. **Buckley, N.D., C. Vadeboncoeur, D.J. LeBlanc, L.N. Lee, and M. Frenette**, An effective strategy, applicable to *Streptococcus salivarius* and related bacteria, to enhance or confer electroporation competence. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(9): p. 3800-4.
50. **Bueno, S.M., C.A. Santiviago, A.A. Murillo, J.A. Fuentes, A.N. Trombert, P.I. Rodas, P. Youderian, and G.C. Mora**, Precise excision of the large pathogenicity island, SPI7, in *Salmonella enterica* serovar Typhi. J Bacteriol, 2004. **186**(10): p. 3202-13.
51. **Burnside, K., A. Lembo, M.I. Harrell, M. Gurney, L. Xue, N.T. BinhTran, J.E. Connelly, K.A. Jewell, B.Z. Schmidt, M. de los Reyes, W.A. Tao, K.S. Doran, and L. Rajagopal**, Serine/threonine phosphatase Stp1 mediates post-transcriptional regulation of hemolysin, autolysis, and virulence of group B Streptococcus. J Biol Chem, 2011. **286**(51): p. 44197-210.
52. **Burrus, V., C. Bontemps, B. Decaris, and G. Guedon**, Characterization of a novel type II restriction-modification system, *Sth368I*, encoded by the integrative element ICE*St1* of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(4): p. 1522-8.
53. **Burrus, V., G. Pavlovic, B. Decaris, and G. Guedon**, Conjugative transposons: the tip of the iceberg. Mol Microbiol, 2002. **46**(3): p. 601-10.

54. **Burrus, V., G. Pavlovic, B. Decaris, and G. Guedon**, The ICE*St1* element of *Streptococcus thermophilus* belongs to a large family of integrative and conjugative elements that exchange modules and change their specificity of integration. Plasmid, 2002. **48**(2): p. 77-97.
55. **Burrus, V., Y. Roussel, B. Decaris, and G. Guedon**, Characterization of a novel integrative element, ICE*St1*, in the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus.* Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(4): p. 1749-53.
56. **Burrus, V. and M.K. Waldor**, Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. Res Microbiol, 2004. **155**(5): p. 376-86.
57. **Burts, M.L., W.A. Williams, K. DeBord, and D.M. Missiakas**, 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, 2005. **102**(4): p. 1169-74.
58. **Butcher, B.G., Y.P. Lin, and J.D. Helmann**, The *yydFGHIJ* operon of *Bacillus subtilis* encodes a peptide that induces the LiaRS two-component system. J Bacteriol, 2007. **189**(23): p. 8616-25.
59. **Butler, K.M., C.J. Baker, and M.S. Edwards**, Interaction of soluble fibronectin with group B streptococci. Infect Immun, 1987. **55**(10): p. 2404-8.
60. **Carraro, N.**, Analyse comparative de la dynamique de deux éléments intégratifs conjugatifs de Streptococcus thermophilus. Université de Lorraine: Nancy, 2011. p. 204.
61. **Carraro, N., V. Libante, C. Morel, B. Decaris, F. Charron-Bourgoin, P. Leblond, and G. Guedon**, Differential regulation of two closely related integrative and conjugative elements from *Streptococcus thermophilus.* BMC Microbiol, 2011. **11**: p. 238.
62. **Caruso, M., L. Belloni, O. Sthandier, P. Amati, and M.I. Garcia**, Alpha4beta1 integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level. J Virol, 2003. **77**(7): p. 3913-21.
63. **Caruso, M., A. Busanello, O. Sthandier, M. Cavaldesi, M. Gentile, M.I. Garcia, and P. Amati**, Mutation in the VP1-LDV motif of the murine polyomavirus affects viral infectivity and conditions virus tissue tropism in vivo. J Mol Biol, 2007. **367**(1): p. 54-64.
64. **Cascales, E. and R. Lloubes**, Deletion analyses of the peptidoglycan-associated lipoprotein Pal reveals three independent binding sequences including a TolA box. Mol Microbiol, 2004. **51**(3): p. 873-85.
65. **Casjens, S.**, Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? Mol Microbiol, 2003. **49**(2): p. 277-300.
66. **Chen, I., P.J. Christie, and D. Dubnau**, The ins and outs of DNA transfer in bacteria. Science, 2005. **310**(5753): p. 1456-60.
67. **Chen, I. and D. Dubnau**, DNA uptake during bacterial transformation. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(3): p. 241-9.
68. **Cheng, Q., D. Stafslien, S.S. Purushothaman, and P. Cleary**, The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin. Infect Immun, 2002. **70**(5): p. 2408-13.
69. **Cherny, I., L. Rockah, and E. Gazit**, The YoeB toxin is a folded protein that forms a physical complex with the unfolded YefM antitoxin. Implications for a structural-based differential stability of toxin-antitoxin systems. J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 30063-72.
70. **Chhatwal, G.S., I.S. Dutra, and H. Blobel**, Fibrinogen binding inhibits the fixation of the third component of human complement on surface of groups A, B, C, and G streptococci. Microbiol Immunol, 1985. **29**(10): p. 973-80.
71. **Choi, I.G. and S.H. Kim**, Global extent of horizontal gene transfer. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(11): p. 4489-94.
72. **Choudhury, T.K.**, Synergistic lysis of erythrocytes by *Propionibacterium acnes.* J Clin Microbiol, 1978. **8**(2): p. 238-41.
73. **Christensen-Dalsgaard, M., M.G. Jorgensen, and K. Gerdes**, Three new RelE-homologous mRNA interferases of Escherichia coli differentially induced by environmental stresses. Mol Microbiol, 2010. **75**(2): p. 333-48.

74. **Christensen, S.K., G. Maenhaut-Michel, N. Mine, S. Gottesman, K. Gerdes, and L. Van Melderen**, Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in Escherichia coli: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system. Mol Microbiol, 2004. **51**(6): p. 1705-17.
75. **Christie, R.**, A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. Aust. J. Exp. Biol., 1944. **22**: p. 197-200.
76. **Ciric, L., M. Ellatif, P. Sharma, R. Patel, X. Song, P. Mullany, and A.P. Roberts**, Tn*916*-like elements from human, oral, commensal streptococci possess a variety of antibiotic and antiseptic resistance genes. Int J Antimicrob Agents, 2012. **39**(4): p. 360-1.
77. **Coburn, P.S., A.S. Baghdayan, G.T. Dolan, and N. Shankar**, Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. Mol Microbiol, 2007. **63**(2): p. 530-44.
78. **Cohan, F.M.**, Sexual isolation and speciation in bacteria. Genetica, 2002. **116**(2-3): p. 359-70.
79. **Collins, M.D., R.A. Hutson, E. Falsen, N. Nikolaitchouk, L. LaClaire, and R.R. Facklam**, An unusual Streptococcus from human urine, Streptococcus urinalis sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol, 2000. **50 Pt 3**: p. 1173-8.
80. **Comfort, D. and R.T. Clubb**, A comparative genome analysis identifies distinct sorting pathways in gram-positive bacteria. Infect Immun, 2004. **72**(5): p. 2710-22.
81. **Cordoba-Lopez, A., M.I. Bueno Alvarez-Arenas, J. Monterrubio-Villa, and G. Corcho-Sanchez**, *Streptococcus agalactiae* pleural empyema in a healthy adult. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2002. **20**(9): p. 478-9.
82. **Croucher, N.J., D. Walker, P. Romero, N. Lennard, G.K. Paterson, N.C. Bason, A.M. Mitchell, M.A. Quail, P.W. Andrew, J. Parkhill, S.D. Bentley, and T.J. Mitchell**, Role of conjugative elements in the evolution of the multidrug-resistant pandemic clone *Streptococcus pneumoniae* Spain23F ST81. J Bacteriol, 2009. **191**(5): p. 1480-9.
83. **Csukas, Z., B. Banizs, and F. Rozgonyi**, Studies on the cytotoxic effects of *Propionibacterium acnes* strains isolated from cornea. Microb Pathog, 2004. **36**(3): p. 171-4.
84. **Cue, D., H. Lam, and P.P. Cleary**, Genetic dissection of the Streptococcus pyogenes M1 protein: regions involved in fibronectin binding and intracellular invasion. Microb Pathog, 2001. **31**(5): p. 231-42.
85. **Cumley, N.J., L.M. Smith, M. Anthony, and R.C. May**, The CovS/CovR acid response regulator is required for intracellular survival of group B Streptococcus in macrophages. Infect Immun, 2012. **80**(5): p. 1650-61.
86. **Cvitkovitch, D.G., Y.H. Li, and R.P. Ellen**, Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. J Clin Invest, 2003. **112**(11): p. 1626-32.
87. **Daccord, A., D. Ceccarelli, and V. Burrus**, Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of Vibrio genomic islands. Mol Microbiol, 2010. **78**(3): p. 576-88.
88. **Daep, C.A., R.J. Lamont, and D.R. Demuth**, Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with oral streptococci requires a motif that resembles the eukaryotic nuclear receptor box protein-protein interaction domain. Infect Immun, 2008. **76**(7): p. 3273-80.
89. **Davies, M.R., J. Shera, G.H. Van Domselaar, K.S. Sriprakash, and D.J. McMillan**, A novel integrative conjugative element mediates genetic transfer from group G Streptococcus to other beta-hemolytic Streptococci. J Bacteriol, 2009. **191**(7): p. 2257-65.
90. **de la Cruz, F. and J. Davies**, Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. Trends Microbiol, 2000. **8**(3): p. 128-33.
91. **DeDent, A., T. Bae, D.M. Missiakas, and O. Schneewind**, Signal peptides direct surface proteins to two distinct envelope locations of *Staphylococcus aureus.* EMBO J, 2008. **27**(20): p. 2656-68.
92. **Demuth, D.R., E.E. Golub, and D. Malamud**, Streptococcal-host interactions. Structural and functional analysis of a *Streptococcus sanguis* receptor for a human salivary glycoprotein. J Biol Chem, 1990. **265**(13): p. 7120-6.

93. **Deprez, C., R. Lloubes, M. Gavioli, D. Marion, F. Guerlesquin, and L. Blanchard**, Solution structure of the E.coli TolA C-terminal domain reveals conformational changes upon binding to the phage g3p N-terminal domain. J Mol Biol, 2005. **346**(4): p. 1047-57.
94. **Dermer, P., C. Lee, J. Eggert, and B. Few**, A history of neonatal group B streptococcus with its related morbidity and mortality rates in the United States. J Pediatr Nurs, 2004. **19**(5): p. 357-63.
95. **Derouiche, R., M. Gavioli, H. Benedetti, A. Prilipov, C. Lazdunski, and R. Lloubes**, TolA central domain interacts with Escherichia coli porins. EMBO J, 1996. **15**(23): p. 6408-15.
96. **Devi, A.S. and K. Ponnuraj**, Cloning, expression, purification and ligand binding studies of novel fibrinogen-binding protein FbsB of *Streptococcus agalactiae.* Protein Expr Purif, 2010. **74**(2): p. 148-55.
97. **Dmitriev, A., L. Tkacikova, A. Suvorov, M. Kantikova, I. Mikula, and A. Totolyan**, Comparative genetic study of group B streptococcal strains of human and bovine origin. Folia Microbiol (Praha), 1999. **44**(4): p. 449-53.
98. **Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, and J. Hacker**, Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(5): p. 414-24.
99. **Dogan, B., Y.H. Schukken, C. Santisteban, and K.J. Boor**, Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. J Clin Microbiol, 2005. **43**(12): p. 5899-906.
100. **Doolittle, W.F.**, Lateral genomics. Trends Cell Biol, 1999. **9**(12): p. 5-8.
101. **Doran, K.S. and V. Nizet**, Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. Mol Microbiol, 2004. **54**(1): p. 23-31.
102. **Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale**, High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(13): p. 6127-45.
103. **Dramsi, S., E. Caliot, I. Bonne, S. Guadagnini, M.C. Prevost, M. Kojadinovic, L. Lalioui, C. Poyart, and P. Trieu-Cuot**, Assembly and role of pili in group B streptococci. Mol Microbiol, 2006. **60**(6): p. 1401-13.
104. **Dramsi, S., E. Morello, C. Poyart, and P. Trieu-Cuot**, Epidemiologically and clinically relevant Group B Streptococcus isolates do not bind collagen but display enhanced binding to human fibrinogen. Microbes Infect, 2012.
105. **Dramsi, S., P. Trieu-Cuot, and H. Bierne**, Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. Res Microbiol, 2005. **156**(3): p. 289-97.
106. **Duarte, R.S., R.R. Barros, R.R. Facklam, and L.M. Teixeira**, Phenotypic and genotypic characteristics of *Streptococcus porcinus* isolated from human sources. J Clin Microbiol, 2005. **43**(9): p. 4592-601.
107. **Dubey, G.P. and S. Ben-Yehuda**, Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. Cell, 2011. **144**(4): p. 590-600.
108. **Dubuisson, J.F., A. Vianney, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and J.C. Lazzaroni**, Tol-Pal proteins are critical cell envelope components of Erwinia chrysanthemi affecting cell morphology and virulence. Microbiology, 2005. **151**(Pt 10): p. 3337-47.
109. **Dunny, G.M.**, Genetic functions and cell-cell interactions in the pheromone-inducible plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis.* Mol Microbiol, 1990. **4**(5): p. 689-96.
110. **Dunny, G.M.**, The peptide pheromone-inducible conjugation system of Enterococcus faecalis plasmid pCF10: cell-cell signalling, gene transfer, complexity and evolution. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2007. **362**(1483): p. 1185-93.
111. **Dunny, G.M., D.L. Zimmerman, and M.L. Tortorello**, Induction of surface exclusion (entry exclusion) by Streptococcus faecalis sex pheromones: use of monoclonal antibodies to identify an inducible surface antigen involved in the exclusion process. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(24): p. 8582-6.
112. **Duremdez, R., A. Al-Marzouk, J.A. Qasem, A. Al-Harbi, and H. Gharabally**, Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, Pampus argenteus (Euphrasen), in Kuwait. J Fish Dis, 2004. **27**(5): p. 307-10.

113. **Edmond, K.M., C. Kortsalioudaki, S. Scott, S.J. Schrag, A.K. Zaidi, S. Cousens, and P.T. Heath**, Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. Lancet, 2012. **379**(9815): p. 547-56.
114. **Egea, L., L. Aguilera, R. Gimenez, M.A. Sorolla, J. Aguilar, J. Badia, and L. Baldoma**, Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(6): p. 1190-203.
115. **El-Huneidi, W., R. Mui, T.H. Zhang, and M. Palmer**, *Streptococcus agalactiae* CAMP factor/protein B does not bind to human IgG. Med Microbiol Immunol, 2007. **196**(2): p. 73-7.
116. **Erdogan, S., P.K. Fagan, S.R. Talay, M. Rohde, P. Ferrieri, A.E. Flores, C.A. Guzman, M.J. Walker, and G.S. Chhatwal**, Molecular analysis of group B protective surface protein, a new cell surface protective antigen of group B streptococci. Infect Immun, 2002. **70**(2): p. 803-11.
117. **Evans, J.J., J.F. Bohnsack, P.H. Klesius, A.A. Whiting, J.C. Garcia, C.A. Shoemaker, and S. Takahashi**, Phylogenetic relationships among *Streptococcus agalactiae* isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan. J Med Microbiol, 2008. **57**(Pt 11): p. 1369-76.
118. **Evans, J.J., D.J. Pasnik, P.H. Klesius, and S. Al-Ablani**, First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). J Wildl Dis, 2006. **42**(3): p. 561-9.
119. **Facklam, R.**, What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(4): p. 613-30.
120. **Facklam, R.R., J.F. Padula, E.C. Wortham, R.C. Cooksey, and H.A. Rountree**, Presumptive identification of group A, B, and D streptococci on agar plate media. J Clin Microbiol, 1979. **9**(6): p. 665-72.
121. **Farley, M.M.**, Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. Clin Infect Dis, 2001. **33**(4): p. 556-61.
122. **Fernandez, A., D. Lechardeur, A. Derre-Bobillot, E. Couve, P. Gaudu, and A. Gruss**, Two coregulated efflux transporters modulate intracellular heme and protoporphyrin IX availability in *Streptococcus agalactiae.* PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000860.
123. **Ferretti, J.J., W.M. McShan, D. Ajdic, D.J. Savic, G. Savic, K. Lyon, C. Primeaux, S. Sezate, A.N. Suvorov, S. Kenton, H.S. Lai, S.P. Lin, Y. Qian, H.G. Jia, F.Z. Najar, Q. Ren, H. Zhu, L. Song, J. White, X. Yuan, S.W. Clifton, B.A. Roe, and R. McLaughlin**, Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4658-63.
124. **Fettucciari, K., F. Quotadamo, R. Noce, C. Palumbo, A. Modesti, E. Rosati, R. Mannucci, A. Bartoli, and P. Marconi**, Group B Streptococcus (GBS) disrupts by calpain activation the actin and microtubule cytoskeleton of macrophages. Cell Microbiol, 2011. **13**(6): p. 859-84.
125. **Figura, N. and P. Guglielmetti**, Differentiation of motile and mesophilic Aeromonas strains into species by testing for a CAMP-like factor. J Clin Microbiol, 1987. **25**(7): p. 1341-2.
126. **Fontaine, M.C., J. Perez-Casal, X.M. Song, J. Shelford, P.J. Willson, and A.A. Potter**, Immunisation of dairy cattle with recombinant *Streptococcus uberis* GapC or a chimeric CAMP antigen confers protection against heterologous bacterial challenge. Vaccine, 2002. **20**(17-18): p. 2278-86.
127. **Forbes, J.R. and P. Gros**, Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. Trends Microbiol, 2001. **9**(8): p. 397-403.
128. **Ford, C.G., S. Kolappan, H.T. Phan, H.C. Winther-Larsen, and L. Craig**, Crystal Structures of CTX{varphi} pIII Unbound and in Complex with Vibrio cholerae TolA Reveal Novel Interaction Interfaces. J Biol Chem, 2012.

129. **Forsgren, N., R.J. Lamont, and K. Persson**, Two intramolecular isopeptide bonds are identified in the crystal structure of the Streptococcus gordonii SspB C-terminal domain. J Mol Biol, 2010. **397**(3): p. 740-51.
130. **Foulongne, V., S. Michaux-Charachon, E. Jumas-Bilak, D. O'Callaghan, and M. Ramuz**, [Strategies for bacterial virulence genes identification]. Pathol Biol (Paris), 2004. **52**(2): p. 104-14.
131. **Framson, P.E., A. Nittayajarn, J. Merry, P. Youngman, and C.E. Rubens**, New genetic techniques for group B streptococci: high-efficiency transformation, maintenance of temperature-sensitive pWV01 plasmids, and mutagenesis with Tn*917.* Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(9): p. 3539-47.
132. **Franken, C., G. Haase, C. Brandt, J. Weber-Heynemann, S. Martin, C. Lammler, A. Podbielski, R. Lutticken, and B. Spellerberg**, Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb.* Mol Microbiol, 2001. **41**(4): p. 925-35.
133. **Fredericks, D.N. and D.A. Relman**, Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. Clin Microbiol Rev, 1996. **9**(1): p. 18-33.
134. **Frey, J., J. Perrin, and J. Nicolet**, Cloning and expression of a co-hemolysin, the CAMP factor of *Actinobacillus pleuropneumoniae.* Infect Immun, 1989. **57**(7): p. 2050-6.
135. **Frost, A.J., D.D. Wanasinghe, and J.B. Woolcock**, Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland. Infect Immun, 1977. **15**(1): p. 245-53.
136. **Frost, L.S. and G. Koraimann**, Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. Future Microbiol, 2010. **5**(7): p. 1057-71.
137. **Frost, L.S., R. Leplae, A.O. Summers, and A. Toussaint**, Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(9): p. 722-32.
138. **Fuchs, P.C., C. Christy, and R.N. Jones**, Multiple-inocula (replicator) CAMP test for presumptive identification of group B streptococci. J Clin Microbiol, 1978. **7**(2): p. 232-3.
139. **Gaillot, O., C. Poyart, P. Berche, and P. Trieu-Cuot**, Molecular characterization and expression analysis of the superoxide dismutase gene from Streptococcus agalactiae. Gene, 1997. **204**(1-2): p. 213-8.
140. **Garriss, G., M.K. Waldor, and V. Burrus**, Mobile antibiotic resistance encoding elements promote their own diversity. PLoS Genet, 2009. **5**(12): p. e1000775.
141. **Gase, K., J.J. Ferretti, C. Primeaux, and W.M. McShan**, Identification, cloning, and expression of the CAMP factor gene (*cfa*) of group A streptococci. Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4725-31.
142. **Gaudu, P., K. Vido, B. Cesselin, S. Kulakauskas, J. Tremblay, L. Rezaiki, G. Lamberret, S. Sourice, P. Duwat, and A. Gruss**, Respiration capacity and consequences in Lactococcus lactis. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002. **82**(1-4): p. 263-9.
143. **Gerding, M.A., Y. Ogata, N.D. Pecora, H. Niki, and P.A. de Boer**, The trans-envelope Tol-Pal complex is part of the cell division machinery and required for proper outer-membrane invagination during cell constriction in E. coli. Mol Microbiol, 2007. **63**(4): p. 1008-25.
144. **Gibson, R.L., M.K. Lee, C. Soderland, E.Y. Chi, and C.E. Rubens**, Group B streptococci invade endothelial cells: type III capsular polysaccharide attenuates invasion. Infect Immun, 1993. **61**(2): p. 478-85.
145. **Giovanetti, E., A. Brenciani, E. Tiberi, A. Bacciaglia, and P.E. Varaldo**, ICE*Sp2905*, the erm(TR)-tet(O) element of *Streptococcus pyogenes*, is formed by two independent integrative and conjugative elements. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(1): p. 591-4.
146. **Glaser, P., C. Rusniok, C. Buchrieser, F. Chevalier, L. Frangeul, T. Msadek, M. Zouine, E. Couve, L. Lalioui, C. Poyart, P. Trieu-Cuot, and F. Kunst**, Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. Mol Microbiol, 2002. **45**(6): p. 1499-513.
147. **Godon, J.J., K. Jury, C.A. Shearman, and M.J. Gasson**, The *Lactococcus lactis* sex-factor aggregation gene *cluA.* Mol Microbiol, 1994. **12**(4): p. 655-63.

148. **Gogarten, J.P. and J.P. Townsend**, Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(9): p. 679-87.
149. **Gonzalez-Zorn, B., G. Dominguez-Bernal, M. Suarez, M.T. Ripio, Y. Vega, S. Novella, and J.A. Vazquez-Boland**, The *smcL* gene of *Listeria ivanovii* encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. Mol Microbiol, 1999. **33**(3): p. 510-23.
150. **Gould, K., C.H. Ramirez-Ronda, R.K. Holmes, and J.P. Sanford**, Adherence of bacteria to heart valves in vitro. J Clin Invest, 1975. **56**(6): p. 1364-70.
151. **Grady, R. and F. Hayes**, Axe-Txe, a broad-spectrum proteic toxin-antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate of Enterococcus faecium. Mol Microbiol, 2003. **47**(5): p. 1419-32.
152. **Green, N.M., S. Zhang, S.F. Porcella, M.J. Nagiec, K.D. Barbian, S.B. Beres, R.B. LeFebvre, and J.M. Musser**, Genome sequence of a serotype M28 strain of group a streptococcus: potential new insights into puerperal sepsis and bacterial disease specificity. J Infect Dis, 2005. **192**(5): p. 760-70.
153. **Grohmann, E., G. Muth, and M. Espinosa**, Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(2): p. 277-301, table of contents.
154. **Grossman, J. and R.L. Tompkins**, Group B beta-hemolytic streptococcal meningitis in mother and infant. N Engl J Med, 1974. **290**(7): p. 387-8.
155. **Gubash, S.M.**, Synergistic hemolysis phenomenon shown by an alpha-toxin-producing *Clostridium perfingens* and streptococcal CAMP factor in presumptive streptococcal grouping. J Clin Microbiol, 1978. **8**(5): p. 480-8.
156. **Guglielmini, J., L. Quintais, M.P. Garcillan-Barcia, F. de la Cruz, and E.P. Rocha**, The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. PLoS Genet, 2011. **7**(8): p. e1002222.
157. **Gurturk, K. and C. Lammler**, Purification and partial characterization of a co-haemolysin (CAMP-factor) produced by *Streptococcus canis.* FEMS Microbiol Immunol, 1990. **2**(2): p. 97-102.
158. **Gutekunst, H., B.J. Eikmanns, and D.J. Reinscheid**, The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. Infect Immun, 2004. **72**(6): p. 3495-504.
159. **Haas, D., J. Watson, R. Krieg, and T. Leisinger**, Isolation of an Hfr donor of Pseudomonas aeruginosa PAO by insertion of the plasmid RP1 into the tryptophan synthase gene. Mol Gen Genet, 1981. **182**(2): p. 240-4.
160. **Hacker, J. and E. Carniel**, Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. EMBO Rep, 2001. **2**(5): p. 376-81.
161. **Haenni, M., E. Saras, S. Bertin, P. Leblond, J.Y. Madec, and S. Payot**, Diversity and mobility of integrative and conjugative elements in bovine isolates of *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, and *S. uberis.* Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(24): p. 7957-65.
162. **Halvorsen, E.M., J.J. Williams, A.J. Bhimani, E.A. Billings, and P.J. Hergenrother**, Txe, an endoribonuclease of the enterococcal Axe-Txe toxin-antitoxin system, cleaves mRNA and inhibits protein synthesis. Microbiology, 2011. **157**(Pt 2): p. 387-97.
163. **Hamilton, H.L., N.M. Dominguez, K.J. Schwartz, K.T. Hackett, and J.P. Dillard**, *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. Mol Microbiol, 2005. **55**(6): p. 1704-21.
164. **Hanahan, D.**, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
165. **Harris, T.O., D.W. Shelver, J.F. Bohnsack, and C.E. Rubens**, A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. J Clin Invest, 2003. **111**(1): p. 61-70.

166. **Hassan, A.A., A. Abdulmawjood, A.O. Yildirim, K. Fink, C. Lammler, and R. Schlenstedt**, Identification of streptococci isolated from various sources by determination of *cfb* gene and other CAMP-factor genes. Can J Microbiol, 2000. **46**(10): p. 946-51.
167. **Hasty, D.L., I. Ofek, H.S. Courtney, and R.J. Doyle**, Multiple adhesins of streptococci. Infect Immun, 1992. **60**(6): p. 2147-52.
168. **Havarstein, L.S., G. Coomaraswamy, and D.A. Morrison**, An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(24): p. 11140-4.
169. **Heather, Z., M.T. Holden, K.F. Steward, J. Parkhill, L. Song, G.L. Challis, C. Robinson, N. Davis-Poynter, and A.S. Waller**, A novel streptococcal integrative conjugative element involved in iron acquisition. Mol Microbiol, 2008. **70**(5): p. 1274-92.
170. **Hensler, M.E., D. Quach, C.J. Hsieh, K.S. Doran, and V. Nizet**, CAMP factor is not essential for systemic virulence of Group B Streptococcus. Microb Pathog, 2008. **44**(1): p. 84-8.
171. **Hetzel, U., A. Konig, A.O. Yildirim, C. Lammler, and A. Kipar**, Septicaemia in emerald monitors (*Varanus prasinus* Schlegel 1839) caused by *Streptococcus agalactiae* acquired from mice. Vet Microbiol, 2003. **95**(4): p. 283-93.
172. **Heydorn, A., A.T. Nielsen, M. Hentzer, C. Sternberg, M. Givskov, B.K. Ersboll, and S. Molin**, Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. Microbiology, 2000. **146 (Pt 10)**: p. 2395-407.
173. **Hill, H.R., A.O. Shigeoka, N.H. Augustine, D. Pritchard, J.L. Lundblad, and R.S. Schwartz**, Fibronectin enhances the opsonic and protective activity of monoclonal and polyclonal antibody against group B streptococci. J Exp Med, 1984. **159**(6): p. 1618-28.
174. **Hochhut, B., J. Marrero, and M.K. Waldor**, Mobilization of plasmids and chromosomal DNA mediated by the SXT element, a constin found in *Vibrio cholerae* O139. J Bacteriol, 2000. **182**(7): p. 2043-7.
175. **Hoeffler, U.**, Enzymatic and hemolytic properties of *Propionibacterium acnes* and related bacteria. J Clin Microbiol, 1977. **6**(6): p. 555-8.
176. **Holden, M.T., H. Hauser, M. Sanders, T.H. Ngo, I. Cherevach, A. Cronin, I. Goodhead, K. Mungall, M.A. Quail, C. Price, E. Rabbinowitsch, S. Sharp, N.J. Croucher, T.B. Chieu, N.T. Mai, T.S. Diep, N.T. Chinh, M. Kehoe, J.A. Leigh, P.N. Ward, C.G. Dowson, A.M. Whatmore, N. Chanter, P. Iversen, M. Gottschalk, J.D. Slater, H.E. Smith, B.G. Spratt, J. Xu, C. Ye, S. Bentley, B.G. Barrell, C. Schultsz, D.J. Maskell, and J. Parkhill**, Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis.* PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6072.
177. **Holden, M.T., Z. Heather, R. Paillot, K.F. Steward, K. Webb, F. Ainslie, T. Jourdan, N.C. Bason, N.E. Holroyd, K. Mungall, M.A. Quail, M. Sanders, M. Simmonds, D. Willey, K. Brooks, D.M. Aanensen, B.G. Spratt, K.A. Jolley, M.C. Maiden, M. Kehoe, N. Chanter, S.D. Bentley, C. Robinson, D.J. Maskell, J. Parkhill, and A.S. Waller**, Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens. PLoS Pathog, 2009. **5**(3): p. e1000346.
178. **Holmes, A.R., R. McNab, and H.F. Jenkinson**, *Candida albicans* binding to the oral bacterium *Streptococcus gordonii* involves multiple adhesin-receptor interactions. Infect Immun, 1996. **64**(11): p. 4680-5.
179. **Holmes, A.R., R. McNab, K.W. Millsap, M. Rohde, S. Hammerschmidt, J.L. Mawdsley, and H.F. Jenkinson**, The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. Mol Microbiol, 2001. **41**(6): p. 1395-408.
180. **Horvath, P. and R. Barrangou**, CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. Science, 2010. **327**(5962): p. 167-70.
181. **Hsu, T., S.M. Hingley-Wilson, B. Chen, M. Chen, A.Z. Dai, P.M. Morin, C.B. Marks, J. Padiyar, C. Goulding, M. Gingery, D. Eisenberg, R.G. Russell, S.C. Derrick, F.M. Collins, S.L. Morris, C.H. King, and W.R. Jacobs, Jr.**, The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-

Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12420-5.

182. **Hu, M.X., X. Zhang, E.L. Li, and Y.J. Feng**, Recent advancements in toxin and antitoxin systems involved in bacterial programmed cell death. Int J Microbiol, 2010. **2010**: p. 781430.
183. **Hughes, M.J., J.C. Moore, J.D. Lane, R. Wilson, P.K. Pribul, Z.N. Younes, R.J. Dobson, P. Everest, A.J. Reason, J.M. Redfern, F.M. Greer, T. Paxton, M. Panico, H.R. Morris, R.G. Feldman, and J.D. Santangelo**, Identification of major outer surface proteins of *Streptococcus agalactiae.* Infect Immun, 2002. **70**(3): p. 1254-9.
184. **Hull, J.R., G.S. Tamura, and D.G. Castner**, Interactions of the streptococcal C5a peptidase with human fibronectin. Acta Biomater, 2008. **4**(3): p. 504-13.
185. **Ike, Y., S.E. Flannagan, and D.B. Clewell**, Hyperhemolytic phenomena associated with insertions of Tn916 into the hemolysin determinant of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1. J Bacteriol, 1992. **174**(6): p. 1801-9.
186. **Janzen, J.J.**, Economic losses resulting from mastitis. A review. J Dairy Sci, 1970. **53**(9): p. 1151-61.
187. **Jaworski, D.D. and D.B. Clewell**, A functional origin of transfer (oriT) on the conjugative transposon Tn*916.* J Bacteriol, 1995. **177**(22): p. 6644-51.
188. **Jenkinson, H.F. and D.R. Demuth**, Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. Mol Microbiol, 1997. **23**(2): p. 183-90.
189. **Jenkinson, H.F. and R.J. Lamont**, Streptococcal adhesion and colonization. Crit Rev Oral Biol Med, 1997. **8**(2): p. 175-200.
190. **Jenkinson, H.F., S.D. Terry, R. McNab, and G.W. Tannock**, Inactivation of the gene encoding surface protein SspA in *Streptococcus gordonii* DL1 affects cell interactions with human salivary agglutinin and oral actinomyces. Infect Immun, 1993. **61**(8): p. 3199-208.
191. **Jensen, N.E.**, Experimental bovine group-B streptococcal mastitis induced by strains of human and bovine origin. Nord Vet Med, 1982. **34**(12): p. 441-50.
192. **Jiang, M., L.A. Babiuk, and A.A. Potter**, Cloning, sequencing and expression of the CAMP factor gene of *Streptococcus uberis.* Microb Pathog, 1996. **20**(5): p. 297-307.
193. **Jiang, S., S.E. Park, P. Yadav, L.C. Paoletti, and M.R. Wessels**, Regulation and function of pilus island 1 in group B streptococcus. J Bacteriol, 2012. **194**(10): p. 2479-90.
194. **Jiang, S.M., M.J. Cieslewicz, D.L. Kasper, and M.R. Wessels**, Regulation of virulence by a two-component system in group B streptococcus. J Bacteriol, 2005. **187**(3): p. 1105-13.
195. **Jiang, S.M., N. Ishmael, J. Dunning Hotopp, M. Puliti, L. Tissi, N. Kumar, M.J. Cieslewicz, H. Tettelin, and M.R. Wessels**, Variation in the group B Streptococcus CsrRS regulon and effects on pathogenicity. J Bacteriol, 2008. **190**(6): p. 1956-65.
196. **Jin, H., Y.P. Song, G. Boel, J. Kochar, and V. Pancholi**, Group A streptococcal surface GAPDH, SDH, recognizes uPAR/CD87 as its receptor on the human pharyngeal cell and mediates bacterial adherence to host cells. J Mol Biol, 2005. **350**(1): p. 27-41.
197. **Jürgens, D.**, Unspecific binding of group B streptococcal co-cytolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. J Exp Med., 1987. **165**(3): p. 730-32.
198. **Juhas, M., D.W. Crook, and D.W. Hood**, Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. Cell Microbiol, 2008. **10**(12): p. 2377-86.
199. **Juhas, M., J.R. van der Meer, M. Gaillard, R.M. Harding, D.W. Hood, and D.W. Crook**, Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. FEMS Microbiol Rev, 2009. **33**(2): p. 376-93.
200. **Jurgens, D., F.Y. Shalaby, and F.J. Fehrenbach**, Purification and characterization of CAMP-factor from *Streptococcus agalactiae* by hydrophobic interaction chromatography and chromatofocusing. J Chromatogr, 1985. **348**(2): p. 363-70.
201. **Kamada, K. and F. Hanaoka**, Conformational change in the catalytic site of the ribonuclease YoeB toxin by YefM antitoxin. Mol Cell, 2005. **19**(4): p. 497-509.
202. **Kang, W. and K.B. Reid**, DMBT1, a regulator of mucosal homeostasis through the linking of mucosal defense and regeneration? FEBS Lett, 2003. **540**(1-3): p. 21-5.

203. **Karginov, F.V. and G.J. Hannon**, The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. Mol Cell, 2010. **37**(1): p. 7-19.
204. **Karlsson, F., C.A. Borrebaeck, N. Nilsson, and A.C. Malmborg-Hager**, The mechanism of bacterial infection by filamentous phages involves molecular interactions between TolA and phage protein 3 domains. J Bacteriol, 2003. **185**(8): p. 2628-34.
205. **Ke, D., C. Menard, F.J. Picard, M. Boissinot, M. Ouellette, P.H. Roy, and M.G. Bergeron**, Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. Clin Chem, 2000. **46**(3): p. 324-31.
206. **Kedzierska, B., L.Y. Lian, and F. Hayes**, Toxin-antitoxin regulation: bimodal interaction of YefM-YoeB with paired DNA palindromes exerts transcriptional autorepression. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(1): p. 325-39.
207. **Kehres, D.G., M.L. Zaharik, B.B. Finlay, and M.E. Maguire**, The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. Mol Microbiol, 2000. **36**(5): p. 1085-100.
208. **Kelly, C., P. Evans, L. Bergmeier, S.F. Lee, A. Progulske-Fox, A.C. Harris, A. Aitken, A.S. Bleiweis, and T. Lehner**, Sequence analysis of the cloned streptococcal cell surface antigen I/II. FEBS Lett, 1989. **258**(1): p. 127-32.
209. **Khare, B., V. Krishnan, K.R. Rajashankar, I.H. H, M. Xin, H. Ton-That, and S.V. Narayana**, Structural differences between the *Streptococcus agalactiae* housekeeping and pilus-specific sortases: SrtA and SrtC1. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e22995.
210. **Kluytmans, J., A. van Belkum, and H. Verbrugh**, Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(3): p. 505-20.
211. **Kobe, B. and A.V. Kajava**, The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(6): p. 725-32.
212. **Komoriya, A., L.J. Green, M. Mervic, S.S. Yamada, K.M. Yamada, and M.J. Humphries**, The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. J Biol Chem, 1991. **266**(23): p. 15075-9.
213. **Konto-Ghiorghi, Y., E. Mairey, A. Mallet, G. Dumenil, E. Caliot, P. Trieu-Cuot, and S. Dramsi**, Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae.* PLoS Pathog, 2009. **5**(5): p. e1000422.
214. **Krupovic, M., D. Prangishvili, R.W. Hendrix, and D.H. Bamford**, Genomics of bacterial and archaeal viruses: dynamics within the prokaryotic virosphere. Microbiol Mol Biol Rev, 2011. **75**(4): p. 610-35.
215. **Kurland, C.G.**, Something for everyone. Horizontal gene transfer in evolution. EMBO Rep, 2000. **1**(2): p. 92-5.
216. **Lalioui, L., E. Pellegrini, S. Dramsi, M. Baptista, N. Bourgeois, F. Doucet-Populaire, C. Rusniok, M. Zouine, P. Glaser, F. Kunst, C. Poyart, and P. Trieu-Cuot**, The SrtA Sortase of *Streptococcus agalactiae* is required for cell wall anchoring of proteins containing the LPXTG motif, for adhesion to epithelial cells, and for colonization of the mouse intestine. Infect Immun, 2005. **73**(6): p. 3342-50.
217. **Lammler, C. and H. Blobel**, Synergistic and antagonistic hemolytic reactions of bacterial proteins. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 1987. **100**(3): p. 95-9.
218. **Lammler, C., W. Gedek, and H. Blobel**, CAMP like reactions for presumptive identification of *Bacillus cereus* from bovines. Zentralbl Veterinarmed B, 1987. **34**(5): p. 395-6.
219. **Lamont, R.J., S. Gil, D.R. Demuth, D. Malamud, and B. Rosan**, Molecules of *Streptococcus gordonii* that bind to *Porphyromonas gingivalis.* Microbiology, 1994. **140 (Pt 4)**: p. 867-72.
220. **Lamy, M.C., M. Zouine, J. Fert, M. Vergassola, E. Couve, E. Pellegrini, P. Glaser, F. Kunst, T. Msadek, P. Trieu-Cuot, and C. Poyart**, CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence. Mol Microbiol, 2004. **54**(5): p. 1250-68.

221. **Lancefield, R.C.**, A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci. J Exp Med, 1933. **57**(4): p. 571-95.
222. **Lang, A.S. and J.T. Beatty**, The gene transfer agent of Rhodobacter capsulatus and "constitutive transduction" in prokaryotes. Arch Microbiol, 2001. **175**(4): p. 241-9.
223. **Lang, S. and M. Palmer**, Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38167-73.
224. **Lang, S., J. Xue, Z. Guo, and M. Palmer**, *Streptococcus agalactiae* CAMP factor binds to GPI-anchored proteins. Med Microbiol Immunol, 2007. **196**(1): p. 1-10.
225. **Lasa, I.**, Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. Int Microbiol, 2006. **9**(1): p. 21-8.
226. **Latasa, C., C. Solano, J.R. Penades, and I. Lasa**, Biofilm-associated proteins. C R Biol, 2006. **329**(11): p. 849-57.
227. **Laverde Gomez, J.A., A.P. Hendrickx, R.J. Willems, J. Top, I. Sava, J. Huebner, W. Witte, and G. Werner**, Intra- and interspecies genomic transfer of the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e16720.
228. **Lawrence, J.G. and H. Ochman**, Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9413-7.
229. **Lechardeur, D., A. Fernandez, B. Robert, P. Gaudu, P. Trieu-Cuot, G. Lamberet, and A. Gruss**, The 2-Cys peroxiredoxin alkyl hydroperoxide reductase c binds heme and participates in its intracellular availability in *Streptococcus agalactiae.* J Biol Chem, 2010. **285**(21): p. 16032-41.
230. **Lee, C.A., A. Babic, and A.D. Grossman**, Autonomous plasmid-like replication of a conjugative transposon. Mol Microbiol, 2010. **75**(2): p. 268-79.
231. **Lee, C.A., J. Thomas, and A.D. Grossman**, The *Bacillus subtilis* conjugative transposon ICE*Bs1* mobilizes plasmids lacking dedicated mobilization functions. J Bacteriol, 2012. **194**(12): p. 3165-72.
232. **Lembo, A., M.A. Gurney, K. Burnside, A. Banerjee, M. de los Reyes, J.E. Connelly, W.J. Lin, K.A. Jewell, A. Vo, C.W. Renken, K.S. Doran, and L. Rajagopal**, Regulation of CovR expression in Group B Streptococcus impacts blood-brain barrier penetration. Mol Microbiol, 2010. **77**(2): p. 431-43.
233. **Leplae, R., D. Geeraerts, R. Hallez, J. Guglielmini, P. Dreze, and L. Van Melderen**, Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(13): p. 5513-25.
234. **Letort, C. and V. Juillard**, Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of Streptococcus thermophilus. J Appl Microbiol, 2001. **91**(6): p. 1023-9.
235. **Lewis, K.**, Persister cells. Annu Rev Microbiol, 2010. **64**: p. 357-72.
236. **Lewis, K.N., R. Liao, K.M. Guinn, M.J. Hickey, S. Smith, M.A. Behr, and D.R. Sherman**, Deletion of RD1 from Mycobacterium tuberculosis mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. J Infect Dis, 2003. **187**(1): p. 117-23.
237. **Li, C., Y. Zhang, M. Vankemmelbeke, O. Hecht, F.S. Aleanizy, C. Macdonald, G.R. Moore, R. James, and C.N. Penfold**, Structural evidence that colicin A protein binds to a novel binding site of TolA protein in Escherichia coli periplasm. J Biol Chem, 2012. **287**(23): p. 19048-57.
238. **Li, M., X. Shen, J. Yan, H. Han, B. Zheng, D. Liu, H. Cheng, Y. Zhao, X. Rao, C. Wang, J. Tang, F. Hu, and G.F. Gao**, GI-type T4SS-mediated horizontal transfer of the 89K pathogenicity island in epidemic *Streptococcus suis* serotype 2. Mol Microbiol, 2011. **79**(6): p. 1670-83.
239. **Li, Y.H. and X. Tian**, Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. Sensors (Basel), 2012. **12**(3): p. 2519-38.
240. **Lin, F.Y., A. Whiting, E. Adderson, S. Takahashi, D.M. Dunn, R. Weiss, P.H. Azimi, J.B. Philips, 3rd, L.E. Weisman, J. Regan, P. Clark, G.G. Rhoads, C.E. Frasch, J. Troendle, P. Moyer, and J.F. Bohnsack**, Phylogenetic lineages of invasive and colonizing strains of serotype III group B Streptococci from neonates: a multicenter prospective study. J Clin Microbiol, 2006. **44**(4): p. 1257-61.

241. **Lin, W.J., D. Walthers, J.E. Connelly, K. Burnside, K.A. Jewell, L.J. Kenney, and L. Rajagopal**, Threonine phosphorylation prevents promoter DNA binding of the Group B Streptococcus response regulator CovR. Mol Microbiol, 2009. **71**(6): p. 1477-95.
242. **Lindahl, G., M. Stalhammar-Carlemalm, and T. Areschoug**, Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(1): p. 102-27.
243. **Lo, C.W., Y.K. Lai, Y.T. Liu, R.L. Gallo, and C.M. Huang**, *Staphylococcus aureus* hijacks a skin commensal to intensify its virulence: immunization targeting beta-hemolysin and CAMP factor. J Invest Dermatol, 2011. **131**(2): p. 401-9.
244. **Lopes, M.F., V.L. Merquior, J.M. Peralta, and L.M. Teixeira**, Partial characterization of the cohemolytic factor produced by *Streptococcus uberis* and comparison with the CAMP-factor. FEMS Immunol Med Microbiol, 1995. **12**(3-4): p. 205-12.
245. **Lopez-Sanchez, M.J., E. Sauvage, V. Da Cunha, D. Clermont, E. Ratsima Hariniaina, B. Gonzalez-Zorn, C. Poyart, I. Rosinski-Chupin, and P. Glaser**, The highly dynamic CRISPR1 system of Streptococcus agalactiae controls the diversity of its mobilome. Mol Microbiol, 2012.
246. **Lopez, D., H. Vlamakis, and R. Kolter**, Biofilms. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(7): p. a000398.
247. **Lorenz, M.G. and W. Wackernagel**, Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. Microbiol Rev, 1994. **58**(3): p. 563-602.
248. **Maddocks, S.E., C.J. Wright, A.H. Nobbs, J.L. Brittan, L. Franklin, N. Stromberg, A. Kadioglu, M.A. Jepson, and H.F. Jenkinson**, *Streptococcus pyogenes* antigen I/II-family polypeptide AspA shows differential ligand-binding properties and mediates biofilm formation. Mol Microbiol, 2011. **81**(4): p. 1034-49.
249. **Magalhaes, V., I. Veiga-Malta, M.R. Almeida, M. Baptista, A. Ribeiro, P. Trieu-Cuot, and P. Ferreira**, Interaction with human plasminogen system turns on proteolytic activity in *Streptococcus agalactiae* and enhances its virulence in a mouse model. Microbes Infect, 2007. **9**(11): p. 1276-84.
250. **Magnuson, R.D.**, Hypothetical functions of toxin-antitoxin systems. J Bacteriol, 2007. **189**(17): p. 6089-92.
251. **Maguin, E., P. Duwat, T. Hege, D. Ehrlich, and A. Gruss**, New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. J Bacteriol, 1992. **174**(17): p. 5633-8.
252. **Maisey, H.C., K.S. Doran, and V. Nizet**, Recent advances in understanding the molecular basis of group B Streptococcus virulence. Expert Rev Mol Med, 2008. **10**: p. e27.
253. **Maisey, H.C., M. Hensler, V. Nizet, and K.S. Doran**, Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. J Bacteriol, 2007. **189**(4): p. 1464-7.
254. **Maisey, H.C., D. Quach, M.E. Hensler, G.Y. Liu, R.L. Gallo, V. Nizet, and K.S. Doran**, A group B streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence. FASEB J, 2008. **22**(6): p. 1715-24.
255. **Makarem, R. and M.J. Humphries**, LDV: a novel cell adhesion motif recognized by the integrin alpha 4 beta 1. Biochem Soc Trans, 1991. **19**(4): p. 380S.
256. **Manning, S.D., A.C. Springman, A.D. Million, N.R. Milton, S.E. McNamara, P.A. Somsel, P. Bartlett, and H.D. Davies**, Association of Group B Streptococcus colonization and bovine exposure: a prospective cross-sectional cohort study. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8795.
257. **Manson, J.M., L.E. Hancock, and M.S. Gilmore**, Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(27): p. 12269-74.
258. **Marques, M.B., D.L. Kasper, M.K. Pangburn, and M.R. Wessels**, Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. Infect Immun, 1992. **60**(10): p. 3986-93.

259. **Marraffini, L.A., A.C. Dedent, and O. Schneewind**, Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. Microbiol Mol Biol Rev, 2006. **70**(1): p. 192-221.
260. **Marraffini, L.A. and E.J. Sontheimer**, CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. Nat Rev Genet, 2010. **11**(3): p. 181-90.
261. **Marrs, B.**, Genetic recombination in *Rhodopseudomonas capsulata.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(3): p. 971-3.
262. **Martin, B., Y. Quentin, G. Fichant, and J.P. Claverys**, Independent evolution of competence regulatory cascades in streptococci? Trends Microbiol, 2006. **14**(8): p. 339-45.
263. **Martin, D., S. Rioux, E. Gagnon, M. Boyer, J. Hamel, N. Charland, and B.R. Brodeur**, Protection from group B streptococcal infection in neonatal mice by maternal immunization with recombinant Sip protein. Infect Immun, 2002. **70**(9): p. 4897-901.
264. **Martins, E.R., C. Florindo, F. Martins, I. Aldir, M.J. Borrego, L. Brum, M. Ramirez, and J. Melo-Cristino**, *Streptococcus agalactiae* serotype Ib as an agent of meningitis in two adult nonpregnant women. J Clin Microbiol, 2007. **45**(11): p. 3850-2.
265. **Martins, E.R., J. Melo-Cristino, and M. Ramirez**, Dominance of serotype Ia among group B Streptococci causing invasive infections in nonpregnant adults in Portugal. J Clin Microbiol, 2012. **50**(4): p. 1219-27.
266. **Martins, E.R., M.A. Pessanha, M. Ramirez, and J. Melo-Cristino**, Analysis of group B streptococcal isolates from infants and pregnant women in Portugal revealing two lineages with enhanced invasiveness. J Clin Microbiol, 2007. **45**(10): p. 3224-9.
267. **Maruvada, R., L. Zhu, D. Pearce, A. Sapirstein, and K.S. Kim**, Host cytosolic phospholipase A(2)alpha contributes to group B Streptococcus penetration of the blood-brain barrier. Infect Immun, 2011. **79**(10): p. 4088-93.
268. **Matic, I., F. Taddei, and M. Radman**, Genetic barriers among bacteria. Trends Microbiol, 1996. **4**(2): p. 69-72.
269. **Matson, E.G., M.G. Thompson, S.B. Humphrey, R.L. Zuerner, and T.B. Stanton**, Identification of genes of VSH-1, a prophage-like gene transfer agent of *Brachyspira hyodysenteriae.* J Bacteriol, 2005. **187**(17): p. 5885-92.
270. **Matsuo, K., K. Nakatuka, Y. Yano, W. Fujishima, and K. Kashima**, Group B streptococcal metastatic endophthalmitis in an elderly man without predisposing illness. Jpn J Ophthalmol, 1998. **42**(4): p. 304-7.
271. **McCracken, G.H., Jr.**, Group B streptococci: the new challenge in neonatal infections. J Pediatr, 1973. **82**(4): p. 703-6.
272. **Mereghetti, L., I. Sitkiewicz, N.M. Green, and J.M. Musser**, Extensive adaptive changes occur in the transcriptome of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus) in response to incubation with human blood. PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3143.
273. **Mian, G.F., D.T. Godoy, C.A. Leal, T.Y. Yuhara, G.M. Costa, and H.C. Figueiredo**, Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in *Nile tilapia.* Vet Microbiol, 2009. **136**(1-2): p. 180-3.
274. **Milhas, D., C.J. Clarke, and Y.A. Hannun**, Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids. FEBS Lett, 2010. **584**(9): p. 1887-94.
275. **Mistou, M.Y., S. Dramsi, S. Brega, C. Poyart, and P. Trieu-Cuot**, Molecular dissection of the *secA2* locus of group B Streptococcus reveals that glycosylation of the Srr1 LPXTG protein is required for full virulence. J Bacteriol, 2009. **191**(13): p. 4195-206.
276. **Moisset, A., N. Schatz, Y. Lepoivre, S. Amadio, D. Wachsmann, M. Scholler, and J.P. Klein**, Conservation of salivary glycoprotein-interacting and human immunoglobulin G-cross-reactive domains of antigen I/II in oral streptococci. Infect Immun, 1994. **62**(1): p. 184-93.
277. **Morello, E., L.G. Bermudez-Humaran, D. Llull, V. Sole, N. Miraglio, P. Langella, and I. Poquet**, Lactococcus lactis, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. J Mol Microbiol Biotechnol, 2008. **14**(1-3): p. 48-58.

278. **Mouly, S., F. Berenbaum, and G. Kaplan**, Group B streptococcal vertebral osteomyelitis with bacteraemia in an adult with no debilitating condition. Scand J Infect Dis, 1999. **31**(3): p. 316-7.
279. **Nakai, M., N. Okahashi, H. Ohta, and T. Koga**, Saliva-binding region of *Streptococcus mutans* surface protein antigen. Infect Immun, 1993. **61**(10): p. 4344-9.
280. **Nakatsuji, T., D.C. Tang, L. Zhang, R.L. Gallo, and C.M. Huang**, *Propionibacterium acnes* CAMP factor and host acid sphingomyelinase contribute to bacterial virulence: potential targets for inflammatory acne treatment. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e14797.
281. **Necchi, F., V. Nardi-Dei, M. Biagini, M. Assfalg, A. Nuccitelli, R. Cozzi, N. Norais, J.L. Telford, C.D. Rinaudo, G. Grandi, and D. Maione**, Sortase A substrate specificity in GBS pilus 2a cell wall anchoring. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25300.
282. **Nes, I.F., D.B. Diep, and H. Holo**, Bacteriocin diversity in Streptococcus and Enterococcus. J Bacteriol, 2007. **189**(4): p. 1189-98.
283. **Neves da Silva, C.N., R.S. Carneiro de Araujo, and J.A. Araujo Filho**, *Streptococcus bovis* meningitis associated with colonic diverticulosis and hearing impairment: a case report. Infez Med, 2011. **19**(4): p. 262-5.
284. **Nielsen, K.M.**, Barriers to horizontal gene transfer by natural transformation in soil bacteria. APMIS Suppl, 1998. **84**: p. 77-84.
285. **Nieto, C., I. Cherny, S.K. Khoo, M.G. de Lacoba, W.T. Chan, C.C. Yeo, E. Gazit, and M. Espinosa**, The *yefM-yoeB* toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*: functional and structural correlation. J Bacteriol, 2007. **189**(4): p. 1266-78.
286. **Nobbs, A.H., R.J. Lamont, and H.F. Jenkinson**, Streptococcus adherence and colonization. Microbiol Mol Biol Rev, 2009. **73**(3): p. 407-50, Table of Contents.
287. **Nobbs, A.H., R. Rosini, C.D. Rinaudo, D. Maione, G. Grandi, and J.L. Telford**, Sortase A utilizes an ancillary protein anchor for efficient cell wall anchoring of pili in *Streptococcus agalactiae.* Infect Immun, 2008. **76**(8): p. 3550-60.
288. **Norton, J.P. and M.A. Mulvey**, Toxin-Antitoxin Systems Are Important for Niche-Specific Colonization and Stress Resistance of Uropathogenic Escherichia coli. PLoS Pathog, 2012. **8**(10): p. e1002954.
289. **O'Callaghan, R.J., M.C. Callegan, J.M. Moreau, L.C. Green, T.J. Foster, O.M. Hartford, L.S. Engel, and J.M. Hill**, Specific roles of alpha-toxin and beta-toxin during *Staphylococcus aureus* corneal infection. Infect Immun, 1997. **65**(5): p. 1571-8.
290. **Ochman, H., J.G. Lawrence, and E.A. Groisman**, Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature, 2000. **405**(6784): p. 299-304.
291. **Oliveira, L., P. Madureira, E.B. Andrade, A. Bouaboud, E. Morello, P. Ferreira, C. Poyart, P. Trieu-Cuot, and S. Dramsi**, Group B streptococcus GAPDH is released upon cell lysis, associates with bacterial surface, and induces apoptosis in murine macrophages. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29963.
292. **Olmsted, S.B., S.M. Kao, L.J. van Putte, J.C. Gallo, and G.M. Dunny**, Role of the pheromone-inducible surface protein Asc10 in mating aggregate formation and conjugal transfer of the Enterococcus faecalis plasmid pCF10. J Bacteriol, 1991. **173**(23): p. 7665-72.
293. **Onoyama, S., R. Ogata, A. Wada, M. Saito, K. Okada, and T. Harada**, Neonatal bacterial meningitis caused by *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus.* J Med Microbiol, 2009. **58**(Pt 9): p. 1252-4.
294. **Paavonen, J.**, Physiology and ecology of the vagina. Scand J Infect Dis Suppl, 1983. **40**: p. 31-5.
295. **Pallen, M.J.**, The ESAT-6/WXG100 superfamily -- and a new Gram-positive secretion system? Trends Microbiol, 2002. **10**(5): p. 209-12.
296. **Palmieri, C., G. Magi, M. Mingoia, P. Bagnarelli, S. Ripa, P.E. Varaldo, and B. Facinelli**, Characterization of a *Streptococcus suis* tet(O/W/32/O)-carrying element transferable to major streptococcal pathogens. Antimicrob Agents Chemother, 2012.

297. **Pancholi, V. and G.S. Chhatwal**, Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. Int J Med Microbiol, 2003. **293**(6): p. 391-401.
298. **Pancholi, V. and V.A. Fischetti**, A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. J Exp Med, 1992. **176**(2): p. 415-26.
299. **Pandey, D.P. and K. Gerdes**, Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(3): p. 966-76.
300. **Panek, H. and M.R. O'Brian**, A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. Microbiology, 2002. **148**(Pt 8): p. 2273-82.
301. **Papadopoulos, J.S. and R. Agarwala**, COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. Bioinformatics, 2007. **23**(9): p. 1073-9.
302. **Papasergi, S., S. Brega, M.Y. Mistou, A. Firon, V. Oxaran, R. Dover, G. Teti, Y. Shai, P. Trieu-Cuot, and S. Dramsi**, The GBS PI-2a pilus is required for virulence in mice neonates. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18747.
303. **Park, S.E., S. Jiang, and M.R. Wessels**, CsrRS and environmental pH regulate group B Streptococcus adherence to human epithelial cells and extracellular matrix. Infect Immun, 2012.
304. **Paterson, G.K., H. Northen, D.B. Cone, C. Willers, S.E. Peters, and D.J. Maskell**, Deletion of tolA in Salmonella Typhimurium generates an attenuated strain with vaccine potential. Microbiology, 2009. **155**(Pt 1): p. 220-8.
305. **Patterson, M.J. and A. El Batool Hafeez**, Group B streptococci in human disease. Bacteriol Rev, 1976. **40**(3): p. 774-92.
306. **Patti, J.M., B.L. Allen, M.J. McGavin, and M. Hook**, MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu Rev Microbiol, 1994. **48**: p. 585-617.
307. **Pavlovic, G., V. Burrus, B. Gintz, B. Decaris, and G. Guedon**, Evolution of genomic islands by deletion and tandem accretion by site-specific recombination: ICE*St1*-related elements from *Streptococcus thermophilus.* Microbiology, 2004. **150**(Pt 4): p. 759-74.
308. **Petrova, O.E. and K. Sauer**, Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. J Bacteriol, 2012. **194**(10): p. 2413-25.
309. **Phillips, E.A., J.W. Tapsall, and D.D. Smith**, Rapid tube CAMP test for identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B). J Clin Microbiol, 1980. **12**(2): p. 135-7.
310. **Pietrocola, G., A. Schubert, L. Visai, M. Torti, J.R. Fitzgerald, T.J. Foster, D.J. Reinscheid, and P. Speziale**, FbsA, a fibrinogen-binding protein from *Streptococcus agalactiae*, mediates platelet aggregation. Blood, 2005. **105**(3): p. 1052-9.
311. **Podbielski, A., O. Blankenstein, and R. Lutticken**, Molecular characterization of the *cfb* gene encoding group B streptococcal CAMP-factor. Med Microbiol Immunol, 1994. **183**(5): p. 239-56.
312. **Poquet, I., V. Saint, E. Seznec, N. Simoes, A. Bolotin, and A. Gruss**, HtrA is the unique surface housekeeping protease in Lactococcus lactis and is required for natural protein processing. Mol Microbiol, 2000. **35**(5): p. 1042-51.
313. **Poyart, C., E. Pellegrini, O. Gaillot, C. Boumaila, M. Baptista, and P. Trieu-Cuot**, Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae.* Infect Immun, 2001. **69**(8): p. 5098-106.
314. **Pracht, D., C. Elm, J. Gerber, S. Bergmann, M. Rohde, M. Seiler, K.S. Kim, H.F. Jenkinson, R. Nau, and S. Hammerschmidt**, PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. Infect Immun, 2005. **73**(5): p. 2680-9.
315. **Prakobphol, A., F. Xu, V.M. Hoang, T. Larsson, J. Bergstrom, I. Johansson, L. Frangsmyr, U. Holmskov, H. Leffler, C. Nilsson, T. Boren, J.R. Wright, N. Stromberg, and S.J. Fisher**, Salivary agglutinin, which binds *Streptococcus mutans* and *Helicobacter pylori*, is the lung scavenger receptor cysteine-rich protein gp-340. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 39860-6.
316. **Pulsford, M.F.**, Factors affecting the lysis of erythrocytes treated with staphylococcal beta toxin. Aust J Exp Biol Med Sci, 1954. **32**(3): p. 347-52.

317. **Que, Y.A., J.A. Haefliger, P. Francioli, and P. Moreillon**, Expression of *Staphylococcus aureus* clumping factor A in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* using a new shuttle vector. Infect Immun, 2000. **68**(6): p. 3516-22.
318. **Quesada-Gomez, C.**, Bacteroides mobilizable and conjugative genetic elements: antibiotic resistance among clinical isolates. Rev Esp Quimioter, 2011. **24**(4): p. 184-90.
319. **Quintas, E., M. Pantarotto, J. Moniz, N. Pardal, M.D. Pinheiro, M.H. Gomes, and A. Sarmento**, Infective endocarditis due to *Streptococcus gallolyticus* associated with colonic displasia. Acta Med Port, 2011. **24**(4): p. 657-62.
320. **Rajagopal, L.**, Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. Future Microbiol, 2009. **4**(2): p. 201-21.
321. **Rajagopal, L., A. Vo, A. Silvestroni, and C.E. Rubens**, Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signalling mechanisms in *Streptococcus agalactiae.* Mol Microbiol, 2006. **62**(4): p. 941-57.
322. **Rajagopal, L., A. Vo, A. Silvestroni, and C.E. Rubens**, Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic-type kinase in *Streptococcus agalactiae.* Mol Microbiol, 2005. **56**(5): p. 1329-46.
323. **Ramage, H.R., L.E. Connolly, and J.S. Cox**, Comprehensive functional analysis of Mycobacterium tuberculosis toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. PLoS Genet, 2009. **5**(12): p. e1000767.
324. **Ratner, H.B., L.S. Weeks, and C.W. Stratton**, Evaluation of spot CAMP test for identification of group B streptococci. J Clin Microbiol, 1986. **24**(2): p. 296-7.
325. **Reid, S.D., A.G. Montgomery, J.M. Voyich, F.R. DeLeo, B. Lei, R.M. Ireland, N.M. Green, M. Liu, S. Lukomski, and J.M. Musser**, Characterization of an extracellular virulence factor made by group A Streptococcus with homology to the *Listeria monocytogenes* internalin family of proteins. Infect Immun, 2003. **71**(12): p. 7043-52.
326. **Reiss, A., J.S. Braun, K. Jager, D. Freyer, G. Laube, C. Buhrer, U. Felderhoff-Muser, C. Stadelmann, V. Nizet, and J.R. Weber**, Bacterial pore-forming cytolysins induce neuronal damage in a rat model of neonatal meningitis. J Infect Dis, 2011. **203**(3): p. 393-400.
327. **Richards, V.P., P. Lang, P.D. Bitar, T. Lefebure, Y.H. Schukken, R.N. Zadoks, and M.J. Stanhope**, Comparative genomics and the role of lateral gene transfer in the evolution of bovine adapted *Streptococcus agalactiae.* Infect Genet Evol, 2011. **11**(6): p. 1263-75.
328. **Rinaudo, C.D., R. Rosini, C.L. Galeotti, F. Berti, F. Necchi, V. Reguzzi, C. Ghezzo, J.L. Telford, G. Grandi, and D. Maione**, Specific involvement of pilus type 2a in biofilm formation in group B Streptococcus. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9216.
329. **Rioux, S., D. Martin, H.W. Ackermann, J. Dumont, J. Hamel, and B.R. Brodeur**, Localization of surface immunogenic protein on group B streptococcus. Infect Immun, 2001. **69**(8): p. 5162-5.
330. **Rivera, J., G. Vannakambadi, M. Hook, and P. Speziale**, Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. Thromb Haemost, 2007. **98**(3): p. 503-11.
331. **Rizzo, A.M., P.A. Corsetto, G. Montorfano, S. Milani, S. Zava, S. Tavella, R. Cancedda, and B. Berra**, Effects of long-term space flight on erythrocytes and oxidative stress of rodents. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32361.
332. **Roberts, A.P. and P. Mullany**, Tn*916*-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev, 2011. **35**(5): p. 856-71.
333. **Roche, D., M. Flechard, N. Lallier, M. Reperant, A. Bree, G. Pascal, C. Schouler, and P. Germon**, ICE*Ec2*, a new integrative and conjugative element belonging to the pKLC102/PAGI-2 family, identified in *Escherichia coli* strain BEN374. J Bacteriol, 2010. **192**(19): p. 5026-36.
334. **Rodi, P.M., M.S. Cabeza, and A.M. Gennaro**, Detergent solubilization of bovine erythrocytes. Comparison between the insoluble material and the intact membrane. Biophys Chem, 2006. **122**(2): p. 114-22.
335. **Rodriguez-Blanco, A., M.L. Lemos, and C.R. Osorio**, Integrating conjugative elements as vectors of antibiotic, mercury, and quaternary ammonium compound resistance in marine aquaculture environments. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(5): p. 2619-26.

336. **Rosenau, A., K. Martins, S. Amor, F. Gannier, P. Lanotte, N. van der Mee-Marquet, L. Mereghetti, and R. Quentin**, Evaluation of the ability of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from genital and neonatal specimens to bind to human fibrinogen and correlation with characteristics of the *fbsA* and *fbsB* genes. Infect Immun, 2007. **75**(3): p. 1310-7.
337. **Rosini, R., C.D. Rinaudo, M. Soriani, P. Lauer, M. Mora, D. Maione, A. Taddei, I. Santi, C. Ghezzo, C. Brettoni, S. Buccato, I. Margarit, G. Grandi, and J.L. Telford**, Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae.* Mol Microbiol, 2006. **61**(1): p. 126-41.
338. **Rosvoll, T.C., T. Pedersen, H. Sletvold, P.J. Johnsen, J.E. Sollid, G.S. Simonsen, L.B. Jensen, K.M. Nielsen, and A. Sundsfjord**, PCR-based plasmid typing in Enterococcus faecium strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501- and pHTbeta-related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin-antitoxin systems. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010. **58**(2): p. 254-68.
339. **Rubens, C.E., H.V. Raff, J.C. Jackson, E.Y. Chi, J.T. Bielitzki, and S.L. Hillier**, Pathophysiology and histopathology of group B streptococcal sepsis in *Macaca nemestrina* primates induced after intra-amniotic inoculation: evidence for bacterial cellular invasion. J Infect Dis, 1991. **164**(2): p. 320-30.
340. **Rubens, C.E., S. Smith, M. Hulse, E.Y. Chi, and G. van Belle**, Respiratory epithelial cell invasion by group B streptococci. Infect Immun, 1992. **60**(12): p. 5157-63.
341. **Rubens, C.E., M.R. Wessels, L.M. Heggen, and D.L. Kasper**, Transposon mutagenesis of type III group B Streptococcus: correlation of capsule expression with virulence. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(20): p. 7208-12.
342. **Russell, M.W., L.A. Bergmeier, E.D. Zanders, and T. Lehner**, Protein antigens of *Streptococcus mutans*: purification and properties of a double antigen and its protease-resistant component. Infect Immun, 1980. **28**(2): p. 486-93.
343. **Sadowy, E., B. Matynia, and W. Hryniewicz**, Population structure, virulence factors and resistance determinants of invasive, non-invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* in Poland. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(9): p. 1907-14.
344. **Salyers, A.A., N.B. Shoemaker, A.M. Stevens, and L.Y. Li**, Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. Microbiol Rev, 1995. **59**(4): p. 579-90.
345. **Sambrook J FE, M.T.**, Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
346. **Samen, U., B.J. Eikmanns, D.J. Reinscheid, and F. Borges**, The surface protein Srr-1 of *Streptococcus agalactiae* binds human keratin 4 and promotes adherence to epithelial HEp-2 cells. Infect Immun, 2007. **75**(11): p. 5405-14.
347. **Samen, U., B. Heinz, H. Boisvert, B.J. Eikmanns, D.J. Reinscheid, and F. Borges**, Rga is a regulator of adherence and pilus formation in *Streptococcus agalactiae.* Microbiology, 2011. **157**(Pt 8): p. 2319-27.
348. **Samen, U.M., B.J. Eikmanns, and D.J. Reinscheid**, The transcriptional regulator RovS controls the attachment of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells and the expression of virulence genes. Infect Immun, 2006. **74**(10): p. 5625-35.
349. **Santi, I., M. Scarselli, M. Mariani, A. Pezzicoli, V. Masignani, A. Taddei, G. Grandi, J.L. Telford, and M. Soriani**, BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B Streptococcus survival in human blood. Mol Microbiol, 2007. **63**(3): p. 754-67.
350. **Sauer, K.**, The genomics and proteomics of biofilm formation. Genome Biol, 2003. **4**(6): p. 219.
351. **Schneewind, O., K. Friedrich, and R. Lutticken**, Cloning and expression of the CAMP factor of group B streptococci in *Escherichia coli.* Infect Immun, 1988. **56**(8): p. 2174-9.
352. **Schneewind, O. and D.M. Missiakas**, Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012. **367**(1592): p. 1123-39.

353. **Schrag, S.J., C.G. Whitney, and A. Schuchat**, Neonatal group B streptococcal disease: how infection control teams can contribute to prevention efforts. Infect Control Hosp Epidemiol, 2000. **21**(7): p. 473-83.
354. **Schubert, A., K. Zakikhany, G. Pietrocola, A. Meinke, P. Speziale, B.J. Eikmanns, and D.J. Reinscheid**, The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. Infect Immun, 2004. **72**(11): p. 6197-205.
355. **Schubert, A., K. Zakikhany, M. Schreiner, R. Frank, B. Spellerberg, B.J. Eikmanns, and D.J. Reinscheid**, A fibrinogen receptor from group B Streptococcus interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. Mol Microbiol, 2002. **46**(2): p. 557-69.
356. **Schubert, S., S. Dufke, J. Sorsa, and J. Heesemann**, A novel integrative and conjugative element (ICE) of *Escherichia coli:* the putative progenitor of the Yersinia high-pathogenicity island. Mol Microbiol, 2004. **51**(3): p. 837-48.
357. **Schuchat, A.**, Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(3): p. 497-513.
358. **Seifert, K.N., E.E. Adderson, A.A. Whiting, J.F. Bohnsack, P.J. Crowley, and L.J. Brady**, A unique serine-rich repeat protein (Srr-2) and novel surface antigen (epsilon) associated with a virulent lineage of serotype III *Streptococcus agalactiae.* Microbiology, 2006. **152**(Pt 4): p. 1029-40.
359. **Seifert, K.N., W.P. McArthur, A.S. Bleiweis, and L.J. Brady**, Characterization of group B streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: surface localization, enzymatic activity, and protein-protein interactions. Can J Microbiol, 2003. **49**(5): p. 350-6.
360. **Senpuku, H., T. Miyauchi, N. Hanada, and T. Nisizawa**, An antigenic peptide inducing cross-reacting antibodies inhibiting the interaction of *Streptococcus mutans* PAc with human salivary components. Infect Immun, 1995. **63**(12): p. 4695-703.
361. **Seo, H.S., R. Mu, B.J. Kim, K.S. Doran, and P.M. Sullam**, Binding of Glycoprotein Srr1 of Streptococcus agalactiae to Fibrinogen Promotes Attachment to Brain Endothelium and the Development of Meningitis. PLoS Pathog, 2012. **8**(10): p. e1002947.
362. **Sheen, T.R., A. Jimenez, N.Y. Wang, A. Banerjee, N.M. van Sorge, and K.S. Doran**, Serine-rich repeat proteins and pili promote *Streptococcus agalactiae* colonization of the vaginal tract. J Bacteriol, 2011. **193**(24): p. 6834-42.
363. **Shelver, D. and J.D. Bryan**, Expression of the *Streptococcus agalactiae* virulence-associated protease CspA in a soluble, active form utilizing the Gram-positive host, Lactococcus lactis. J Biotechnol, 2008. **136**(3-4): p. 129-34.
364. **Shome, B.R., M. Bhuvana, S.D. Mitra, N. Krithiga, R. Shome, D. Velu, A. Banerjee, S.B. Barbuddhe, K. Prabhudas, and H. Rahman**, Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis* isolates from bovine milk. Trop Anim Health Prod, 2012.
365. **Silverman, R.J., A.H. Nobbs, M.M. Vickerman, M.E. Barbour, and H.F. Jenkinson**, Interaction of *Candida albicans* cell wall Als3 protein with *Streptococcus gordonii* SspB adhesin promotes development of mixed-species communities. Infect Immun, 2010. **78**(11): p. 4644-52.
366. **Silvestroni, A., K.A. Jewell, W.J. Lin, J.E. Connelly, M.M. Ivancic, W.A. Tao, and L. Rajagopal**, Identification of serine/threonine kinase substrates in the human pathogen group B streptococcus. J Proteome Res, 2009. **8**(5): p. 2563-74.
367. **Singh, B., C. Fleury, F. Jalalvand, and K. Riesbeck**, Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. FEMS Microbiol Rev, 2012.
368. **Sinha, B., P. Francois, Y.A. Que, M. Hussain, C. Heilmann, P. Moreillon, D. Lew, K.H. Krause, G. Peters, and M. Herrmann**, Heterologously expressed Staphylococcus aureus fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 6871-8.
369. **Sitkiewicz, I., N.M. Green, N. Guo, A.M. Bongiovanni, S.S. Witkin, and J.M. Musser**, Adaptation of group A Streptococcus to human amniotic fluid. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9785.

370. **Sitkiewicz, I., N.M. Green, N. Guo, A.M. Bongiovanni, S.S. Witkin, and J.M. Musser**, Transcriptome adaptation of group B Streptococcus to growth in human amniotic fluid. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6114.
371. **Sitkiewicz, I., N.M. Green, N. Guo, L. Mereghetti, and J.M. Musser**, Lateral gene transfer of streptococcal ICE element RD2 (region of difference 2) encoding secreted proteins. BMC Microbiol, 2011. **11**: p. 65.
372. **Skalka, B. and J. Smola**, Lethal effect of CAMP-factor and UBERIS-factor: a new finding about diffusible exosubstances of *streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis.* Zentralbl Bakteriol A, 1981. **249**(2): p. 190-4.
373. **Smillie, C., M.P. Garcillan-Barcia, M.V. Francia, E.P. Rocha, and F. de la Cruz**, Mobility of plasmids. Microbiol Mol Biol Rev, 2010. **74**(3): p. 434-52.
374. **Smith, A.H., H.K. Sra, S. Bawa, and R. Stevens**, *Streptococcus bovis* meningitis and hemorrhoids. J Clin Microbiol, 2010. **48**(7): p. 2654-5.
375. **Smith, K., A. Perez, G. Ramage, D. Lappin, C.G. Gemmell, and S. Lang**, Biofilm formation by Scottish clinical isolates of Staphylococcus aureus. J Med Microbiol, 2008. **57**(Pt 8): p. 1018-23.
376. **Smyth, C.J., R. Mollby, and T. Wadstrom**, Phenomenon of hot-cold hemolysis: chelator-induced lysis of sphingomyelinase-treated erythrocytes. Infect Immun, 1975. **12**(5): p. 1104-11.
377. **Soedarmanto, I. and C. Lammler**, Comparative studies on streptococci of serological group G isolated from various origins. Zentralbl Veterinarmed B, 1996. **43**(9): p. 513-23.
378. **Sorek, R., Y. Zhu, C.J. Creevey, M.P. Francino, P. Bork, and E.M. Rubin**, Genome-wide experimental determination of barriers to horizontal gene transfer. Science, 2007. **318**(5855): p. 1449-52.
379. **Sorensen, M., T.N. Mak, R. Hurwitz, L.A. Ogilvie, H.J. Mollenkopf, T.F. Meyer, and H. Bruggemann**, Mutagenesis of *Propionibacterium acnes* and analysis of two CAMP factor knock-out mutants. J Microbiol Methods, 2010. **83**(2): p. 211-6.
380. **Sorensen, U.B., K. Poulsen, C. Ghezzo, I. Margarit, and M. Kilian**, Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones. MBio, 2010. **1**(3).
381. **Spellerberg, B., E. Rozdzinski, S. Martin, J. Weber-Heynemann, and R. Lutticken**, *rgf* encodes a novel two-component signal transduction system of *Streptococcus agalactiae.* Infect Immun, 2002. **70**(5): p. 2434-40.
382. **Spellerberg, B., E. Rozdzinski, S. Martin, J. Weber-Heynemann, N. Schnitzler, R. Lutticken, and A. Podbielski**, Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. Infect Immun, 1999. **67**(2): p. 871-8.
383. **Spirig, T., E.M. Weiner, and R.T. Clubb**, Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. Mol Microbiol, 2011. **82**(5): p. 1044-59.
384. **Stalhammar-Carlemalm, M., T. Areschoug, C. Larsson, and G. Lindahl**, The R28 protein of *Streptococcus pyogenes* is related to several group B streptococcal surface proteins, confers protective immunity and promotes binding to human epithelial cells. Mol Microbiol, 1999. **33**(1): p. 208-19.
385. **Stalhammar-Carlemalm, M., L. Stenberg, and G. Lindahl**, Protein rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. J Exp Med, 1993. **177**(6): p. 1593-603.
386. **Stanley, S.A., S. Raghavan, W.W. Hwang, and J.S. Cox**, Acute infection and macrophage subversion by Mycobacterium tuberculosis require a specialized secretion system. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 13001-6.
387. **Stanton, T.B.**, Prophage-like gene transfer agents-novel mechanisms of gene exchange for Methanococcus, Desulfovibrio, Brachyspira, and Rhodobacter species. Anaerobe, 2007. **13**(2): p. 43-9.

388. **Sterzik, B. and F.J. Fehrenbach**, Reaction components influencing CAMP factor induced lysis. J Gen Microbiol, 1985. **131**(4): p. 817-20.
389. **Sturt, A.S., L. Yang, K. Sandhu, Z. Pei, N. Cassai, and M.J. Blaser**, *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus* (biotype II/2), a newly reported cause of adult meningitis. J Clin Microbiol, 2010. **48**(6): p. 2247-9.
390. **Sukhnanand, S., B. Dogan, M.O. Ayodele, R.N. Zadoks, M.P. Craver, N.B. Dumas, Y.H. Schukken, K.J. Boor, and M. Wiedmann**, Molecular subtyping and characterization of bovine and human *Streptococcus agalactiae* isolates. J Clin Microbiol, 2005. **43**(3): p. 1177-86.
391. **Suzuki, H., T. Lefebure, M.J. Hubisz, P. Pavinski Bitar, P. Lang, A. Siepel, and M.J. Stanhope**, Comparative genomic analysis of the *Streptococcus dysgalactiae* species group: gene content, molecular adaptation, and promoter evolution. Genome Biol Evol, 2011. **3**: p. 168-85.
392. **Talay, S.R., P. Valentin-Weigand, P.G. Jerlstrom, K.N. Timmis, and G.S. Chhatwal**, Fibronectin-binding protein of Streptococcus pyogenes: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. Infect Immun, 1992. **60**(9): p. 3837-44.
393. **Tamura, G.S., J.M. Kuypers, S. Smith, H. Raff, and C.E. Rubens**, Adherence of group B streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. Infect Immun, 1994. **62**(6): p. 2450-8.
394. **Tapsall, J.W.**, *Streptococcus pyogenes* streptolysin O as a cause of false-positive CAMP reactions. J Clin Microbiol, 1984. **19**(4): p. 534-7.
395. **Tazi, A., S. Bellais, I. Tardieux, S. Dramsi, P. Trieu-Cuot, and C. Poyart**, Group B Streptococcus surface proteins as major determinants for meningeal tropism. Curr Opin Microbiol, 2012. **15**(1): p. 44-9.
396. **Tazi, A., O. Disson, S. Bellais, A. Bouaboud, N. Dmytruk, S. Dramsi, M.Y. Mistou, H. Khun, C. Mechler, I. Tardieux, P. Trieu-Cuot, M. Lecuit, and C. Poyart**, The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates. J Exp Med, 2010. **207**(11): p. 2313-22.
397. **Tazi, A., P.C. Morand, H. Reglier-Poupet, N. Dmytruk, A. Billoet, D. Antona, P. Trieu-Cuot, and C. Poyart**, Invasive group B streptococcal infections in adults, France (2007-2010). Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(10): p. 1587-9.
398. **Tenenbaum, T., C. Bloier, R. Adam, D.J. Reinscheid, and H. Schroten**, Adherence to and invasion of human brain microvascular endothelial cells are promoted by fibrinogen-binding protein FbsA of *Streptococcus agalactiae.* Infect Immun, 2005. **73**(7): p. 4404-9.
399. **Tenenbaum, T., B. Spellerberg, R. Adam, M. Vogel, K.S. Kim, and H. Schroten**, *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. Microbes Infect, 2007. **9**(6): p. 714-20.
400. **Tettelin, H., V. Masignani, M.J. Cieslewicz, C. Donati, D. Medini, N.L. Ward, S.V. Angiuoli, J. Crabtree, A.L. Jones, A.S. Durkin, R.T. Deboy, T.M. Davidsen, M. Mora, M. Scarselli, I. Margarit y Ros, J.D. Peterson, C.R. Hauser, J.P. Sundaram, W.C. Nelson, R. Madupu, L.M. Brinkac, R.J. Dodson, M.J. Rosovitz, S.A. Sullivan, S.C. Daugherty, D.H. Haft, J. Selengut, M.L. Gwinn, L. Zhou, N. Zafar, H. Khouri, D. Radune, G. Dimitrov, K. Watkins, K.J. O'Connor, S. Smith, T.R. Utterback, O. White, C.E. Rubens, G. Grandi, L.C. Madoff, D.L. Kasper, J.L. Telford, M.R. Wessels, R. Rappuoli, and C.M. Fraser**, Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae:* implications for the microbial "pan-genome". Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13950-5.
401. **Tettelin, H., V. Masignani, M.J. Cieslewicz, J.A. Eisen, S. Peterson, M.R. Wessels, I.T. Paulsen, K.E. Nelson, I. Margarit, T.D. Read, L.C. Madoff, A.M. Wolf, M.J. Beanan, L.M. Brinkac, S.C. Daugherty, R.T. DeBoy, A.S. Durkin, J.F. Kolonay, R. Madupu, M.R. Lewis, D. Radune, N.B. Fedorova, D. Scanlan, H. Khouri, S. Mulligan, H.A. Carty, R.T. Cline, S.E. Van Aken, J. Gill, M. Scarselli, M. Mora, E.T. Iacobini, C. Brettoni, G. Galli, M. Mariani, F. Vegni, D. Maione, D. Rinaudo, R. Rappuoli, J.L. Telford, D.L. Kasper, G. Grandi, and C.M. Fraser**,

Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12391-6.

402. **Thal, E. and G. Obiger**, The CAMP phenomenon of *Streptococcus agalactiae* and new serologic Streptococcus group "U" and other bacteria types. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 1969. **82**(7): p. 126-30.
403. **Thomas, C.M. and K.M. Nielsen**, Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(9): p. 711-21.
404. **Till, A.E., V. Goulden, W.J. Cunliffe, and K.T. Holland**, The cutaneous microflora of adolescent, persistent and late-onset acne patients does not differ. Br J Dermatol, 2000. **142**(5): p. 885-92.
405. **Titball, R.W.**, Bacterial phospholipases C. Microbiol Rev, 1993. **57**(2): p. 347-66.
406. **Toussaint, A. and M. Chandler**, Prokaryote genome fluidity: toward a system approach of the mobilome. Methods Mol Biol, 2012. **804**: p. 57-80.
407. **Toussaint, A. and C. Merlin**, Mobile elements as a combination of functional modules. Plasmid, 2002. **47**(1): p. 26-35.
408. **Treangen, T.J. and E.P. Rocha**, Horizontal transfer, not duplication, drives the expansion of protein families in prokaryotes. PLoS Genet, 2011. **7**(1): p. e1001284.
409. **Tremillon, N., N. Issaly, J. Mozo, T. Duvignau, H. Ginisty, E. Devic, and I. Poquet**, Production and purification of staphylococcal nuclease in Lactococcus lactis using a new expression-secretion system and a pH-regulated mini-reactor. Microb Cell Fact, 2010. **9**: p. 37.
410. **Truman, J.P., M.M. Al Gadban, K.J. Smith, and S.M. Hammad**, Acid sphingomyelinase in macrophage biology. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(20): p. 3293-305.
411. **Tsilibaris, V., G. Maenhaut-Michel, N. Mine, and L. Van Melderen**, What is the benefit to Escherichia coli of having multiple toxin-antitoxin systems in its genome? J Bacteriol, 2007. **189**(17): p. 6101-8.
412. **Tuller, T., Y. Girshovich, Y. Sella, A. Kreimer, S. Freilich, M. Kupiec, U. Gophna, and E. Ruppin**, Association between translation efficiency and horizontal gene transfer within microbial communities. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(11): p. 4743-55.
413. **Valanne, S., A. McDowell, G. Ramage, M.M. Tunney, G.G. Einarsson, S. O'Hagan, G.B. Wisdom, D. Fairley, A. Bhatia, J.F. Maisonneuve, M. Lodes, D.H. Persing, and S. Patrick**, CAMP factor homologues in *Propionibacterium acnes*: a new protein family differentially expressed by types I and II. Microbiology, 2005. **151**(Pt 5): p. 1369-79.
414. **Valenti-Weigand, P., P. Benkel, M. Rohde, and G.S. Chhatwal**, Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 macrophages. Infect Immun, 1996. **64**(7): p. 2467-73.
415. **Van den Heever, L.W. and W.H. Giesecke**, Experimental induction of bovine mastitis with human strains of group B streptococci (*streptococcus agalactiae*). J S Afr Vet Assoc, 1980. **51**(2): p. 107-9.
416. **van der Mee-Marquet, N., L. Fourny, L. Arnault, A.S. Domelier, M. Salloum, M.F. Lartigue, and R. Quentin**, Molecular characterization of human-colonizing *Streptococcus agalactiae* strains isolated from throat, skin, anal margin, and genital body sites. J Clin Microbiol, 2008. **46**(9): p. 2906-11.
417. **van Hoek, A.H., D. Mevius, B. Guerra, P. Mullany, A.P. Roberts, and H.J. Aarts**, Acquired antibiotic resistance genes: an overview. Front Microbiol, 2011. **2**: p. 203.
418. **van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson**, Membrane lipids: where they are and how they behave. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 112-24.
419. **Van Melderen, L.**, Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? Curr Opin Microbiol, 2010. **13**(6): p. 781-5.
420. **van Sorge, N.M., D. Quach, M.A. Gurney, P.M. Sullam, V. Nizet, and K.S. Doran**, The group B streptococcal serine-rich repeat 1 glycoprotein mediates penetration of the blood-brain barrier. J Infect Dis, 2009. **199**(10): p. 1479-87.

421. **Voskuil, M.I. and G.H. Chambliss**, The -16 region of Bacillus subtilis and other gram-positive bacterial promoters. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(15): p. 3584-90.
422. **Waldemarsson, J., T. Areschoug, G. Lindahl, and E. Johnsson**, The streptococcal Blr and Slr proteins define a family of surface proteins with leucine-rich repeats: camouflaging by other surface structures. J Bacteriol, 2006. **188**(2): p. 378-88.
423. **Wang, G., X. Li, and Z. Wang**, APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D933-7.
424. **Wang, H., A.P. Roberts, D. Lyras, J.I. Rood, M. Wilks, and P. Mullany**, Characterization of the ends and target sites of the novel conjugative transposon Tn*5397* from *Clostridium difficile*: excision and circularization is mediated by the large resolvase, TndX. J Bacteriol, 2000. **182**(13): p. 3775-83.
425. **Wang, X. and T.K. Wood**, Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(16): p. 5577-83.
426. **Ward, P.N., M.T. Holden, J.A. Leigh, N. Lennard, A. Bignell, A. Barron, L. Clark, M.A. Quail, J. Woodward, B.G. Barrell, S.A. Egan, T.R. Field, D. Maskell, M. Kehoe, C.G. Dowson, N. Chanter, A.M. Whatmore, S.D. Bentley, and J. Parkhill**, Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis.* BMC Genomics, 2009. **10**: p. 54.
427. **Wardal, E., E. Sadowy, and W. Hryniewicz**, Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids. Pol J Microbiol, 2010. **59**(2): p. 79-87.
428. **Wards, B.J., G.W. de Lisle, and D.M. Collins**, An esat6 knockout mutant of Mycobacterium bovis produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine. Tuber Lung Dis, 2000. **80**(4-5): p. 185-9.
429. **Wastfelt, M., M. Stalhammar-Carlemalm, A.M. Delisse, T. Cabezon, and G. Lindahl**, Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure. J Biol Chem, 1996. **271**(31): p. 18892-7.
430. **Waters, C.M., H. Hirt, J.K. McCormick, P.M. Schlievert, C.L. Wells, and G.M. Dunny**, An amino-terminal domain of *Enterococcus faecalis* aggregation substance is required for aggregation, bacterial internalization by epithelial cells and binding to lipoteichoic acid. Mol Microbiol, 2004. **52**(4): p. 1159-71.
431. **Webster, R.E.**, The tol gene products and the import of macromolecules into Escherichia coli. Mol Microbiol, 1991. **5**(5): p. 1005-11.
432. **Whitnack, E. and E.H. Beachey**, Degradation products of fibrinogen and fibrin prevent opsonization of group A streptococci. Trans Assoc Am Physicians, 1985. **98**: p. 392-8.
433. **Williams, K.P.**, Integration sites for genetic elements in prokaryotic tRNA and tmRNA genes: sublocation preference of integrase subfamilies. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(4): p. 866-75.
434. **Winram, S.B. and R. Lottenberg**, The plasmin-binding protein Plr of group A streptococci is identified as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Microbiology, 1996. **142 (Pt 8)**: p. 2311-20.
435. **Wiseman, G.M.**, Factors Affecting the Sensitization of Sheep Erythrocytes to Staphylococcal Beta Lysin. Can J Microbiol, 1965. **11**: p. 463-71.
436. **Wozniak, R.A., D.E. Fouts, M. Spagnoletti, M.M. Colombo, D. Ceccarelli, G. Garriss, C. Dery, V. Burrus, and M.K. Waldor**, Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. PLoS Genet, 2009. **5**(12): p. e1000786.
437. **Wozniak, R.A. and M.K. Waldor**, Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(8): p. 552-63.
438. **Wozniak, R.A. and M.K. Waldor**, A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. PLoS Genet, 2009. **5**(3): p. e1000439.
439. **Xu, P., J.M. Alves, T. Kitten, A. Brown, Z. Chen, L.S. Ozaki, P. Manque, X. Ge, M.G. Serrano, D. Puiu, S. Hendricks, Y. Wang, M.D. Chaplin, D. Akan, S. Paik, D.L. Peterson, F.L. Macrina, and G.A. Buck**, Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis.* J Bacteriol, 2007. **189**(8): p. 3166-75.

440. **Yamamoto, Y., V. Pargade, G. Lamberet, P. Gaudu, F. Thomas, J. Texereau, A. Gruss, P. Trieu-Cuot, and C. Poyart**, The Group B Streptococcus NADH oxidase Nox-2 is involved in fatty acid biosynthesis during aerobic growth and contributes to virulence. Mol Microbiol, 2006. **62**(3): p. 772-85.
441. **Yamamoto, Y., C. Poyart, P. Trieu-Cuot, G. Lamberet, A. Gruss, and P. Gaudu**, Respiration metabolism of Group B Streptococcus is activated by environmental haem and quinone and contributes to virulence. Mol Microbiol, 2005. **56**(2): p. 525-34.
442. **Yamamoto, Y., C. Poyart, P. Trieu-Cuot, G. Lamberet, A. Gruss, and P. Gaudu**, Roles of environmental heme, and menaquinone, in *Streptococcus agalactiae.* Biometals, 2006. **19**(2): p. 205-10.
443. **Yasmin, A., J.G. Kenny, J. Shankar, A.C. Darby, N. Hall, C. Edwards, and M.J. Horsburgh**, Comparative genomics and transduction potential of Enterococcus faecalis temperate bacteriophages. J Bacteriol, 2010. **192**(4): p. 1122-30.
444. **Yeh, Y.C., L.R. Comolli, K.H. Downing, L. Shapiro, and H.H. McAdams**, The caulobacter Tol-Pal complex is essential for outer membrane integrity and the positioning of a polar localization factor. J Bacteriol, 2010. **192**(19): p. 4847-58.
445. **Yildirim, A.O., C. Lammler, and R. Weiss**, Identification and characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from horses. Vet Microbiol, 2002. **85**(1): p. 31-5.
446. **Yildirim, A.O., C. Lammler, R. Weiss, and P. Kopp**, Pheno- and genotypic properties of streptococci of serological group B of canine and feline origin. FEMS Microbiol Lett, 2002. **212**(2): p. 187-92.
447. **Yim, G., H.H. Wang, and J. Davies**, The truth about antibiotics. Int J Med Microbiol, 2006. **296**(2-3): p. 163-70.
448. **Zhang, S., N.M. Green, I. Sitkiewicz, R.B. Lefebvre, and J.M. Musser**, Identification and characterization of an antigen I/II family protein produced by group A Streptococcus. Infect Immun, 2006. **74**(7): p. 4200-13.

ANNEXES

I. Liste des communications

- Les travaux de thèse font l'objet d'une publication dans la revue internationnale « PlosOne ». L'article a été accepté et est en cours de production.

Chuzeville, S., Puymège, A., Madec, J.Y., Haenni, M., Payot, S., Characterization of a New CAMP Factor Carried by an Integrative and Conjugative Element in *Streptococcus agalactiae* and Spreading in Streptococci. PlosONE, in press.

- Les travaux seront valorisés par la rédaction d'un article concernant les propriétés adhésives conférées par ICE_*515_tRNA*^{Lys}.

- Un article en co-auteur a été soumis au journal « Journal of bacteriology ».

Puymège, A., Bertin, S., **Chuzeville, S.**, Guédon, G., Payot, S., Conjugative transfer and cis-mobilization of a genomic island by an Integrative and Conjugative Element of *Streptococcus agalactiae*.

- Les travaux ont fait l'objet d'une présentation sous forme de poster au séminaire annuel de l'école doctorale RP2E, Université de Lorraine (année 2010).

Chuzeville, S., Haenni, M., Madec, J.Y., Payot, S., Caractérisation des fonctions codées par les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) intégrés dans le gène ARNt lysine chez *Streptococcus agalactiae* : rôle dans la stabilisation des ICE et la virulence, 2010, RP2E, 2010.

- Un poster en co-auteur a été présenté au congrès international sur les éléments transposables (ICTE 2012, International Congress on Transposable Elements, Saint Malo).

Puymège, A., Bertin, S., **Chuzeville, S.**, Guédon, G., Payot, S., Diversity, dynamic and mobility of integrative and conjugative elements (ICES) of *Streptococcus agalactiae,* ICTE, 2012.

II. Article PlosOne

Characterization of a New CAMP Factor Carried by an Integrative and Conjugative Element in *Streptococcus agalactiae* and Spreading in Streptococci.

Sarah Chuzeville[1,2,3], Aurore Puymège[2,3], Jean-Yves Madec[1], Marisa Haenni[1] and Sophie Payot[2,3]

Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, Anses Lyon, 31 Avenue Tony Garnier, F-69364 Lyon Cedex 07, France[1]; INRA, UMR1128 Génétique et Microbiologie, Faculté des Sciences et Technologies, Bd des Aiguillettes BP70239, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France[2]; and Université de Lorraine, UMR1128 Génétique et Microbiologie, Faculté des Sciences et Technologies, Bd des Aiguillettes BP70239, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France[3]

Corresponding author : sophie.payot@nancy.inra.fr

ABSTRACT

Genetic exchanges between Streptococci occur frequently and contribute to their genome diversification. Most of sequenced streptococcal genomes carry multiple mobile genetic elements including Integrative and Conjugative Elements (ICEs) that play a major role in these horizontal gene transfers. In addition to genes involved in their mobility and regulation, ICEs also carry genes that can confer selective advantages to bacteria. Numerous elements have been described in *S. agalactiae* especially those integrated at the 3' end of a $tRNA^{Lys}$ encoding gene. In strain 515 of *S. agalactiae*, an invasive neonate human pathogen, the ICE (called *515_tRNA*^{Lys}) is functional and carries different putative virulence genes including one encoding a putative new CAMP factor in addition to the one previously described. This work demonstrated the functionality of this CAMP factor (CAMP factor II) in *Lactococcus lactis* but also in pathogenic strains of veterinary origin. The search for co-hemolytic factors in a collection of field strains revealed their presence in *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, but also for the first time in *S. equisimilis* and *S. bovis*. Sequencing of these genes revealed the prevalence of a species-specific factor in *S. uberis* strains (Uberis factor) and the presence of a CAMP factor II encoding gene in *S. bovis* and *S. equisimilis*. Furthermore, most of the CAMP factor II positive strains also carried an element integrated in the $tRNA^{Lys}$ gene. This work thus describes a CAMP factor that is carried by a mobile genetic element and has spread to different streptococcal species.

KEYWORDS

CAMP factor; Virulence; ICE; Horizontal transfer; *Streptococcus agalactiae*; Streptococci

INTRODUCTION

S. agalactiae (group B Streptococci or GBS) is a human and animal opportunistic invasive pathogen. Cow mastitis caused by *S. agalactiae* was reported in 1887, while human infections were observed only 50 years later. GBS causes mastitis in cattle and septicemia, meningitis and endocarditis in humans [1-4]. It produces various virulence factors implicated in the adhesion and colonization steps, immune evasion and adaptation to the host environment [5,6]. In particular, GBS develops a characteristic arrow-shaped hemolysis when cultivated near *Staphylococcus aureus*, which is said to be due to an exosubstance named CAMP factor [7,8]. In fact, CAMP factor causes cell lysis when erythrocytes have been first sensitized by incubation with sphingomyelinase (SMase), a protein secreted by *S. aureus* and numerous other bacterial species [9]. SMases hydrolyse sphingomyelin, an erythrocyte membrane component, thus weakening the membrane if it contains at least 45% of sphingomyelin [10]. Therefore, rabbit, mouse and human erythrocytes (19, 25 and 27% of sphingomyelin) are not sensitive to CAMP factor, while goat, sheep and dairy cow erythrocytes (46, 51 and 52%, respectively) are [10,11]. The CAMP factor does not have an enzymatic activity but experiments showed that monomers could bind and oligomerize membrane components, in particular glycosylphosphotidylinositol (GPI) anchored proteins, thus forming a pore in the erythrocyte membrane [7,12].

Classification of the CAMP factor as a virulence factor according to the Koch postulates remains controversial since some authors have shown that injection of purified CAMP factor could increase mortality of rabbits and mice [13,14], while other authors could not demonstrate any effect of a deletion of the CAMP factor encoding gene (*cfb*) on GBS pathogenicity [15]. The *cfb* gene is ubiquitous in GBS strains so that CAMP test or search of the *cfb* gene by Polymerase Chain Reaction (PCR) was usually used to differentiate GBS from other *Streptococcus* species [16-19]. However, CAMP factor homologues were

described in other Gram positive species such as *S. pyogenes* [20], *S. uberis* [21], *S. porcinus* [22], *S. canis* [23] and *Propionibacterium acnes* [24].

In bacteria, horizontal transfers promote rapid genome evolution and may be involved in speciation [25-27]. In this way, 18% of the *Escherichia coli* genome has been acquired by horizontal transfer during the past 100 million years [28]. Mobile genetic elements include conjugative plasmids, phages, transposons, and Integrative and Conjugative Elements (ICEs). ICEs represent a family of mobile genetic elements consisting of clustered genes able to direct their own excision, transfer by conjugation and integration into the chromosome of recipient cell [29,30]. The integration of the element is most often site-specific. Recombination between repeated sequence sites *attR* and *attL* (R for right and L for Left) bordering the ICE brings into play an integrase by a mechanism similar to bacteriophage integration. The transfer displays similarity with conjugative plasmid transfer. In the recipient cell, the integrase catalyzes recombination between the *attI* site present on the circular shape of the ICE and the *attB* site present at target chromosomal site. After transfer, both donor and recipient cells have a copy of the ICE in their genome [29,30].

Interestingly, most of the ICEs already described encode additional functions conferring advantageous properties to the host strain, such as antimicrobial resistance, virulence or environmental adaptation [31]. Numerous works have shown that ICEs contribute to genome flexibility and that mobile genetic elements are prevalent in Streptococcus species such as *S. agalactiae* [32,33], *S. pyogenes* [34] and *S. pneumoniae* [35]. Genome analyses showed that *S. uberis* and *S. suis* genomes carry fewer mobile genetic elements than other streptococci, suggesting that it could restrict the acquisition of exogenous genetic elements in these species [36,37].

Sequencing of 8 GBS strain genomes, belonging to different serotypes causing major infections, highlighted the diversity of its variable gene pool [32]. Thirty five ICEs or related elements were detected, one hotspot of integration being the 3' extremity of a $tRNA^{Lys}$ gene [33]. Many of the proteins encoded by these elements share a high identity with proteins produced by *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* or *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. ICE prevalence in *S. agalactiae* was confirmed in various field strains belonging to different clonal complexes in particular for the ICE integrated at the $tRNA^{Lys}$ site which was also detected in other streptococci [33,38].

A GBS strain isolated from cattle infection was sequenced and genome analysis revealed distinct genetic diversity when compared with strains from humans [39]. Data suggest that genetic exchanges between veterinary and human strains may be infrequent, except in case of prolonged contact [32,40]. Demonstration of transfers between this bovine strain of *S. agalactiae* and other cattle pathogens (*S. uberis* and *S. dysgalactiae*) suggests a high rate of horizontal transfer between strains occurring in the same environment [39]. Thus, interspecies transfer is likely to be frequent, thus enabling the transfer of functions useful for the adaptation to the host environment [41-45].

This work aims to characterize a putative new CAMP factor carried by an ICE (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) of *S. agalactiae*. ICE_*515_tRNA*^{Lys} was recently demonstrated to be functional and able to autonomously transfer by conjugation to other S. *agalactiae* strains (A. Puymege, submitted for publication).

Here, we demonstrated the functionality of this CAMP factor II in non pathogenic and pathogenic strains. Our work also highlights the spread of CAMP factor II among other field pathogenic streptococci of veterinary origin, as expected for a mobile genetic element.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, media and growth conditions

The 515 GBS strain of serotype Ia [32] and NEM316 GBS strain of serotype III [46], two invasive neonate human pathogenic strains were used in this study (GenBank accession no. PRJNA54311 and PRJNA334 respectively). Strain 515 was isolated from the cerebrospinal fluid of an infected patient while strain NEM316 was isolated from a case of fatal septicaemia. The field pathogenic streptococci used (n=677) were isolated through the National Network for the Surveillance of Resistance to Antimicrobials in Animals in France (Resapath, www.resapath.anses.fr) between 1984 and 2011. This collection includes isolates of *S. uberis* (n=449); *S. dysgalactiae* (n=162); *S. bovis* (n=31); *S. suis* (n=26) and *S. equisimilis* (n=9). *E. coli* strains were used for the cloning experiments. Strains and their characteristics are listed in Supp. Information Table S1. Streptococci and *E. coli* strains were grown in Brain Hearth Infusion (BHI) (AES CHEMUNEX, Bruz, France) or on Tryptic soy agar plates supplemented with 5% of defibrinated sheep blood (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Lactococcal strains were grown in M17 medium (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) supplemented with 0.25% glucose either in liquid medium or on agar plates. Antibiotics were used at the following concentrations: kanamycin, 50 $\mu g.mL^{-1}$ for *E. coli*; erythromycin, 20 $\mu g.mL^{-1}$ for streptococci and lactococci and 150 $\mu g.mL^{-1}$ for *E. coli*. Streptococci and lactococci were grown without shaking in flasks at 37°C and 30°C, respectively, while *E. coli* was grown in flasks with shaking at 37°C.

Transconjugant construction

ICE_*515_tRNA*^{Lys} was tagged at its left hand side (in the SAG2026 gene encoding the ATPase part of an ABC transporter) by a resistance gene using the pG+host9spc vector. Vector

pG+host9spc is a derivative of the pG+host9 plasmid carrying a spectinomycin resistance gene from the pSET4S plasmid (Bellanger pers. comm.) [47]. To construct the mutant, the 5' and 3' ends of SAG2026 gene were independently amplified by PCR (using primers SAG2026-1-*Hin*dIII, SAG2026-2-*Avr*II, SAG2026-3-*Avr*II and SAG2026-4-*Eco*RI). An erythromycin resistance gene amplified from pG+host9 was inserted in the internal *Avr*II site and the whole insert (containing the two SAG2026 fragments separated by the *ery* cassette) was then cloned into pG+host9spc to give pG+host9spc-SAG2026ery, which was used to transform *S. agalactiae* by electroporation [48]. Two crossovers, upstream and downstream of the tagged region, were selected as described previously to obtain replacement of the gene by the *ery* resistance gene [41]. The tagged ICE was then transferred to the recipient strain by filter mating as described by Bellanger *et al.* [41] with minor modifications. Briefly, both donor and recipient strains were grown overnight. A 15 mL-culture of the relevant broth was inoculated with 150 µL of overnight culture of the recipient or the donor strain. Cultures were grown at the relevant temperature until mid-exponential phase (optical density at 600 nm of 0.4). Cultures of the donor and recipient were mixed and centrifuged for 15 min in a prewarmed centrifuge at 4,500 × *g*. The pellet was resuspended in 1 mL of BHI broth, and 150 µL aliquots were spread onto 0.45 µm-pore-size nitrocellulose filters (Sartorius, Goettingen, Germany) on tryptic soy blood agar plates which were incubated for 14 h at 37°C. The filters were removed from the agar plates, placed in 50 mL bottles containing 10 mL of sterile BHI broth, and vortexed for 30 s. Various dilutions were spread on blood agar plates supplemented with the appropriate antibiotics, and plates were incubated for 24 h in order to count CFU of the donor, the recipient, and the transconjugants.

RT-PCR

The expression of the SAL_2074 gene, which encodes the putative new CAMP factor on the ICE_*515_tRNA*^{Lys} genetic element, was examined by RT-PCR. Briefly, a 10 mL-preculture was grown overnight at 37°C and seeded at 1:100 ratio in 10 mL of BHI or M17 liquid medium. Two mL of cell pellets were collected at OD_{600}=0.4 and 0.8 by centrifugation at 2000 × *g* at 4°C and conserved by a quick freezing at -80°C. RNA samples were purified using the RNAeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) before being treated with the RQ1 RNase free DNase (Promega, Madison, USA) for 1 hour. DNA was synthesized using the M-MLV retro-transcriptase (In Vitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA). Conventional PCR were done using cDNA as templates for DNA polymerase (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) as described earlier [49].

Analysis of the supernatants by SDS-PAGE and mass spectrometry

Supernatant of *S. agalactiae* NEM316 and NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) cultures grown overnight in BHI or chemically defined medium (CDM, peptide-free medium, [50]) were collected after centrifugation at 5000 × *g* at 4°C for 10 min. Proteins were precipitated using a sodium deoxycholate (DOC) - trichloroacetic acid (TCA) protocol [51]. Briefly, DOC was added to a final concentration of 0.02% to 30 mL of supernatant. After mixing and a 30 min-sitting on ice, TCA was added to a final concentration of 10% and the proteins were precipitated overnight at 4°C. The mixed protein-detergent precipitate was collected by centrifugation (14,000 × *g*, 15 min, 4°C). The supernatant was carefully removed and washed two times with cold acetone (stored at -20°C). Pellets were dried under vacuum and resuspended in SDS gel loading buffer (50 mM Tris HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue and 100 mM DTT) (to reach a 250-fold concentration for cultures grown in BHI and a 1000-fold concentration for CDM cultures). After a 10 min-denaturation step at 98°C, proteins (15 µL of sample) were size-separated by sodium dodecyl sulphate-

polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using a 12% acrylamide resolving gel. Bands of interest were excised from the gel and processed as follows for protein content identification. After cysteine reduction (DTT 30 mM, 100 mM ammonium bicarbonate BA) and alkylation (30 mM iodoacetamide in BA), bands were washed twice in BA and BA/ acetonitrile (1:1) and then dried under vacuum before overnight trypsin digestion (in BA). Peptides were then extracted twice in acetonitrile 80%, trifluoroacetic acid (TFA), dried under vacuum and resuspended in a solution of 2% acetonitrile and 0.1% TFA.

HPLC was performed using an Ultimate 3000 equipment (Dionex). Peptides were loaded onto an Acclaim pepmap RSLC C18 column (Dionex) and eluted by a 2-45% acetonitrile linear gradient. Fractions were collected onto a 384 anchorchip MALDI plate via a Proteineer FcII fractionator (Bruker) and mixed with α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid directly upon deposition. Sample acquisition in TOF and TOF/TOF modes was performed automatically on an Autoflex speed MALDI mass spectrometer (Bruker). Peptide assignments, protein identification and scoring were managed on a Proteinscape server (allowing a 50 ppm tolerance for mass measurements) through interrogation of the NCBI nr database on a local Mascot server.

Plasmid pOri23-camp^{515} construction and transformation

Characteristics of the pOri23 plasmid [52] are listed in Supp. Information Table S1. Cloning steps were performed using *E. coli* as host strain. Chromosomal DNA from *S. agalactiae* 515 was prepared using DNAeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The CAMP factor II encoding gene (SAL_2074), as well as its endogenous RBS and terminator sites, was amplified using the Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Keilaranta, Finland) and primers CAMP factor

ICE_*515_tRNA*^{Lys} *Bam*HI fwd and CAMP factor ICE_*515_tRNA*^{Lys} *Nsi*I Rev (Supp. Information Table S2). *Bam*HI and *Nsi*I restriction sites were incorporated at the 5' end of each primer in order to allow the final ligation. The 922 bp PCR fragment was verified on agarose gel and subcloned using Zero Blunt® TOPO® in chemically competent Top10 cells (In Vitrogen life Technologies, Carlsbad, USA). The obtained vector was extracted using NucleoSpin® Plasmid columns (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and digested by *Bam*HI and *Nsi*I restriction enzymes (Promega, Madison, USA). The digested SAL_2074 insert was purified on NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up columns (Macherey-Nagel, Düren, Germany). In parallel, native pOri23 was digested using *Bam*HI and *Pst*I enzymes, ligated to the SAL_2074 insert using T4 DNA ligase (Promega, Madison, USA) and transformed by electroporation into DH5α *E. coli* strain as described [49,53]. Finally, the pOri23-camp^{515} was purified and electroporated into *L. lactis*, *S. bovis* and *S. dysgalactiae* strains as described previously [52,54].

PCR screening of ICE_*515_tRNA*^{Lys} genes in strain collections.

Chromosomal DNA from bacterial strains used in this study was prepared using DNAeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions, and was used as template for DNA amplification. Standards PCR were performed in a final volume of 25 µL containing 1 U of Taq (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), polymerase buffer 1 ×, 0.4 mM primers, 0.2 mM dNTP mix and 100 ng of DNA template. Primers used in this study are listed in Supp. Information Table S2. PCR conditions consisted in a first denaturation step at 95°C for 2 min followed by 30 cycles, each composed of a denaturation step at 95°C for 30 s, an annealing step at 5°C below primer's Tm for 30 s and an elongation step at 72°C for 1 min per kb with a final extension step of 10 min at 72°C.

Sequencing reactions were performed by Beckman Coulter Genomics and data were treated using BioEdit free Software.

Long range PCRs were performed using GoTaq® Long PCR Master Mix (Promega, Madison, USA). PCR conditions consisted of a first denaturation step at 94°C for 2 min, followed by 20 cycles each composed of a denaturation step at 94°C for 30 s, an annealing step at 5°C below primer's Tm for 30 s and an elongation step at 65°C for 30 min, and followed by 15 cycles with an increment of 30 s at each elongation step. The final elongation step lasts 20 min at 72°C. 1 µL of the amplification products was used as template for nested PCR which were performed as standards PCR.

CAMP reaction test

Strains were screened for CAMP activity as previously described [8]. Briefly, the beta-toxin producing strain *S. aureus* CIP 57.10 (Institut Pasteur, Paris) was streaked on 5% sheep blood agar Tryptic soy plates and strains to be tested were streaked perpendicularly to the first streak. After overnight incubation at 37°C, strains producing CAMP factor developed a characteristic arrow-shaped hemolysis.

Hemolytic co-reaction monitoring

The co-hemolysis assays were performed using microtiter plates (NUNC immuno plate Maxisorb, Roskilde, Denmark) as previously described with minor modifications [55]. Briefly, a suspension of sheep erythrocytes (Biomérieux, Marcy l'étoile, France) was washed 5 times in hemolysis buffer (Tris-HCl, 10 mM; NaCl, 150 mM; pH 7.4) by centrifuging 30 min at 2000 × *g* and then diluted in hemolysis buffer (1:100). This suspension was treated with 0.025 U/mL of *S. aureus* sphingomyelinase (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) for 30

min at 37°C and then 100 µL were distributed in flat-bottomed wells. Bacterial suspensions were grown up to an OD_{600} of 0.8 and culture supernatants were collected by centrifugation 10 min at 2000 × *g* and then0.2 µm-filtered. A 100 µL-volume of each supernatant was distributed in wells.

Co-hemolytic activity of CAMP factor II correlates with the loss of integrity of sheep erythrocytes visualized as a decrease in optical density measured at 630 nm (Biotek ELx808). In these experiments, controls were realized using *S. agalactiae* 515 strain as positive control and samples without sphingomyelinase treatment as negative controls.

RESULTS AND DISCUSSION

ICE_*515_tRNA*^{Lys}, a mobile genetic element found in 515 *S. agalactiae* invasive human strain, carries a putative new CAMP factor.

In addition to genes required for its mobility, maintenance or regulation, ICE_*515_tRNA*^{Lys} also carries additional genes encoding proteins that can play a role in adaptation or virulence of the strain (Figure 1). BLASTp analyses suggest that these genes could encode (i) a putative bacteriocin system (SAL_2079 to SAL_2081 genes), (ii) 2 proteins that could be involved in oxidative stress response (SAL_2059 and SAL_2078 genes), (iii) 3 putative membrane proteins with a LPxTG motif (SAL_2036, SAL_2056 and SAL_2057), and (iv) a putative new hemolytic CAMP factor (CAMP factor II, SAL_2074 gene). Seven of eight GBS strains whose genome was sequenced carry an ICE or a related element at the 3' extremity of the tRNA^{Lys} encoding gene. COHI, 2603 V/R and 18RS21 strains carry a putative ICE while NEM316, A909 and H36B strains carry a related element [33]. The element of COH1 strain carries the same accessory genes than strain 515, including CAMP factor II (SAN_2140, 100% of protein identity) but we recently showed that only ICE_*515_tRNA*^{Lys} is able to self-transfer by conjugation (A. Puymege, submitted for publication). It is important to underline that the COH1 strain was used by Hensler *et al.* [15] to examine the contribution of CAMP factor to GBS systemic virulence. It cannot be excluded that this second CAMP factor confers a co-hemolytic activity in case of loss of the genomic CAMP factor. As a co-hemolysin, CAMP factor could contribute to erythrocyte lysis and thus to the release of haem which is one of the co-factors (with menaquinone) required for respiration growth of *S. agalactiae*. Respiration growth could be beneficial to GBS dissemination by increasing growth in blood [56]. Interestingly, an ICE with an integrase similar to those of ICE_*515_tRNA*^{Lys} (87% of identity) was also found in *S. uberis* strain 19608 isolated from mastitis (S. Chuzeville, unpublished data).

Characteristics, expression and production of CAMP factor II.

The genomic CAMP factor already described in *S. agalactiae* [8] is encoded by the SAL_2095 gene (accession number: ZP_00790029) in strain 515 and GBS2000 gene in strain NEM316 (accession number: NP_736433). SAL_2095 and GBS2000 genes encode identical proteins. BLASTp revealed 73% of identity between genomic CAMP factor compared to COHI and 515 CAMP factor II (Figure 2). Some of *S. uberis* strains produce a CAMP factor like named Uberis factor (accession number: AAA78910), which exhibits protein identity of 63% and 59% compared to SAL_2095 and SAL_2074, respectively.

Analysis of the SAL_2074 gene promoter region showed the presence of a Pribnow box (TATACT) located 17 pb upstream of a -35 box (TTGACA). A Ribosomal Binding Site (AGGAGG) is located 7 pb downstream of the SAL_2074 start codon. All sequence elements required for transcription and translation of the gene are thus present.

To check for gene transcription, RT-PCR were performed on 515, NEM316 and NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) transconjugant strains. In strain 515, the CAMP factor II gene (SAL_2074) was expressed in exponential and stationary phases in the conditions tested. Transfer of ICE_*515_tRNA*^{Lys} in strain NEM316 enables the expression of the SAL_2074 gene in this strain (Figure 3).

To examine production and secretion of CAMP factor II, a CAMP test was performed. All strains produced a characteristic arrow-shaped hemolysis on plates and no difference could be observed between NEM316 strains carrying ICE_*515_tRNA*^{Lys} or not (Supp. Figure S1A).

Hemolysis monitoring was performed on these strains. This experiment also indicated a CAMP factor secretion by 515, NEM316 and NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) strains (Supp. Figure S1B). However, the measured co-hemolytic activity appeared to reflect those of genomic CAMP factor as there was no additional activity in NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys})

transconjugant (with both CAMP factors) compared to strain NEM316 (with only genomic CAMP factor). The quantity of CAMP factor II secreted in the supernatant was analyzed and compared with the one of CAMP factor by SDS-PAGE and liquid chromatography coupled with mass spectrometry. These experiments indicated that CAMP factor II is secreted in the supernatant at the same level than CAMP factor (Supp. Figure S2). Despite being abundantly secreted, CAMP factor II does not seem to confer additional co-hemolytic activity to a strain already expressing genomic CAMP factor.

Interestingly, we recently showed that ICE_*515_tRNA*^{Lys} confers adhesive properties to recipient strain (S. Chuzeville, unpublished results) which could enable the maintenance of this ICE, also carrying the additional CAMP factor, in the GBS population.

CAMP factor II can provide hemolytic functions to non-pathogenic strains.

Several unsuccessful attempts were made to construct a mutant lacking the CAMP factor II encoding gene. This could be due to an intracellular replication of the element causing recombination problems during mutant construction [57]. To solve this problem and to study the CAMP factor II functionality, an expression vector was constructed, allowing the production of the protein of interest in a host strain.

The functionality of CAMP factor II was first analyzed using *L. lactis* MG1363 strain (Fig. 4). The SAL_2074 gene was expressed under the P23 constitutive promoter using the pOri23 vector. Expression was confirmed by RT-PCR (data not shown). A characteristic arrow-shaped hemolysis similar to that produced by 515 GBS strain was observed in *L. lactis* MG1363 (pOri23-camp^{515}) compared with control *L. lactis* MG1363 (pOri23) strain (Figure 4A). The functionality of CAMP factor II was confirmed by a hemolytic co-reaction titration (Figure 4B).

We thus showed that CAMP factor II can be expressed, produced and secreted correctly in a non-pathogenic species. ICE_*515_tRNA*^{Lys} can autonomously transfer to other *S. agalactiae* strains (A. Puymege, submitted for publication) so this element can spread this pore-forming toxin-encoding gene in the GBS population. Since interspecies transfer likely occurs in natural habitats, as similar elements have been detected in *S. uberis* and *S. dysgalactiae* strains [38], CAMP factor II may confer hemolytic properties if ICE_*515_tRNA*^{Lys} was transferred to CAMP-negative recipient strains.

CAMP factor II is also present in other pathogenic streptococcal strains of veterinary origin.

A collection of streptococcal pathogenic strains of veterinary origin was studied to test the ability of the strains to generate a co-haemolytic reaction with *S. aureus*. This collection included isolates of *S. uberis* (n=449); *S. dysgalactiae* (n=162); *S. bovis* (n=31); *S. suis* (n=26) and *S. equisimilis* (n=9). Twenty-three strains were CAMP positive: 20 *S. uberis* (4%), 1 *S. bovis* (3%), 1 *S. equisimilis* (11%) and 1 *S. dysgalactiae* (less than 1%) strain. CAMP-positive strains were collected in 11 different geographic areas throughout France between 1984 and 2010.

Detection of the gene encoding the factor responsible for co-hemolytic reaction in the streptococcal collection was performed by amplification using primers designed from CAMP factor II and Uberis factor gene sequences. Only the factor responsible for the reaction observed for *S. dysgalactiae* strain 24084 could not be characterized in this study. Sequencing of the co-hemolytic factor encoding gene in *S. uberis* strains revealed that all the strains tested (n=10) carried an Uberis factor-like gene (identity > 97%), whereas *S. bovis* and *S. equisimilis*

carried a CAMP factor gene very similar to the one carried by ICE_*515_tRNA*^{Lys} (96% of identity for both).

CAMP factors have already been described in other streptococci such as *S. pyogenes* [20, 58], *S. uberis* [14, 22, 59, 60], *S. porcinus* [22, 59, 61, 62], *S. canis* [22, 23, 62], *S. intestinalis* [63]. Furthermore BLASTp analysis showed that *cfb* homologues in *P. acnes*, *S. uberis*, *S. canis, S. porcinus* and *S. pyogenes* exhibit significant homologies with CAMP factor (34 to 99%). However, this is the first time to our knowledge that a CAMP factor is described in *S. bovis* and in *S. equisimilis*. CAMP-negative field strains were examined for their ability to express CAMP factor II. For this purpose, pOri23-camp^{515} was transformed in two different field strains: one *S. bovis* strain and one *S. dysgalactiae* strain. A characteristic arrow-shaped hemolysis similar to that produced by 515 GBS strain was observed when CAMP factor II was expressed in field strains (fig. 5A) when compared with wild strains. This result was confirmed by hemolytic co-reaction titration (fig. 5B).

Collectively, these results confirm that the CAMP factor II is not primarily a characteristic of GBS and enhance our belief that the routine detection of GBS by usual CAMP test on plates or using PCR methods should always be confirmed by other phenotypic or genotypic methods, since the CAMP factor II or Uberis factor present in a large range of streptococci might lead to a misidentification.

Nevertheless, no *S. suis* strain in the tested collection carried functional *cfb* homologues. This is consistent with previous work that showed that genetic exchange between *S. suis* and other species appeared to be uncommon [36].

Finally, no previous work has shown the presence of such co hemolytic factors in *S. bovis* and *S. equisimilis* and the similarity between CAMP factor II and those of these two field strains suggests a recent acquisition by horizontal transfer probably mediated by ICE carrying this gene.

CAMP positive strains carry a genetic element integrated at the 3' end of tRNA^{Lys} gene.

CAMP-positive strains were analyzed for the presence of a genetic element integrated in the tRNA^{Lys} (with CTT anticodon) encoding gene. First, ICE_*515_tRNA^{Lys}* and ICE_*SUB19608_tRNA^{Lys}* integrase genes were searched and, then, intergenic regions between integrase and tRNA^{Lys} gene and more precisely the *attR* ICE_*515_tRNA^{Lys}* integration specific site were amplified (Supp. Table S2).

Twenty one of the 23 strains tested, including *S. bovis* 7434, *S. equisimilis* 20591 and *S. dysgalactiae* 24084 strains, showed an integrase gene similar to that of ICE_*SUB19608_tRNA^{Lys}*.

attR sites were searched using primers ICE_*SUB19608_tRNA^{Lys}* fwd and tRNA^{Lys} AAA Rev (Supp. Table S2). An *attR* site was amplified for 17 of the 23 strains tested including *S. bovis* 7434 and *S. equisimilis* 20591. PCR products were then confirmed by sequencing which revealed that the *attR* site of these strains was very close to that of ICE_*515_tRNA^{Lys}* for 15 on 18 *S. uberis*, *S. bovis* 7434 and *S. equisimilis* 20591 (78 to 86% of identity) (see Supp. Fig S3).

Long range PCRs were performed to examine the position of CAMP factor II encoding gene on *S. bovis* and *S. equisimilis* strains. PCRs, made using primers designed from ICE_*515_tRNA^{Lys}* and located in CAMP factor II encoding gene and tRNA^{Lys} gene, gave negative results in *S. bovis* and *S. equisimilis* strains. In strain 515, this region has a length of more than 34 kb which could explain the difficulty to amplify it in field strains. However, amplicons larger than 10 kb were obtained for both field strains using one primer hybridizing to the CAMP factor II encoding gene (CAMP factor ICE_*515_tRNA^{Lys} Nsi*I Rev for both) and the second primer hybridizing to the gene upstream of the putative mobile genetic element (HMPREF9319_0116 fwd for *S. bovis* strain and HMPREF9964_2030 fwd for *S. equisimilis*

strain) (Supp. Table S2). In strain 515, this region has also a length of about 10 kb. To confirm that the amplicon corresponds to the expected region, nested PCRs were performed using long range PCR products as templates and primers hybridizing to CAMP factor II encoding gene (CAMP factor ICE_*515_tRNA*^{Lys} *Bam*HI fwd and CAMP factor ICE_*515_tRNA*^{Lys} Rev) (Supp. Table S2).

Thus, CAMP factor II encoding genes in *S. bovis* and *S. equisimilis* strains were located on a genetic element integrated at the 3' end of the tRNA^{Lys} encoding gene.

Hence two thirds of the strains which produce a CAMP factor II appeared to carry an element integrated at 3' end of tRNA^{Lys} gene. This suggests that the spread of the CAMP factor II gene in different pathogenic streptococcal species is linked to the transfer of an ICE carrying this gene.

CONCLUSION

In conclusion, the SAL_2074 gene carried by a mobile genetic element (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) in *S. agalactiae* 515 strain encodes a functional CAMP factor. An identical CAMP factor is encoded by a putative ICE carried by *S. agalactiae* COH1. It is important to mention that this strain has been used by Hensler *et al*. to conclude that CAMP factor is not essential for GBS virulence [15]. It is possible that this second CAMP factor confers co-hemolysin activity in case of loss of the genomic CAMP factor. A similar toxin is also encoded by a putative ICE detected in *S. urinalis* although this strain gave a negative result using *in vitro* CAMP test [64]. This toxin is functional when expressed in non pathogenic (*L. lactis*) and other pathogenic streptococcal species (*S. dysgalactiae*, *S. bovis*). Furthermore, screening of a collection of strains of different streptococcal species indicated that some are positive for the CAMP test. All strains (except *S. uberis* 21459 and 22492 strains in the conditions used) also

carry the integrase gene of ICE_*515_tRNA*^{Lys} thus suggesting a spread of the CAMP factor II gene among different streptococcal species through ICE conjugative transfer.

ACKNOWLEDGEMENTS

Liquid chromatography coupled with mass spectrometry was performed by the proteomics platform of Fédération de recherche 3209, Vandoeuvre-lès-nancy, France.

We would like to acknowledge Philippe MOREILLON and his team for providing the *L. lactis* strains and the pOri23 plasmid. We thank Philippe GLASER for providing NEM316 strain and *S. uberis* 19608 genome sequence. We are also grateful to Xavier Bellanger for constructing the pG+host9spc vector used in this study. Thanks to Florence TARDY for her helpful advices and Pierre CHATRE for technical assistance. Sarah CHUZEVILLE was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and by the Agence Nationale de la Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail (ANSES). We thank Janet SPRENT for careful reading of our manuscript.

REFERENCES

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

2. Martins ER, Florindo C, Martins F, Aldir I, Borrego MJ, et al. (2007) *Streptococcus agalactiae* serotype Ib as an agent of meningitis in two adult nonpregnant women. J Clin Microbiol 45: 3850-3852.

3. Cordoba-Lopez A, Bueno Alvarez-Arenas MI, Monterrubio-Villa J, Corcho-Sanchez G (2002) *Streptococcus agalactiae* pleural empyema in a healthy adult. Enferm Infecc Microbiol Clin 20: 478-479.

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

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

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

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

8. Christie R (1944) A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. Aust J Exp Biol 22: 197-200.

9. Milhas D, Clarke CJ, Hannun YA (2010) Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids. FEBS Lett 584: 1887-1894.

10. Titball RW (1993) Bacterial phospholipases C. Microbiol Rev 57: 347-366.

11. Rodi PM, Cabeza MS, Gennaro AM (2006) Detergent solubilization of bovine erythrocytes. Comparison between the insoluble material and the intact membrane. Biophys Chem 122: 114-122.

12. Lang S, Xue J, Guo Z, Palmer M (2007) *Streptococcus agalactiae* CAMP factor binds to GPI-anchored proteins. Med Microbiol Immunol 196: 1-10.

13. Jürgens D (1987) Unspecific binding of group B streptococcal co-cytolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. J Exp Med 165: 730-732.

14. Skalka B, Smola J (1981) Lethal effect of CAMP-factor and UBERIS-factor: a new finding about diffusible exosubstances of *streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis*. Zentralbl Bakteriol A 249: 190-194.

15. Hensler ME, Quach D, Hsieh CJ, Doran KS, Nizet V (2008) CAMP factor is not essential for systemic virulence of Group B Streptococcus. Microb Pathog 44: 84-88.

16. Fuchs PC, Christy C, Jones RN (1978) Multiple-inocula (replicator) CAMP test for presumptive identification of group B streptococci. J Clin Microbiol 7: 232-233.

17. Phillips EA, Tapsall JW, Smith DD (1980) Rapid tube CAMP test for identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B). J Clin Microbiol 12: 135-137.

18. Ke D, Menard C, Picard FJ, Boissinot M, Ouellette M, et al. (2000) Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. Clin Chem 46: 324-331.

19. Ratner HB, Weeks LS, Stratton CW (1986) Evaluation of spot CAMP test for identification of group B streptococci. J Clin Microbiol 24: 296-297.

20. Gase K, Ferretti JJ, Primeaux C, McShan WM (1999) Identification, cloning, and expression of the CAMP factor gene (*cfa*) of group A streptococci. Infect Immun 67: 4725-4731.

21. Jiang M, Babiuk LA, Potter AA (1996) Cloning, sequencing and expression of the CAMP factor gene of *Streptococcus uberis*. Microb Pathog 20: 297-307.

22. Hassan AA, Abdulmawjood A, Yildirim AO, Fink K, Lammler C, et al. (2000) Identification of streptococci isolated from various sources by determination of *cfb* gene and other CAMP-factor genes. Can J Microbiol 46: 946-951.

23. Gurturk K, Lammler C (1990) Purification and partial characterization of a co-haemolysin (CAMP-factor) produced by *Streptococcus canis*. FEMS Microbiol Immunol 2: 97-102.

24. Valanne S, McDowell A, Ramage G, Tunney MM, Einarsson GG, et al. (2005) CAMP factor homologues in *Propionibacterium acnes*: a new protein family differentially expressed by types I and II. Microbiology 151: 1369-1379.

25. Doolittle WF (1999) Lateral genomics. Trends Cell Biol 9: 5-8.

26. de la Cruz F, Davies J (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. Trends Microbiol 8: 128-133.

27. Kurland CG (2000) Something for everyone. Horizontal gene transfer in evolution. EMBO Rep 1: 92-95.

28. Lawrence JG, Ochman H (1998) Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 9413-9417.

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

30. Wozniak RA, Waldor MK (2010) Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. Nat Rev Microbiol 8: 552-563.

31. Burrus V, Waldor MK (2004) Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. Res Microbiol 155: 376-386.

32. Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, et al. (2005) Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae:* implications for the microbial "pan-genome". Proc Natl Acad Sci U S A 102: 13950-13955.

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

34. Beres SB, Musser JM (2007) Contribution of exogenous genetic elements to the group A Streptococcus metagenome. PLoS One 2: e800.

35. Croucher NJ, Walker D, Romero P, Lennard N, Paterson GK, et al. (2009) Role of conjugative elements in the evolution of the multidrug-resistant pandemic clone *Streptococcus pneumoniae* Spain23F ST81. J Bacteriol 191: 1480-1489.

36. Holden MT, Hauser H, Sanders M, Ngo TH, Cherevach I, et al. (2009) Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. PLoS One 4: e6072.

37. Ward PN, Holden MT, Leigh JA, Lennard N, Bignell A, et al. (2009) Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. BMC Genomics 10: 54.

38. Haenni M, Saras E, Bertin S, Leblond P, Madec JY, et al. (2010) Diversity and mobility of integrative and conjugative elements in bovine isolates of *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, and *S. uberis*. Appl Environ Microbiol 76: 7957-7965.

39. Richards VP, Lang P, Bitar PD, Lefebure T, Schukken YH, et al. (2011) Comparative genomics and the role of lateral gene transfer in the evolution of bovine adapted *Streptococcus agalactiae*. Infect Genet Evol 11: 1263-1275.

40. Manning SD, Springman AC, Million AD, Milton NR, McNamara SE, et al. (2010) Association of Group B Streptococcus colonization and bovine exposure: a prospective cross-sectional cohort study. PLoS One 5: e8795.

41. Bellanger X, Roberts AP, Morel C, Choulet F, Pavlovic G, et al. (2009) Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICE*St1* and ICE*St3* from *Streptococcus thermophilus*. J Bacteriol 191: 2764-2775.

42. Davies MR, Shera J, Van Domselaar GH, Sriprakash KS, McMillan DJ (2009) A novel integrative conjugative element mediates genetic transfer from group G Streptococcus to other beta-hemolytic Streptococci. J Bacteriol 191: 2257-2265.

43. Suzuki H, Lefebure T, Hubisz MJ, Pavinski Bitar P, Lang P, et al. (2011) Comparative genomic analysis of the *Streptococcus dysgalactiae* species group: gene content, molecular adaptation, and promoter evolution. Genome Biol Evol 3: 168-185.

44. Zhang S, Green NM, Sitkiewicz I, Lefebvre RB, Musser JM (2006) Identification and characterization of an antigen I/II family protein produced by group A Streptococcus. Infect Immun 74: 4200-4213.

45. Sitkiewicz I, Green NM, Guo N, Mereghetti L, Musser JM (2011) Lateral gene transfer of streptococcal ICE element RD2 (region of difference 2) encoding secreted proteins. BMC Microbiol 11: 65.

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

47. Maguin E, Duwat P, Hege T, Ehrlich D, Gruss A (1992) New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. J Bacteriol 174: 5633-5638.

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

49. Sambrook J FE, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

50. Letort C, Juillard V (2001) Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. J Appl Microbiol 91: 1023-1029.

51. Bensadoun A, Weinstein D (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. Anal Biochem 70: 241-250.

52. Que YA, Haefliger JA, Francioli P, Moreillon P (2000) Expression of *Staphylococcus aureus* clumping factor A in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* using a new shuttle vector. Infect Immun 68: 3516-3522.

53. Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol 166: 557-580.

54. Buckley ND, Vadeboncoeur C, LeBlanc DJ, Lee LN, Frenette M (1999) An effective strategy, applicable to *Streptococcus salivarius* and related bacteria, to enhance or confer electroporation competence. Appl Environ Microbiol 65: 3800-3804.

55. Sorensen M, Mak TN, Hurwitz R, Ogilvie LA, Mollenkopf HJ, et al. (2010) Mutagenesis of Propionibacterium acnes and analysis of two CAMP factor knock-out mutants. J Microbiol Methods 83: 211-216.

56. Yamamoto Y, Poyart C, Trieu-Cuot P, Lamberet G, Gruss A, et al. (2005) Respiration metabolism of Group B Streptococcus is activated by environmental haem and quinone and contributes to virulence. Mol Microbiol 56: 525-534.

57. Carraro N, Libante V, Morel C, Decaris B, Charron-Bourgoin F, et al. (2011) Differential regulation of two closely related integrative and conjugative elements from *Streptococcus thermophilus*. BMC Microbiol 11: 238.

58. Gubash SM (1978) Synergistic hemolysis phenomenon shown by an alpha-toxin-producing *Clostridium perfingens* and streptococcal CAMP factor in presumptive streptococcal grouping. J Clin Microbiol 8: 480-488.

59. Lammler C, Blobel H (1987) Synergistic and antagonistic hemolytic reactions of bacterial proteins. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 100: 95-99.

60. Lopes MF, Merquior VL, Peralta JM, Teixeira LM (1995) Partial characterization of the cohemolytic factor produced by *Streptococcus uberis* and comparison with the CAMP-factor. FEMS Immunol Med Microbiol 12: 205-212.

61. Thal E, Obiger G (1969) The CAMP phenomenon of *Streptococcus agalactiae* and new serologic Streptococcus group "U" and other bacteria types. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 82: 126-130.

62. Lammler C, Gedek W, Blobel H (1987) CAMP like reactions for presumptive identification of *Bacillus cereus* from bovines. Zentralbl Veterinarmed B 34: 395-396.

63. Soedarmanto I, Lammler C (1996) Comparative studies on streptococci of serological group G isolated from various origins. Zentralbl Veterinarmed B 43: 513-523.

64. Collins MD, Hutson RA, Falsen E, Nikolaitchouk N, LaClaire L, et al. (2000) An unusual Streptococcus from human urine, *Streptococcus urinalis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 50 Pt 3: 1173-1178.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Schematic diagram of the ICE_*515_tRNA*^{Lys} mobile genetic element.

ORFs appear as arrows. Genes encoding the putative bacteriocin system appear in light blue. The genes encoding the proteins that could be involved in oxidative stress response (NRAMP protein and thioredoxin-like) are colored in yellow and the gene encoding the putative new hemolytic CAMP factor (CAMP factor II) in purple. Genes encoding the proteins with LPxTG motif appear in pink. Genes of the conjugation module are indicated with blue arrows and regulation module with green arrows. Putative *oriT* is indicated by a star. Genes encoding a putative toxin-antitoxin system appear in orange and other genes encoding proteins with unknown function in white. The gene where the element is integrated (tRNA^{Lys}) is indicated in red. Recombination module is colored in red. Recombination sites are drawn as vertical rectangles. Black rectangles indicate identical sequences found in *attL*, *attR*, and *attI* sites; yellow rectangles indicate the arm of *attR* sites and the related arm of *attI* sites; and red rectangles indicate the arm of *attL sites* and the related arms of *attI* sites.

Figure 2. Comparison of CAMP factors and Uberis factor found in streptococci.

A. multiple sequence alignment (*Sag*, *S. agalactiae*; *S. urinalis*; *S. canis*; *S. pyogenes*; *S. porcinus*; *S. pseudo porcinus* and *S. uberis*); B. phylogenetic tree showing the evolutionary relationships between the sequences of the alignment. Sequence alignment and construction of the phylogenetic tree were done using the AlignX module of VectorNTI advance 11 (InVitrogen). Conserved residues appear in light grey and identical amino acids appear in dark grey in the alignment. Position of residues in the sequence is indicated above the sequence. Sequence identities go from 56% (CAMP factor II of *S. agalactiae* and Uberis

factor of *S. uberis*) to 100% (CAMP factor II of *S. agalactiae* and CAMP factor of *S. urinalis*). The CAMP factor of *P. acnes* is more distant (less than 30% of identity) and thus does not appear in this alignment. The phylogenetic tree has been constructed using the Neighbor Joining Method. Each branch of the tree has a length equal to the number of substitutions required to get from one nod to the next.

Figure 3. Analysis of the expression of the CAMP factor II (SAL_2074) gene.

RT-PCR were performed using, as templates, RNA extracted from stationary-phase cultures of strain 515 (1, and negative control without RTase, 4); strain NEM316 (2 and negative control without RTase, 5); and transconjugant NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) (3 and negative control without RTase, 6). The same results were obtained in exponential phase. A positive control using genomic DNA of strain 515 was included (7) as well as a negative control with water (8). DNA molecular weight marker is marker number VI (Roche Applied Science).

Figure 4. Co-hemolytic activity of CAMP factor II expressed in *L. lactis* MG1363.

A. CAMP test using (1) *L. lactis* MG1363 (pOri23), (2) *L. lactis* MG1363 (pOri23-camp^{515}) and (3) GBS strain 515 as control; B. *L. lactis* co-hemolytic activity was monitored in *L. lactis* MG1363 (pOri23) (filled circle with SMase treatment and empty circle without treatment) and in *L. lactis* MG1363 (pOri23-camp^{515}) (filled squares with SMase treatment and empty squares without treatment). Hemolytic activity was measured at OD_{630} every 30 min using a microplate reader. The experiment was done in triplicate using three independent biological samples. Errors bars represent the standard deviation observed between the 9

values obtained for each strain. Controls without SMase treatment were done (data not shown).

Figure 5. Expression of CAMP factor II in pathogenic streptococcal strains.

A. CAMP test using (1) *S. bovis* 1052 wt, (2) *S. bovis* (pOri23-camp^{515}), (3) *S. dysgalactiae* 593 wt, (4) *S. dysgalactiae* (pOri23-camp^{515}) and (5) GBS strain 515 as control; B. co-hemolytic activity was monitored in *S. bovis* 1052 (filled circle with pOri23-camp^{515} and empty circle without) and in *S. dysgalactiae* (filled squares with pOri23-camp^{515} and empty squares without treatment). Hemolytic activity was measured at OD_{630} every 30 min using a microplate reader. The experiment was done in triplicate using three independent biological samples. Errors bars represent the standard deviation observed between the 9 values obtained for each strain. Controls without SMase treatment were carried out (data not shown).

Supporting Information Table S1. Strains and their characteristics.

Strains and plasmids are listed together with their associated pathologies or genotypic characteristics, the year and geographic place of isolation, their hemolysis pattern, the CAMP test results and the reference for strains or plasmids.

Supporting Information Table S2. Primers used in this work.

Restriction sites appear in bold.

Supporting Figure S1. Co-hemolytic activity of CAMP factor II in GBS strains.

A. CAMP test using (1) NEM316, (2) NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}), and (3) 515 GBS strains; B. Measure of co-hemolytic activity of CAMP factor(s) in *S. agalactiae* strain 515 (filled circles with SMase treatment and empty circle without treatment), strain NEM316 (filled triangles with SMase treatment and empty triangles without treatment) and transconjugant NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) (filled squares with SMase treatment and empty squares without treatment). Hemolytic activity was measured at OD_{630} every 30 min using a microplate reader. The experiment was done in triplicate using three independent biological samples. Errors bars represent the standard deviation observed between the 9 values obtained for each strain.

Supporting Figure S2. SDS-PAGE analysis of the supernant of *S. agalactiae* NEM316 and NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) cultures.

Supernatant of overnight cultures of *S. agalactiae* NEM316 (1, in BHI and 3, in CDM) and of *S. agalactiae* NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) (2, in BHI and 4, in CDM). Molecular weight marker (MW) is unstained protein MW marker of Euromedex. MWs are indicated on the right side of the gel. Arrows indicated the position of the band corresponding to genomic CAMP factor (I) and CAMP factor II (II).

Supporting Figure S3. Alignment of *attR* sequence of ICE_*515_tRNA*^{Lys} in field strain.

Sequence alignment was done using the AlignX module of VectorNTI advance 11 (InVitrogen).

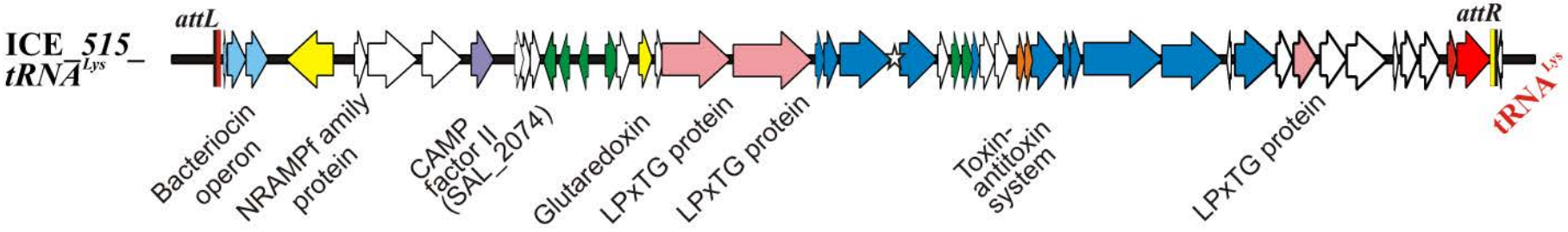


Figure 1. Schematic diagram of the ICE_*515_tRNA*^{Lys} mobile genetic element.

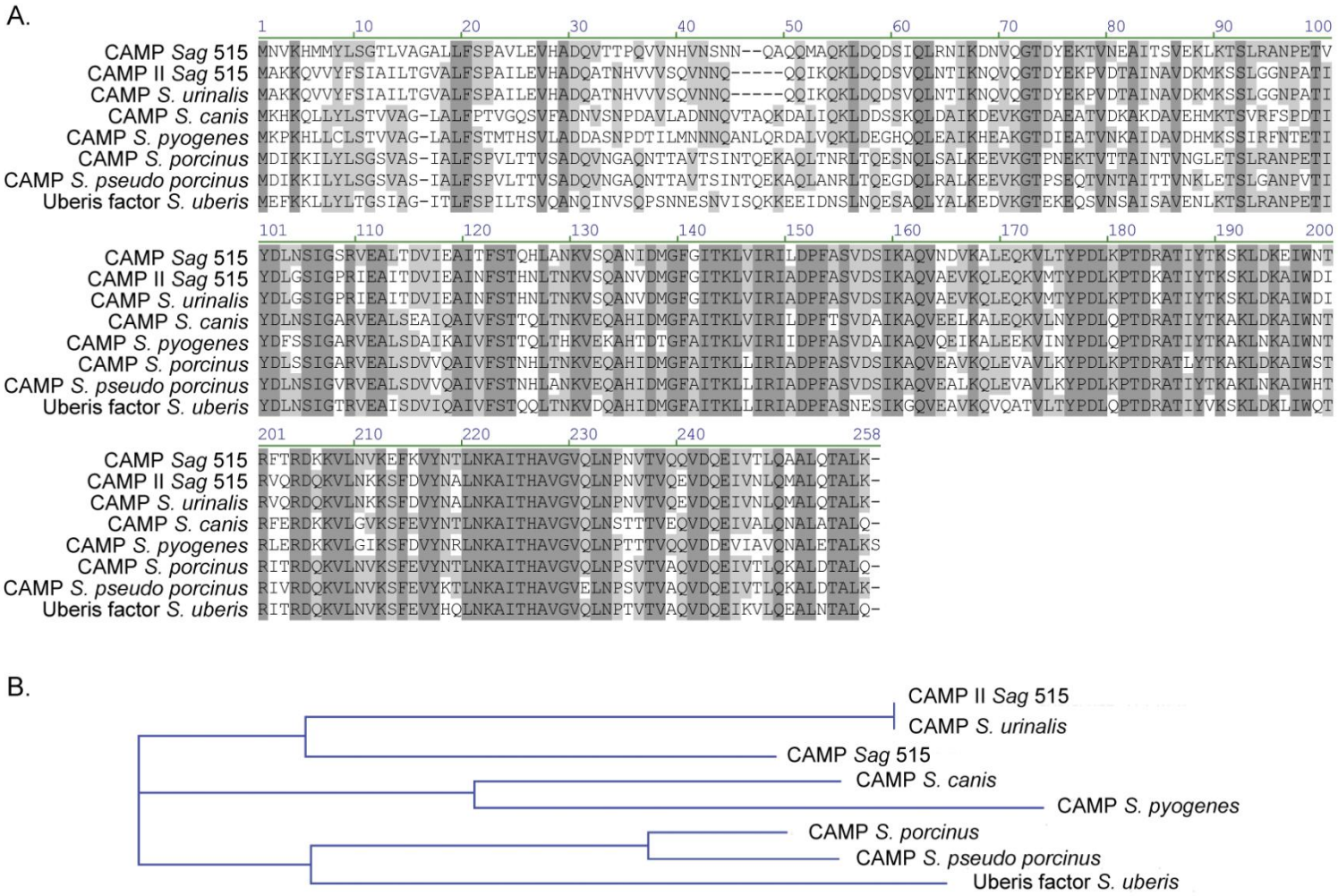


Figure 2. Comparison of CAMP factors and Uberis factor found in streptococci.

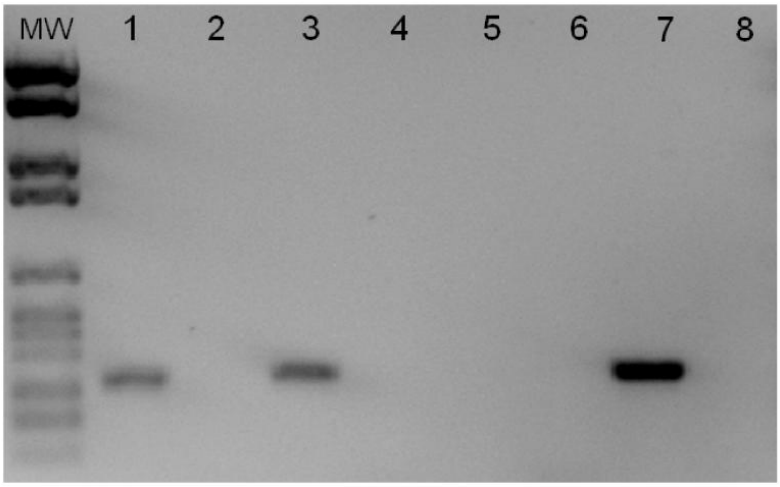


Figure 3. Analysis of the expression of the CAMP factor II (SAL_2074) gene.

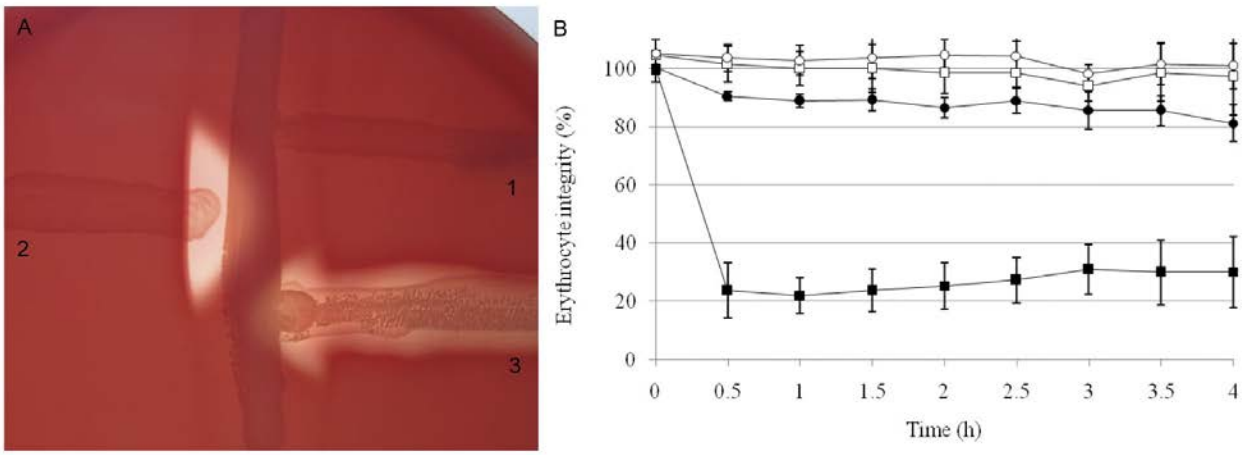


Figure 4. Co-hemolytic activity of CAMP factor II expressed in *L. lactis* MG1363.

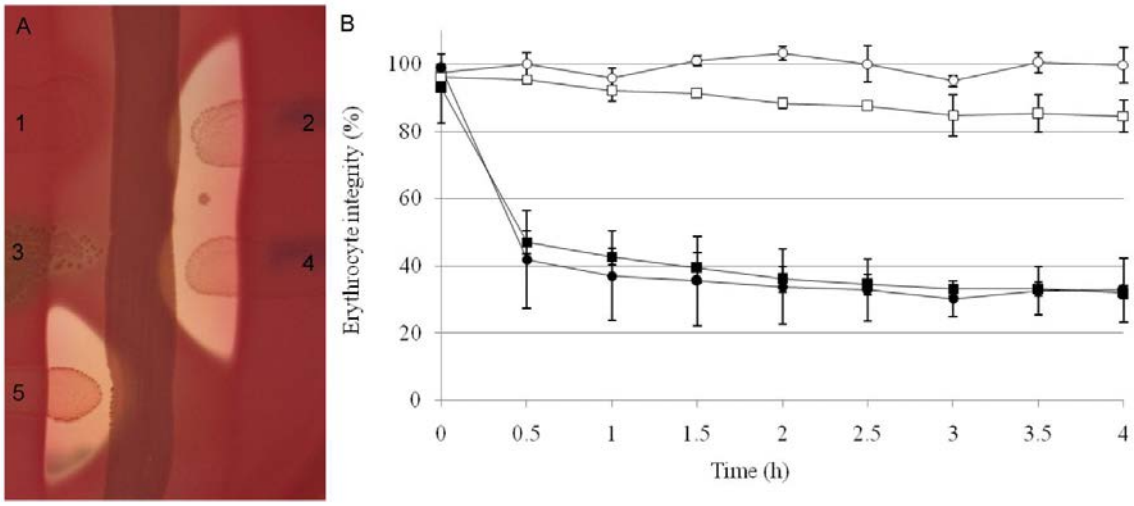


Figure 5. Expression of CAMP factor II in pathogenic streptococcal strains.

Supporting Information Table S1. Strains and their characteristics.

Strains and plasmids are listed together with their associated pathologies or genotype characteristics, the year and geographic place of isolation, their hemolysis pattern, the CAMP test results and the reference for strains or plasmids.

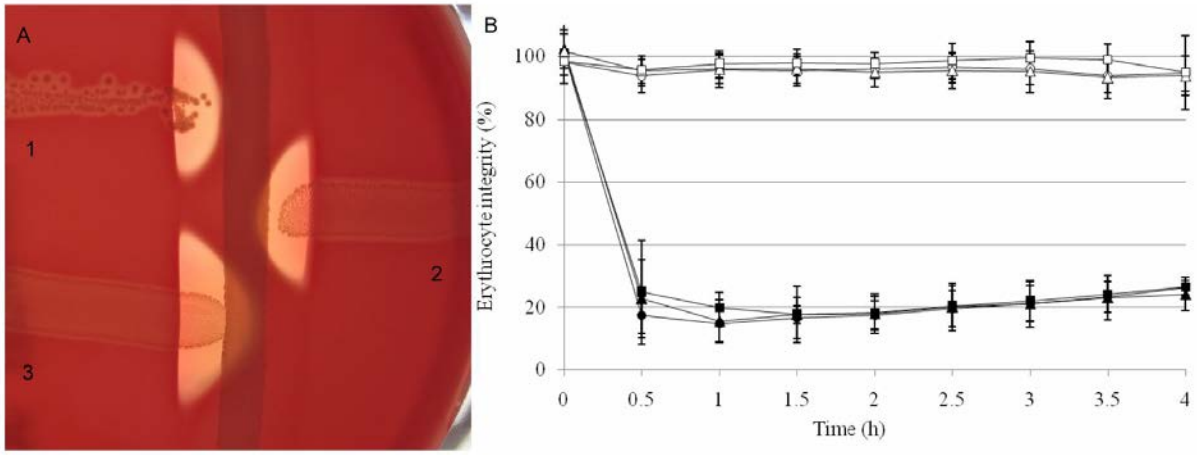
Species	Strain or plasmids	Pathology or relevant genotype	Sampling year	Geographic origin	Hemolysis	CAMP reaction	Source or reference
S. agalactiae	515 (ATCC BAA-1177)	Invasive	/	/	β	+	LGC standards
	NEM316	Septicaemia	/	/	β	+	[46]
	NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys})	/	/	/	β	+	Unpublished data
E. coli	DH5α	General cloning	/	/	γ	-	[53]
	Top10	General cloning	/	/	γ	-	In Vitrogen, USA
L. lactococcus	MG1363	/	/	/	γ	-	[52]
	MG1363 (pOri23-camp^{515})	/	/	/	γ	+	This work
S. aureus	CIP57.10	Reference CAMP reaction strain	/	/	β	/	Institut Pasteur, Paris
S. uberis	21639	Mastitis	/	/	γ	+	Resapath
	21457	Mastitis	2008	76	α	+	Resapath
	21459	Mastitis	2008	76	α	+	Resapath
	21468	Mastitis	2008	76	α	+	Resapath
	21512	Mastitis	2008	61	γ	+	Resapath
	22492	Mastitis	2009	82	γ	+	Resapath
	19827	Mastitis	1985	64	γ	+	Resapath
	19843	Mastitis	1984	22	γ	+	Resapath

	19908	/	1984	22	γ	+	Resapath
	19909	Mastitis	1985	22	γ	+	Resapath
	1352	Mastitis	1986	22	γ	+	Resapath
	1825	/	1986	22	γ	+	Resapath
	11535	Mastitis	2000	82	γ	+	Resapath
	12538	Mastitis	2001	61	γ	+	Resapath
	19623	Mastitis	2007	38	γ	+	Resapath
	20576	Mastitis	2007	61	α	+	Resapath
	20965	Mastitis	2008	29	γ	+	Resapath
	19168	Mastitis	2007	1	γ	+	Resapath
	20222	Mastitis	2007	74	γ	+	Resapath
	16193	Mastitis	2007	42	γ	+	Resapath
	19608	Mastitis	2007	1	γ	+	Resapath
S. equisimilis	20591	Synovial fluid's sampling equine	2007	61	β	+	Resapath
S. bovis	7434	Mastitis	1993	82	γ	+	Resapath
	1052	Lung disease	1985	49	γ	-	Resapath
	1052 (pOri23-camp^{515})	/	/	/	γ	+	This work
S. dysgalactiae	24084	/	2010	50	α	+	Resapath
	593	/	1984	22	γ	-	Resapath
	593 (pOri23-camp^{515})	/	/	/	γ	+	This work
Plasmids	pOri23	*ermAM ori* ColE1 *P23*	/	/	/	/	[52]
	pOri23-camp^{515}	*ermAM* ori ColE1 *P23* SAL_2074	/	/	/	/	This work

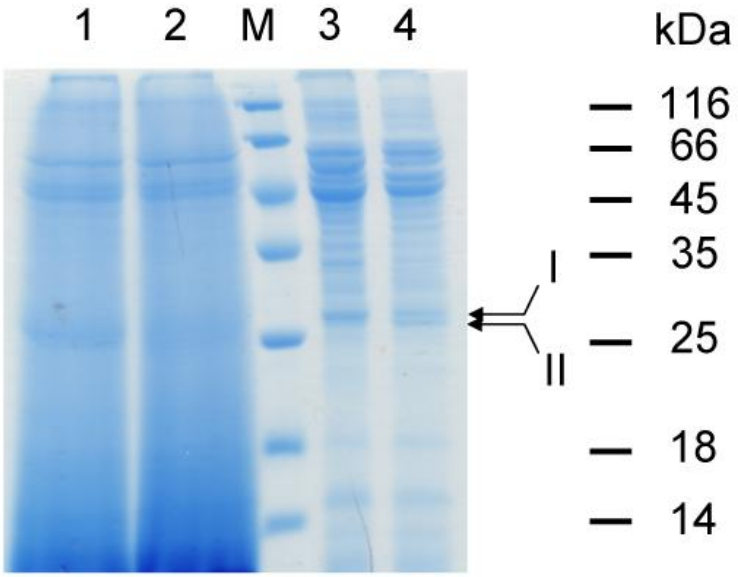
pG+host9	pWV01-type thermosensitive replication origin from pVE6002, Erm^r	/	/	/	/	[47]
pG+host9spc	plasmid derived from pG+host9, Spc^r	/	/	/	/	X. Bellanger, pers. comm.

Supporting Information Table S2. Primers used in this work.

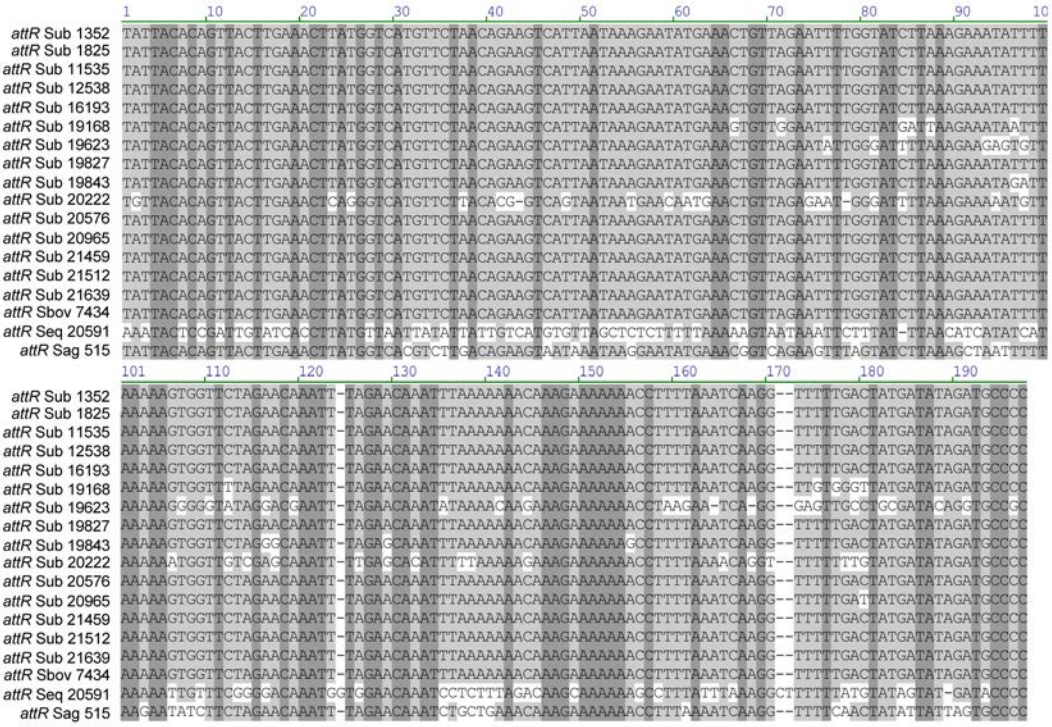
Target gene	5'-3' sequence
SAG2026-1-***Hind*III**	AAAAA**AAGCTT**CATTCCATTTAATAACCATC
SAG2026-2-***Avr*II**	AAAAA**CCTAGG**TCACTCGTTGTTCTACAGTA
SAG2026-3-***Avr*II**	AAAAA**CCTAGG**AAATAGTGAATATCCCCA
SAG2026-4-***Eco*RI**	AAAAA**GAATTC** TGTTAGGATTGGAGTTTAG
CAMP factor ICE_*515_tRNA*^{Lys} RT-PCR fwd	ATCATGTCGTAGTTAGTCAAGTTA
CAMP factor ICE_*515_tRNA*^{Lys} RT-PCR Rev	TCCGAATCCCATGTCAAC
CAMP factor ICE_*515_tRNA*^{Lys} ***Bam*HI** fwd	TTTTT**GGATCC**AAGTTATTTTGATTTAGGAGGG
CAMP factor ICE_*515_tRNA*^{Lys} ***Nsi*I** Rev	TTTTT**ATGCAT**GAATATCGCTGTTGCCTT
Uberis factor U34322.1 fwd	AAGAGGAATGCTTATGGAA
Uberis factor U34322.1 rev	TCCACCAAATCTCTTCAAC
ICE_*515_tRNA*^{Lys} integrase fwd	AAGCGTGAAGCTATGAATGA
ICE_*515_tRNA*^{Lys} integrase rev	CTACCAGCTATGACAACTCCA
ICE_*SUB19608_tRNA*^{Lys} integrase fwd	AAACGTGAAGCTATGAATGAAG
ICE_*SUB19608_tRNA*^{Lys} integrase Rev	TTACCAGCTATCACAACACC
tRNA^{Lys} AAA Rev	GGTTATTGCTGTGGCATACG
HMPREF9319_0116 fwd	CCCTGCAAGCAAATGAGG
HMPREF9964_2030 fwd	CCTCACTTTGCCATTCCT
CAMP factor ICE_*515_tRNA*^{Lys} Rev	TCCGAATCCCATGTCAAC



Supporting Figure S1. Co-hemolytic activity of CAMP factor II in GBS strains.



Supporting Figure S2. SDS-PAGE analysis of the supernant of *S. agalactiae* NEM316 and NEM316 (ICE_*515_tRNA*^{Lys}) cultures.



Supporting Figure S3. Alignment of *attR* sequence of ICE_*515_tRNA*^{Lys} in field strain.