



HAL
open science

Mobilisation de gènes d'antibiorésistance chez Streptococcus suis par conjugaison

Manon Dechêne-Tempier

► **To cite this version:**

Manon Dechêne-Tempier. Mobilisation de gènes d'antibiorésistance chez Streptococcus suis par conjugaison. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lorraine, 2023. Français. NNT : 2023LORR0234 . tel-04516300

HAL Id: tel-04516300

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04516300>

Submitted on 2 Apr 2024

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**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

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 bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

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>

UMR 1128 Université de Lorraine- INRAE Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne
Laboratoire Anses de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Mycoplasmatologie, Bactériologie et
Antibiorésistance

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

Présenté par :

Manon Dechêne-Tempier

Sous la direction des Dre Corinne Marois-Créhan, Dre Virginie Libante ainsi que la Dre Sophie Payot

Mobilisation de gènes d'antibiorésistance chez *Streptococcus suis* par conjugaison

20 novembre 2023

Membres du jury :

| | | |
|------------------------|-----------------------|--|
| Directrices de thèse : | Corinne MAROIS-CREHAN | Chargé de projet de recherche, Anses, Ploufragan |
| | Virginie LIBANTE | Maître de conférences, Dynamic, Nancy |
| Encadrante de thèse : | Sophie PAYOT | Directeur de recherche, INRAE, Nancy |
| Présidente du jury : | Catherine BELLOC | Professeur, Oniris, Nantes |
| Rapporteur : | Eric BARANOWSKI | Directeur de Recherche, ENVT, Toulouse |
| Examineurs : | Nahuel FITTIPALDI | Professeur, Faculté de médecine vétérinaire, Montréal |
| | Xavier BELLANGER | Maître de conférences, LCPME, Nancy |

« Ever tried. Ever failed. No matter. Try again. Fail again. Fail better. »

Samuel Beckett, *Worstward Ho*.

Remerciements

Dans un premier temps, je tiens à remercier **Isabelle KEMPF**, ancienne directrice de recherche de l'Unité MBA à l'ANSES Ploufragan-Plouzané-Niort, et **Bertrand AIGLE**, directeur de recherche du laboratoire DynAMic, UMR INRAE, Université de Lorraine, pour leur accueil au sein de leurs laboratoires respectifs.

Je suis très reconnaissante envers **Catherine BELLOC** et **Eric BARANOWSKI** qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je pense également à **Nahuel FITTIPALDI** et **Xavier BELLANGER** qui formeront d'excellents membres du jury. Je tiens à exprimer ma gratitude envers **Mily LEBLANC-MARIDOR** et **Sebastien LECLERCQ** pour leurs conseils et leur soutien lors de mes réunions de comité de suivi de thèse.

Ma directrice de thèse, **Corinne MAROIS-CREHAN**, mérite mes remerciements pour sa confiance, sa disponibilité et son aide, notamment au cours de ma première année de thèse. J'ai énormément appris à l'ANSES, que ce soit en lien avec mon projet de recherche ou non. Cette expérience en Bretagne a été vraiment incroyable, et pas seulement à cause de la beauté des plages et des forêts... Mais aussi grâce à l'accueil chaleureux et à la gentillesse des membres de l'Unité MBA. Je tiens particulièrement à remercier **Claire** et **Eric** pour leur aide et leur disponibilité sans faille. Bien sûr, j'aimerais exprimer ma gratitude envers **Odile** pour sa patience et sa bonne humeur, ainsi qu'envers tous les membres de l'Unité pour leur accueil chaleureux et leur gentillesse.

Je souhaite également remercier **Pierrick** de l'Unité GVB et **Stéphanie** de l'Unité EPISABE pour leur aide précieuse dans ce projet.

Ma co-directrice de thèse, **Virginie LIBANTE**, mérite mes remerciements pour son humanité, son écoute et sa bienveillance. Ces deux années à Nancy ont réellement été une aventure, et tu m'as vue dans les moments les plus heureux comme dans les plus difficiles.

Merci d'avoir été là pour partager ces expériences de vie incroyables. Ma co-encadrante de thèse, **Sophie PAYOT**, mérite également des remerciements pour sa gentillesse, sa rigueur et son sens de l'orientation infallible. Bangkok n'aurait définitivement pas été la même ville sans toi. Je tiens à exprimer ma gratitude envers **Johan** et **Stéphane** pour leur aide, mais surtout pour le respect et l'honnêteté qui se sont développés au cours de ces deux années. Le laboratoire n'aurait définitivement pas été aussi agréable sans vous deux. Bien entendu, un grand merci à **Layla** pour avoir eu la patience de m'aider dans mes tâches administratives. Je remercie également tous mes collègues du laboratoire Dynamic pour leur accueil et leur pédagogie, ainsi que les doctorants du laboratoire et des autres laboratoires pour tous ces moments partagés. Un remerciement particulier à **Oyut** pour son soutien pendant cette période, merci de comprendre exactement les émotions que j'ai traversées ces dernières semaines, mois et années...

Enfin, un immense merci à tous mes proches qui m'ont toujours soutenue dans mes aventures les plus folles. Sans vous, je ne serais définitivement pas la personne que je suis aujourd'hui. Merci de croire en moi et de partager cette expérience incroyable que l'on appelle la vie.

Liste des abréviations

AbR : AntiBioRésistance
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNdb : ADN double brin
ADNsb : ADN simple brin
AI-2 : AutoInducer-2
AICV : Agents antimicrobiens d'importance critique en médecine vétérinaire
AIV : Agents antimicrobiens importants en médecine vétérinaire
Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AFLP : Polymorphisme de longueur de fragment amplifié
AMPs : Peptide antimicrobien
AMR : « AntiMicrobial Resistance »
ANI : « Average Nucleotide Identity »
Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARG : « Antibiotic Resistance Gene »
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomique
ARNt : ARN de transfert
ATIV : Agents antimicrobiens très importants en médecine vétérinaire
ATP : Adénosine triphosphate
att : site d'attachement
attB : site d'attachement Bactérien
attI : site d'attachement de la forme circulaire (I pour Intégron mais plus largement élément Intégratif)
attL : site d'Attachement gauche (« Left »)
attR : site d'Attachement droit (« Right »)
BHI : « Brain Heart Infusion »
CC : Complexe Clonal
CIA : Antibiotiques d'Importance Critique
Col : Collaborateurs
Com. Pers : Communication personnelle
CPS : Capsule PolySaccharidique
CRISPR : « Clustered Regularly InterSPaced Repats »
DDH : DNA-DNA hybridation
DR : « Direct Repeat »
dICE : defective « Integrative and Conjugative Element »
dIME : defective « Integrative and Mobilizable Element »
EGM : Élément Génétique Mobile
EPF : « Extracellular Protein Factor »
GDP : Guanosine diphosphate
GTP : Guanosine triphosphate
HAS : Haute Autorité de Santé
HCPC : « Hierarchical Clustering on Principal Components »
HGT : « Horizontal Gene Transfer »
IS : séquences d'insertion
ICE : « Integrative and Conjugative Element »

PICI : « Phage-Inducible Chromosomal Island »
IME : « Integrative and Mobilizable Element »
INRAE : Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
INRS : Institut national de recherche et de sécurité
MDR : « Multiple Drug Resistance »
MGE : « Mobile Genetic Element »
MCG : « Minimal Core Genome »
MLST : « MultiLocus Sequence Typing »
MLVA : Analyse multilocus du polymorphisme de répétitions en tandem
MPF : « Mating Pore Formation system »
MRP : « Muramidase-Released Protein »
N : Nombre
NCBI : « National Center for Biotechnology Information »
NCL : « *novel cps loci* »
OIE : Office International des Épizooties
OMS : Organisation mondiale de la santé
oriT : Origine de Transfert
PCA : « Principal Component Analysis »
PCR : « Polymerase Chain Reaction »
PCR-RFLP : Polymorphisme de taille de produits PCR digérés par microrestriction enzymatique
PFGE : électrophorèse en champ pulsé d'ADN digérés par macrorestriction enzymatique
PLP : « Penicillin Ligand protein »
PRRSV : Virus du Syndrome dysgénésique et respiratoire porcin
QS : « Quorum Sensing »
RAPD : Amplification génique arbitraire
Résepath : Réseau de épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales
RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit
SAO : « Surface Antigen One »
SLY : « SuiLYsin »
SNP : « Single Nucleotide Polymorphism »
SPC : « Summary of product characteristics »
ST : Séquence Type
T4SS : Système de sécrétion de type IV
TBE : Tris-Borate-EDTA
THB : « Todd Hewitt Broth »
THG : Transfert horizontal de gènes
TMPS : TriMethoPrim Sulfamethoxazole
TU : « Translocable Unit »
UCS : « Unconventional circularizable structure »
UE : Union Européenne
WGS : « Whole Genome Sequencing »

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Mortalité due aux résistances aux antibiotiques prédite en 2050 comparée aux causes de mortalité actuelles..... | 17 |
| Figure 2 : Capacité des bactéries à hémolyser le sang contenu dans une gélose au sang | 22 |
| Figure 3 : Micrographies électroniques en transmission de <i>S. suis</i> sérotype 2. | 22 |
| Figure 4 : Arbre phylogénétique des groupes d'espèces de streptocoques | 24 |
| Figure 5 : Microscopie électronique à transmission de cultures de nuit de <i>S. suis</i> P1/7..... | 25 |
| Figure 6 : Structures polysaccharidiques composant la capsule de <i>S. suis</i> | 26 |
| Figure 7 : Principaux ST parmi les souches de <i>S. suis</i> de sérotype 2 identifiées entre 2002 et 2013.. | 30 |
| Figure 8 : Principaux complexes clonaux de <i>S. suis</i> à l'origine d'infections chez l'homme et le porc.. | 31 |
| Figure 9 : Voies de contamination de <i>S. suis</i> et pathologies induites..... | 32 |
| Figure 10 Facteurs prédisposants à l'apparition de signes cliniques suite à une infection par <i>S. suis</i> . | 33 |
| Figure 11 : Démarches pour l'administration d'un autovaccin (ou vaccin autogène). | 36 |
| Figure 12 : Principe de la phagothérapie..... | 37 |
| Figure 13: Deux plats vietnamiens utilisant du sang et/ou de la viande de porcs crue..... | 39 |
| Figure 14 : Facteurs associés à la virulence de <i>S. suis</i> | 42 |
| Figure 15: Interactions de <i>S. suis</i> avec les cellules épithéliales et les protéines de la matrice extracellulaire. | 44 |
| Figure 16 : Concept de « One Health », iconographie issue du site de l'OMS. | 48 |
| Figure 17 : Comparaison des niveaux d'exposition des porcs aux différentes familles d'antibiotiques en 2011 et en 2019..... | 48 |
| Figure 18 : Évolution de l'exposition des porcs à différentes familles d'antibiotiques en France depuis 2016..... | 51 |
| Figure 19 : Mode d'action des antibiotiques pour traiter les infections à <i>S. suis</i> | 52 |
| Figure 20 : Gènes de résistance décrits chez <i>S. suis</i> | 71 |
| Figure 21 : Évolution de la résistance à différentes familles d'antibiotiques mesurée chez <i>S. suis</i> | 73 |
| Figure 22 : Etapes de formation du biofilm. | 76 |
| Figure 23 : Expérience de transformation bactérienne de Griffith..... | 79 |
| Figure 24 : Expérience d'Avery, MacLeod and McCarty..... | 80 |

| | |
|--|-----|
| Figure 25 : Augmentation exponentielle des génomes procaryotes dans les bases de données au cours du temps..... | 81 |
| Figure 26 : Transfert vertical et horizontal de l'ADN bactérien. | 82 |
| Figure 27 : Quatre voies de transfert horizontal..... | 83 |
| Figure 28 : Etapes initiales du processus de transformation chez <i>S. pneumoniae</i> | 84 |
| Figure 29 : Prévalence des prophages dans les génomes de <i>S. suis</i> | 86 |
| Figure 30 : EGM pouvant être transférés par conjugaison..... | 88 |
| Figure 31 : Structure des transposons composites et des unités translocables (TU)..... | 90 |
| Figure 32 : Diversité des interactions entre EGM..... | 93 |
| Figure 33 Excision/intégration d'un ICE (à gauche) et d'un IME (à droite)..... | 95 |
| Figure 34 : Mécanisme d'échange de deux brins d'ADN avec une catalyse par une tyrosine recombinase..... | 96 |
| Figure 35 : Mécanisme d'échange de deux brins d'ADN catalysé- par une sérine recombinase. | 97 |
| Figure 36 : Représentation des différentes familles de relaxases..... | 99 |
| Figure 37 : Architecture d'un T4SS chez les bactéries Gram négatives..... | 100 |
| Figure 38 : Structure composite d'éléments intégratifs chez la souche <i>S. suis</i> NSUI84 et formes excisées possibles. | 103 |
| Figure 39 : Sélection des familles et antibiotiques utilisés. | 109 |
| Figure 40 : représentation schématique du protocole de conjugaison sur filtre..... | 156 |
| Figure 41 : Représentation schématique du protocole de conjugaison en billes..... | 156 |
| Figure 42 : Tests d'excisions des ICE et IME présents chez la souche <i>S. suis</i> 1285..... | 159 |
| Figure 43 : Excision d'ICE_ <i>Ssu1595 TnGBS2</i> | 160 |
| Figure 44 : Excision d'ICE_ <i>Ssu1552_lysS</i> | 161 |
| Figure 45 : Alignement des séquences <i>att</i> d'IME_ <i>Ssu1492_PPI</i> | 163 |
| Figure 46 : Tests de production de bactériocines par des souches de <i>S. suis</i> | 164 |
| Figure 47 : Mobilisation d'IME_ <i>NSUI088_PPI</i> dans une souche de <i>S. thermophilus</i> LMG18311..... | 167 |
| Figure 48 : Optimisation des conditions de conjugaison. | 169 |
| Figure 49 : Transfert d'ICE_ <i>Ssu1552_lysS</i> de la souche 1552 vers une souche de <i>S. thermophilus</i> LMG18311..... | 170 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----------|
| Tableau 1 : Gènes de référence pour le MLST des souches de <i>S. suis</i> . | 28 |
| Tableau 2 : Caractéristiques des différents ICE d'intérêt et souches les portant. | 151 |
| Tableau 3 : Souches sélectionnées pour leur contenu en IME et ICE. | 151 - 152 |
| Tableau 4 : Tests d'excisions effectués sur les ICE et dICE d'intérêt. | 157 - 158 |
| Tableau 5 : Tests d'excision réalisés sur les IME d'intérêt | 162 |

Table des matières

| | |
|---|-----|
| Remerciements | 1 |
| Liste des abréviations | 5 |
| Liste des figures..... | 9 |
| Liste des tableaux | 11 |
| Introduction générale..... | 17 |
| Chapitre 1 : Revue de la littérature..... | 21 |
| I. <i>Streptococcus suis</i> | 21 |
| i. Généralités | 21 |
| ii. Typage et distribution géographique..... | 25 |
| iii. Infection et transmission de <i>S. suis</i> | 31 |
| iv. Pathogénèse de <i>S. suis</i> et facteurs de virulence | 41 |
| II. Antibiotiques et mécanismes de résistance | 47 |
| i. Utilisation et réglementation des antibiotiques | 47 |
| ii. Mode action des antibiotiques utilisés contre <i>S. suis</i> | 51 |
| iii. Prévalence de la résistance et mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>S. suis</i> | 54 |
| iv. Revue “Update on the Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Mobile Resistome in the Emerging Zoonotic Pathogen <i>Streptococcus suis</i> ” | 54 |
| v. Mise à jour des connaissances depuis la publication de cette revue (2021)..... | 73 |
| III. Biofilms et résistance aux antibiotiques..... | 75 |
| i. Composition d’un biofilm..... | 75 |
| ii. Rôle du biofilm dans la résistance aux antibiotiques | 76 |
| iii. Influence du biofilm dans le transfert de gènes..... | 78 |
| IV. Le transfert de gènes chez <i>Streptococcus suis</i> | 78 |
| i. Généralités sur le transfert horizontal | 82 |
| ii. Barrières au transfert horizontal et interactions entre EGM | 90 |
| V. Eléments intégratifs transférables par conjugaison..... | 94 |
| i. Généralités sur les ICE et les IME | 94 |
| ii. Module de recombinaison..... | 95 |
| iii. Module de transfert | 98 |
| iv. Module de régulation..... | 101 |
| v. Module de fonctions accessoires..... | 101 |
| vi. Eléments intégratifs conjugatifs/mobilisables décrits chez <i>S. suis</i> :..... | 102 |

| | |
|--|-----|
| Chapitre 2 : Problématique et objectifs des travaux | 105 |
| Chapitre 3 : Résultats | 109 |
| I. Profils de résistance aux antibiotiques de souches de <i>Streptococcus suis</i> isolées chez le porc, le sanglier ou l’Homme, entre 1994 et 2020, en France..... | 109 |
| II. Caractérisation des gènes de virulence, de résistance aux antimicrobiens portés par des éléments génétiques mobiles et de compétence chez des souches de <i>Streptococcus suis</i> isolées en France. | 125 |
| III. Etude expérimentale de l’excision et du transfert d’ICE et d’IME portant des gènes de résistance aux antibiotiques chez <i>S. suis</i> | 149 |
| Chapitre 4 : Discussion..... | 175 |
| i. Phénotype de résistance aux antibiotiques..... | 176 |
| ii. Résistance aux pénicillines : | 177 |
| iii. Les (nouveaux) gènes de résistance portés par les éléments génétiques mobiles | 178 |
| iv. Rôle des souches non cliniques dans la résistance aux antibiotiques | 180 |
| v. La compétence chez <i>S. suis</i> et son implication dans la résistance aux antibiotiques..... | 181 |
| vi. Facteurs de virulence | 181 |
| Chapitre 5 : Conclusion et perspectives | 183 |
| Bibliographie..... | 187 |
| Sitographie | 219 |
| Abstract | 279 |
| Résumé grand public : | 281 |
| Abstract | 281 |

Introduction générale

L'augmentation de la résistance bactérienne aux antibiotiques constitue une menace pour la sécurité sanitaire mondiale. En effet, si la trajectoire actuelle est maintenue, elle pourrait être responsable de la majorité des décès dans le monde à l'horizon 2050 (Figure 1) (Murray et al., 2022). La crise sanitaire liée à la COVID n'a fait qu'exacerber ce phénomène en entraînant une hausse de la consommation d'antibiotiques (pour limiter les surinfections) et de désinfectants, pouvant conduire à l'émergence de résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques. De plus, cette pandémie a mis en évidence le risque que représentent les pathogènes émergents dans le déclenchement d'épidémies.

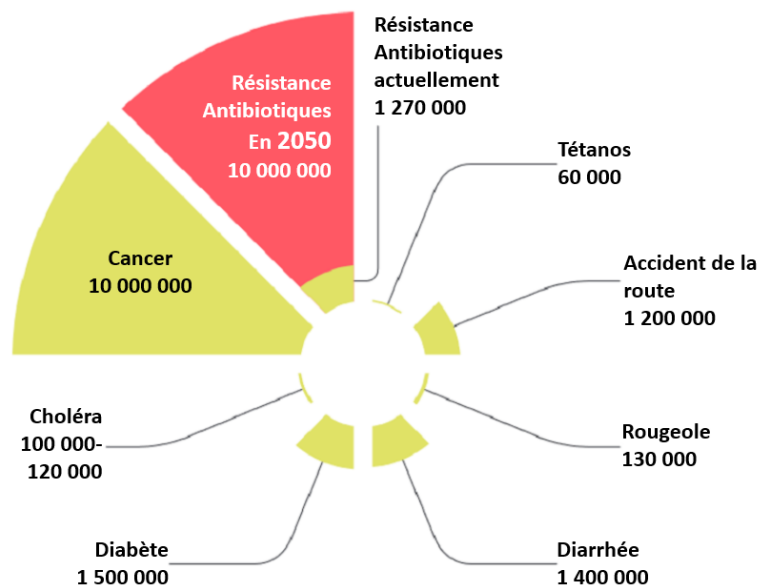


Figure 1 : Mortalité due aux résistances aux antibiotiques prédite en 2050 comparée aux causes de mortalité actuelles. Site de l'OMS. D'après Murray et al., 2022.

La lutte contre l'antibiorésistance est désormais un enjeu majeur de santé publique. Une coordination entre les différents acteurs et secteurs concernés, en santé humaine, animale et environnementale est donc nécessaire pour prévenir l'émergence et la dissémination de l'antibiorésistance. Cette démarche s'inscrit dans le concept d'une « seule santé » ou « One Health » mis en avant par l'union européenne (UE) et l'organisation mondiale de la santé (OMS). Un des points clé pour contrôler l'antibiorésistance est de limiter la dissémination des gènes d'antibiorésistance (AbR). Certains gènes d'AbR sont localisés sur des éléments

génétiques mobiles (EGM). Les EGM sont des fragments d'ADN pouvant se transmettre d'une bactérie à une autre à l'exception des séquences d'insertion qui, elles, se déplacent au sein du chromosome bactérien. Ils jouent un rôle majeur dans la dissémination de gènes d'AbR en permettant leur transmission entre bactéries d'espèces différentes et leur circulation entre différents écosystèmes (Homme, animal, environnement).

Streptococcus suis est une bactérie pathogène du porc responsable de pertes économiques importantes pour les exploitations porcines. Elle est également retrouvée dans la faune sauvage (oiseaux, sangliers) et est responsable d'infections chez l'Homme (pathogène zoonotique) avec plusieurs épidémies mortelles rapportées en Asie et des infections humaines sporadiques en Europe (Gottschalk & Segura, 2019). C'est donc un modèle d'étude « One Health » intéressant. De nombreuses souches de *S. suis* sont isolées de porcs asymptomatiques (souches commensales ou de portage isolées lors d'écouvillonnage nasal). D'autres souches sont isolées de l'appareil respiratoire (souches opportunistes). Enfin, un troisième pathotype de *S. suis* existe, certaines souches sont en effet capables de franchir la barrière épithéliale et exprimer différents facteurs de virulence pour engendrer des infections telles que des méningites, septicémie, arthrite et polysérites (souches cliniques). La présence de facteurs de virulence chez les souches n'explique pas à elle seule la survenue des infections. Le statut immunitaire de l'hôte ainsi que les conditions d'élevage jouent un rôle non négligeable dans le processus infectieux. La majorité des cas d'infections à travers le monde sont induits par des souches de sérotypes particuliers (sérotypes 2, 9 et 3) (Segura, 2020). Pour cette raison, le typage des souches est régulièrement effectué soit par « typage par séquençage multilocus » ou MLST, soit par des techniques basées sur le séquençage de génome entier (Goyette-Desjardins Guillaume et al., 2014). *S. suis* est une bactérie qui présente une forte diversité génomique avec un pangénome ouvert, c'est-à-dire que chaque nouveau génome séquencé apporte son lot de nouveaux gènes.

S. suis est également un réservoir important de gènes d'AbR localisés sur des EGM chromosomiques (Bellanger et al., 2014; Dechêne-Tempier et al., 2021). Ces EGM se transfèrent de façon horizontale par différents mécanismes. Les EGM porteurs de gènes d'AbR, décrits chez *S. suis*, sont majoritairement des éléments intégratifs conjugatifs (ICE) ou mobilisables (IME pour « Integrative Mobilizable Elements »). Les ICE s'excisent et se transfèrent vers une bactérie receveuse de façon autonome via la machinerie de conjugaison qu'ils codent. Les IME sont capables de s'exciser mais doivent parasiter le système de

conjugaison d'un ICE ou d'un plasmide conjugatif pour se transférer vers une autre bactérie (Guédon et al., 2017). La présence de gènes d'AbR sur de tels éléments constitue un risque important de propagation, mais ces EGM sont encore très peu étudiés en raison de leur identification complexe. De plus, certains EGM sont présents en tandem ou sous forme emboîtée (un EGM intégré dans un autre EGM). Enfin, la présence de transposons ou d'autres éléments génétiques peut augmenter la diversité d'EGM portant des gènes d'AbR chez ce pathogène.

En France, la surveillance de l'antibiorésistance des bactéries isolées chez les animaux malades (dont *S. suis* chez le porc) est assurée par le réseau Résapath. La mise en place en 2012-2016 du premier plan "EcoAntibio" a permis de réduire de 37% l'exposition des animaux aux antibiotiques. Malgré tout, le rapport annuel de Résapath indiquait en 2019 des taux de résistance élevés chez *S. suis*, avec 80% de résistance aux tétracyclines et 60% de résistance aux macrolides et aux lincosamides. De plus, 2% des souches analysées étaient résistantes aux β -lactamines. Les β -lactamines comprennent les pénicillines qui sont les antibiotiques couramment utilisés pour traiter les infections à streptocoques. Afin de limiter l'usage des antibiotiques, différents moyens de lutte sont utilisés ou en cours de développement, tels que la vaccination *via* un autovaccin, l'utilisation de phages ou encore d'huiles essentielles.

Chapitre 1 : Revue de la littérature

I. *Streptococcus suis*

i. Généralités

a. Identification, classifications et phylogénie des streptocoques

Le genre *Streptococcus* fut décrit pour la première fois par Billroth en 1874 (Billroth, 1874). Il dépeint alors de petits organismes isolés ou regroupés par paires ou en chaînettes de 4 à plus de 20 cellules. Cinq ans plus tard, en 1879, Pasteur isole un microorganisme de l'utérus et du sang d'une patiente souffrant de la fièvre puerpérale, et l'identifie comme étant l'agent pathogène responsable de cette maladie. Il nomme ce microorganisme *Streptococcus* (Pasteur Louis, 1879). Le terme *Streptococcus* provient du grec strepto- « στρεπτός » signifiant tordu ou simple à plier et -coccus « κόκκος » signifiant baie (etymonline.com). Il est à noter que ce fût la première identification de ce microorganisme en tant qu'agent pathogène dans la littérature scientifique (Ferretti & Köhler, 2016).

Le genre *Streptococcus* ne cessa pas ensuite d'être étoffé par la découverte de nouvelles espèces. Ainsi, en 1881, Pasteur, en France, et Sternberg, aux États-Unis, isolent tous deux *Streptococcus pneumoniae* chez des patients souffrant de pneumonie (Pasteur, 1881, Sternberg, 1881, Cavaillon & Legout, 2022). De son côté, Rosenbach identifie *Streptococcus pyogenes* en 1884 à partir de prélèvements de lésions suppuratives (Rosenbach, 1884). En 1936, Evans isole également *S. pyogenes* à partir d'une plaie purulente chez l'homme (Evans, 1936).

Les travaux antérieurs de Schottmuller en 1903 avaient déjà permis de classer les streptocoques en deux groupes et d'initier une nomenclature pour catégoriser les bactéries appartenant à ce genre. Dans ces études préliminaires, le choix de la structuration taxonomique des souches était dépendant de leur capacité à hémolyser le sang présent dans une gélose (Figure 2). Les streptocoques α -hémolytiques sont capables d'une lyse partielle des érythrocytes, au cours de laquelle l'hème est transformé en biliverdine, un pigment biliaire de couleur verte comme présenté au centre de la Figure 2 (Abraham & Kappas, 2008). Les streptocoques β -hémolytiques sont, quant à eux, capables d'une hémolyse totale (Figure 2 gauche). Un autre groupe a été ajouté : les streptocoques γ -hémolytiques qui sont incapables d'hémolyser le sang (Figure 2 droite).

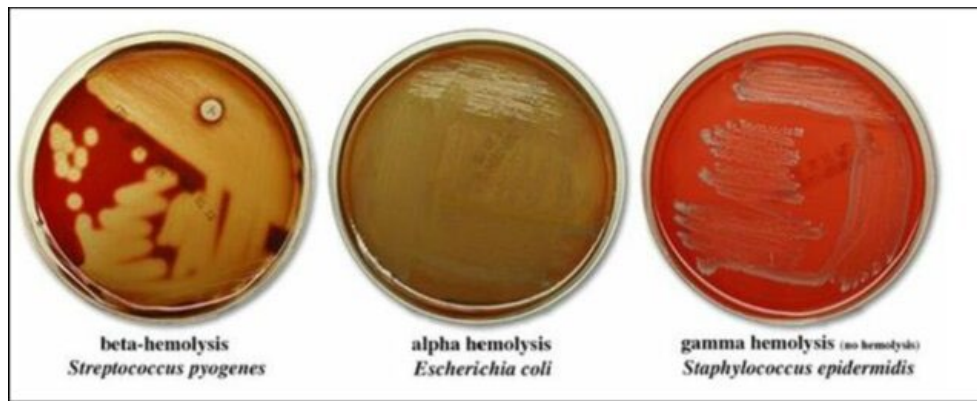


Figure 2 : Capacité des bactéries à hémolyser le sang contenu dans une gélose au sang (Y. Kusumo Adi Arji Atmanto, 2022).

Grâce aux travaux de Schottmuller, Lancefield met au point et publie en 1933, une méthode de classification des streptocoques hémolytiques basée sur la reconnaissance entre antigène et anticorps (Lancefield, 1933) illustré ci-dessous, Figure 3 (Charland et al., 1998). Cette classification a permis de les séparer en différents groupes (4 groupes : A à D) conduisant ainsi à une identification plus précise des souches. Cette méthode a ensuite été enrichie afin d'identifier 21 groupes différents.

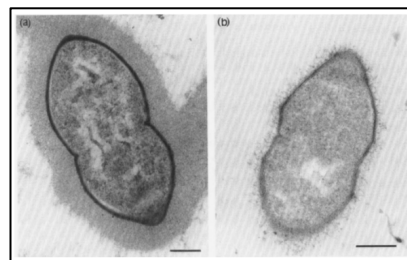


Figure 3 : Micrographies électroniques en transmission de *S. suis* sérotype 2 : (a) souche 5735-SM stabilisée avec un antisérum polyclonal de lapin spécifique de type 2, (b) souche 5735-SM stabilisée avec du sérum de lapin normal. Barres d'échelle de 200nm. Figure titrée de (Charland et al., 1998).

Vers la fin du XXe siècle, l'avènement des techniques de biologie moléculaire a permis de poser un nouveau regard sur la classification des streptocoques. En bactériologie, on peut considérer deux souches comme appartenant à la même espèce si elles présentent au minimum 70% d'identité de séquences (« DNA-DNA hybridization » : DDH) et ce depuis 1987 (Wayne et al., 1987, Okura et al., 2016). En 1994, Stackebrandt et ses collaborateurs ont suggéré que l'analyse de la séquence du gène codant l'ARNr 16S puisse être utilisée pour définir une espèce chez les bactéries. Cette proposition repose sur la corrélation observée entre les similitudes de

séquence de l'ARNr 16S et la DDH (Stackebrandt et al., 1994). Leurs travaux ont mis en évidence qu'en dessous d'une valeur seuil de 97% d'identité des séquences d'ARNr 16S, les valeurs de DDH correspondantes étaient toujours inférieures à 70%. Cette nouvelle technique a permis à Kawamura et ses collaborateurs de diviser le genre *Streptococcus* en sept groupes distincts. Le groupe le plus large est nommé « Pyogenic », et est suivi des groupes « Mitis », « Anginosus », « Salivarius », « Bovis », « Mutans », et enfin, « Unknown », appelé ainsi car aucun nom ne fût proposé pour ce groupe (Kawamura et al., 1995, Lal et al., 2011). Ce dernier regroupe les espèces *Streptococcus acidominimus* *Streptococcus pleomorphus* et *Streptococcus suis* (Figure 4 en rose). Cette classification a été utilisée comme méthode de référence pendant plus de 50 ans et a depuis été largement complétée par de nouvelles espèces de streptocoques (Figure 4) (Richter & Rosselló -Móra, 2009, Y. Pan et al., 2018).

Cependant, l'utilisation de la DDH pour distinguer les espèces bactériennes a été remise en question par différents chercheurs qui trouvent cet outil arbitraire et incorrect. Konstantinidis et Tiedje soutiennent que « une définition de l'espèce qui ne tient pas compte de l'écologie des souches, en plus de leur distance évolutive, est problématique en ce qui concerne le contenu en gènes communs et le potentiel phénotypique. » (Konstantinidis & Tiedje, 2005). En effet, les souches bactériennes partageant une niche écologique acquièrent selon les auteurs des éléments génétiques externes ou des mutations leur permettant une adaptation à leur niche écologique. Ils soutiennent donc l'idée d'utiliser exclusivement le « core genome », codant pour des protéines orthologues, pour identifier les espèces bactériennes. Le « core genome » ou génome « de base » est défini comme l'ensemble des gènes homologues présents chez une majorité de souches et est opposé au « pangénome » représentant lui l'ensemble des gènes retrouvés dans l'espèce bactérienne. Cette méthode utilise l'ANI (« Average nucleotide identity ») et une valeur de 94% d'ANI correspond à une DDH de 70%. Quatre ans plus tard, Richter et Rossellon soutiennent l'utilisation de cette méthode et proposent un seuil de 95-96% d'ANI pour la définition d'une espèce (Richter & Rosselló -Móra, 2009). L'essor de la comparaison des « core genomes » est à relier à la démocratisation de techniques de séquençage du génome entier (WGS) des micro-organismes.

Ces avancées ont permis de définir les streptocoques comme appartenant au phylum des Firmicutes contenant la classe Bacilli dont fait partie l'ordre des Lactobacillales auquel se rattache la famille des *Streptococcaceae*. Le genre *Streptococcus* compte actuellement plus de

200 espèces selon le site LPSN.dsmz.de «List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature» fondé en 1997 par Jean P. Euzéby (Parte et al., 2020).

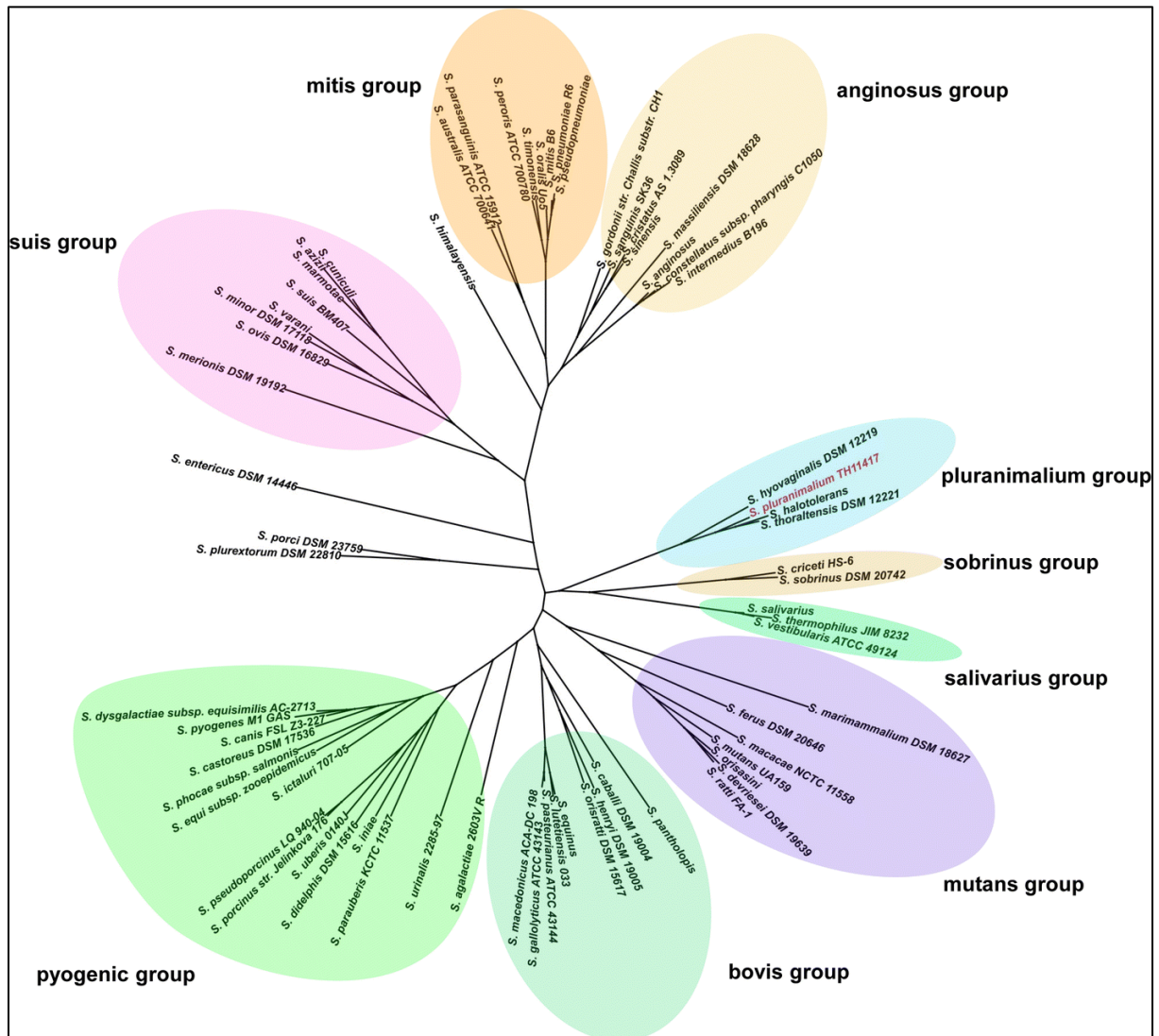


Figure 4 : Arbre phylogénétique des groupes d'espèces de streptocoques (Y. Pan et al., 2018).

b. Taxonomie et classification de *Streptococcus suis*

Après avoir parcouru les principales découvertes réalisées autour du genre *Streptococcus*, nous nous tournons maintenant plus spécifiquement vers *S. suis*, l'espèce bactérienne au cœur de ce travail de thèse.

Au début des années 1960, De Moor a utilisé la méthode sérologique développée par Rebecca Lancefield pour classifier des souches de streptocoques isolées chez des porcs souffrant de septicémies. À la suite de ses tests, il a identifié des souches de streptocoques qui

ne correspondaient à aucun des groupes existants à l'époque. De Moor a identifié quatre sous-groupes au sein du groupe D de la classification de Lancefield, chacun présentant des réactions anti-sériques uniques (de Moor, 1963). Le "groupe S" désignait les streptocoques retrouvés chez les porcelets et le "groupe R" les streptocoques retrouvés chez les porcs adultes. Le "groupe RS" réagissait quant à lui aux solutions anti-sériques des groupes R et S, tandis que le "groupe T" ne présentait aucune réaction avec les solutions anti-sériques de l'époque, y compris celles des groupes R et S (de Moor, 1963).

Il a fallu attendre 1966 pour qu'Elliott s'intéresse à ces souches et les identifie comme un sous-groupe du groupe D, proposant de les nommer "*Streptococcus suis*" (Elliott, 1966). Ce nom a finalement été officiellement approuvé en 1987 par Kilpper-Balz et Schleifer, qui ont décrit les souches de *S. suis* comme de petites bactéries rondes (cocci) d'une taille inférieure à 2 µm (de 0,5 à 1 µm), généralement isolées, en paires ou formant de courtes chaînes (Figure 5), non mobiles, à coloration de Gram positive, à métabolisme fermentatif et aéro-anaérobie facultatif (Kilpper-Balz R & Heinz Schleifer K, 1987, Haas & Grenier, 2016). Ce sont des bactéries non sporulantes et mésophiles (Prescott et al., 2013).

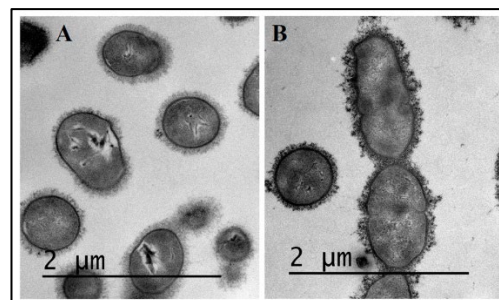


Figure 5 : Microscopie électronique à transmission de cultures de nuit de *S. suis* P1/7 cultivées dans le milieu Todd Hewitt (THB) seul (A) ou dans le THB complété par 1/2 CMI d'amoxicilline (B) (Figure tirée de Haas & Grenier, 2016).

ii. Typage et distribution géographique

a. Sérotypage des souches de *S. suis*

Lors de l'identification des nouveaux groupes S, R, RS et T par De Moor, celui-ci expliqua que les souches appartenant à ces groupes présentaient toutes un antigène différent de celui des streptocoques identifiés dans la classification de Lancefield (de Moor, 1963). Il précisa que ces antigènes étaient des polysaccharides présents dans l'enveloppe cellulaire (Figure 6a). Trois ans plus tard, Elliott apporta des précisions aux travaux de De Moor en reclassant ces groupes comme des sous-groupes du groupe D et en caractérisant plus précisément les sucres

constituant la capsule des souches (Elliott, 1966). Il proposa de renommer les sous-groupes R, S, RS en "types capsulaires" 1, 2 et 1/2, tout en expliquant le lien entre la composition polysaccharidique de la capsule des souches et la réaction sérologique de Lancefield. En effet, la nature et la taille des chaînes polysaccharidiques (Figure 6b) entrant dans la composition des capsules permettaient de distinguer les différents sérotypes (Elliott et al., 1977).

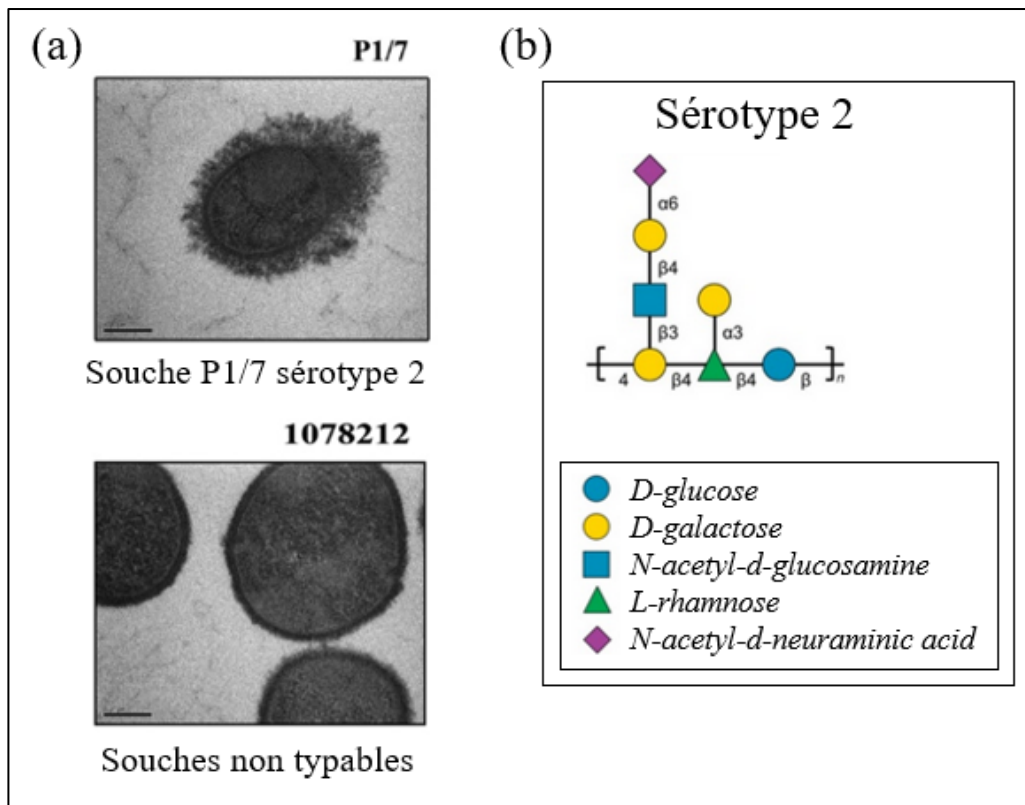


Figure 6 : Structures polysaccharidiques composant la capsule de *S. suis*. (a) Visualisation de la capsule de *S. suis* par microscopie électronique à transmission. Grossissement : 80 000 X (Bonifait et al., 2011). (b) Structures des polysaccharides composant la capsule des souches de sérotypes 2 (Goyette-Desjardins et al., 2018).

En tout, 35 sérotypes ont été identifiés sur la base de réactions sérologiques dirigées contre la capsule polysaccharidique (CPS), en utilisant des tests de coagglutination, de réaction capsulaire et de précipitation capillaire : les sérotypes 1, 2, 1/2, 3 à 34 (Goyette-Desjardins et al., 2014, Segura et al., 2017).

Cependant, en 2000, le séquençage de l'ADNr 16S et du gène *cpn60* des souches de référence appartenant aux sérotypes 32 et 34 a révélé qu'elles appartenaient à l'espèce *Streptococcus orisratti* (Hill et al., 2005). Le séquençage des gènes *sodA* et *recN* a ensuite conduit à l'exclusion des sérotypes 20, 22 et 26, qui ont été reclassés comme appartenant à l'espèce *Streptococcus parasuis* (Nomoto et al., 2015), et le sérotype 33 a été identifié comme

appartenant à l'espèce *Streptococcus ruminantium* (Tohya et al., 2017). Ces avancées ont donc réduit le nombre de sérotypes au sein de l'espèce *S. suis* à 29.

Les tests de coagglutination, historiquement utilisés pour sérotyper les isolats de *S. suis*, sont de plus en plus remplacés par des tests moléculaires dans la mesure où peu de laboratoires d'analyses ont accès à l'intégralité des antisérums de référence dirigés contre les 29 sérotypes de *S. suis*. De plus, certains isolats n'exprimant pas de capsule lors de la culture bactérienne, seule la détection génomique de leurs loci *cps* peut permettre de les sérotyper. Par conséquent, différents tests PCR, basés sur l'amplification des gènes *cps* des différents sérotypes de *S. suis*, ont été développés. En 2014, Okura et ses collaborateurs, ont proposé une technique de PCR multiplex en deux étapes (Okura et al., 2014). Du fait de sa simplicité, sa rapidité, mais également son coût relativement faible, cette technique a été adoptée par la communauté scientifique. Elle présente néanmoins des limites, en particulier l'incapacité de discriminer les sérotypes 2 et 1/2 ainsi que les sérotypes 1 et 14. Afin de remédier à cette lacune, d'autres méthodes de laboratoire faisant appel au séquençage ou à la PCR ont été développées (Athey et al., 2016, Lacouture et al., 2020, Matiasovic et al., 2020). Malgré l'ensemble de ces méthodes de laboratoires, coagglutination, PCR et séquençage, de nombreuses souches restent non-typables.

Ces souches non-typables expriment de nouvelles capsules ou représentent de nouveaux sérotypes (Goyette-Desjardins et al., 2014, Bojarska et al., 2019). C'est le cas du sérotype Chz découvert chez des porcs atteints de méningite (Pan et al., 2015). De plus, de nouveaux loci *cps* (NCL) codant une capsule plus épaisse ont été caractérisés (NCL1 à NCL 26) (Goyette-Desjardins et al., 2014, Okura et al., 2016, Qiu et al., 2016, Zheng et al., 2015, Zheng et al., 2017, Huang et al., 2019).

b. Typage génomique et MLST des souches de S. suis

Le sérotypage paraissant insuffisant pour caractériser les souches de *S. suis*, des méthodes alternatives, basées sur la séquence génomique ont été développées : la macrorestriction enzymatique et l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), l'amplification aléatoire d'ADN polymorphique (RAPD), le polymorphisme de taille de fragment amplifié (AFLP), le polymorphisme de taille de fragments PCR après restriction enzymatique (RFLP), le ribotypage, l'analyse multilocus du polymorphisme de répétitions en tandem (MLVA) et le typage par séquençage multilocus (MLST) (King et al., 2002, Goyette-Desjardins et al., 2014,

Prüfer et al., 2019, Matajira et al., 2020). Cette dernière méthode est devenue la méthode de référence ou « gold standard » pour typer *S. suis* (Goyette-Desjardins et al., 2014, Hatrongjit et al., 2020). Elle est basée sur les séquences nucléotidiques de fragments internes de 7 gènes de référence présents chez toutes les souches de *S. suis* et dans lesquels les mutations sont supposées être neutres (Tableau 1):

Tableau 1 : Gènes de référence pour le MLST des souches de *S. suis*.

| Gène | Fonction |
|--------------------------------|---|
| <i>cpn60</i> (= <i>groEL</i>) | Protéine chaperone |
| <i>aroA</i> | Biosynthèse d'acides aminés aromatiques |
| <i>dpr</i> | Résistance aux stress environnementaux |
| <i>gki</i> | Glucose kinase |
| <i>mutS</i> | Réparation des dommages à l'ADN |
| <i>recA</i> | Recombinaison homologue |
| <i>thrA</i> | Homosérine déshydrogénase |

Pour chaque *locus*, les différentes séquences nucléotidiques se voient attribuer des numéros alléliques et leur combinaison définit un « sequence type » (ST) (Arends & Zanen, 1988, King et al., 2002, Okura et al., 2016, Hatrongjit et al., 2020). Les isolats qui partagent le même ST sont supposés partager un ancêtre commun récent. En raison du nombre élevé d'allèles pour chacun des sept loci, il est statistiquement improbable que des isolats aient le même profil par hasard (King et al., 2002, Glazunova & Ronique Roux, 2009, Hatrongjit et al., 2020). En 20 ans, 3665 séquences alléliques ont ainsi pu être identifiées au sein de l'espèce *S. suis* à travers le monde (données disponibles sur le site <https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-suis> 10.09.23 (Jolley et al., 2018)). Les ST peuvent être regroupés par complexe clonal (CC), défini comme un groupe de ST ayant au moins six allèles en commun (Wu et al., 2023).

D'autres méthodes, basées sur le WGS, permettent le typage de *S. suis*. Elles reposent soit sur l'analyse de variations de séquence (« Single Nucleotide Polymorphism » ou SNP) soit sur l'analyse d'allèles, MLST mais sur un panel de gènes plus large (Hatrongjit et al., 2020). Par exemple, un typage basé sur le « core minimal genome » (MCG) a permis de séparer les souches isolées chez l'homme des souches isolées chez l'animal et de séparer les souches

responsables d'épidémies de celles causant des infections moins sévères ou sporadiques (C. Chen et al., 2013). Certaines souches dites « divergentes » pouvant être responsable de cas d'infection présentent un core génome réduit (Baig et al., 2015). Chez *S. suis*, le génome a une taille comprise entre 1,7 et 2,7 Mb (Paolo Lee & Andam, 2022).

c. Distribution mondiale des sérotypes, des séquences types (ST) et des complexes clonaux (CC) de S. suis.

Bien que le sérotype 2 soit prédominant dans les cas d'infection humaine à travers le monde (74,7%), il faut noter que le sérotypage des souches n'est pas systématiquement effectué (Goyette-Desjardins et al., 2014, Segura et al., 2017). En effet, dans le monde 23% des publications rapportant des cas cliniques ne précisent pas le sérotype de la souche et ce pourcentage atteint 37% en Europe (Goyette-Desjardins et al., 2014) De plus, les sérotypes 4, 5, 9, 14, 16, 21, 24 et 31 peuvent induire des cas pathologiques de façon sporadique chez l'Homme (Arends & Zanen, 1988, Gottschalk et al., 2007, Nghia et al., 2008, Kerdsin et al., 2009, Kerdsin et al., 2011, 2016, 2017, 2020, Callejo et al., 2014, Gustavsson & Ramussen, 2014, Taniyama et al., 2016, Vötsch et al., 2018, Hatrongjit et al., 2020). Certains de ces articles relatent également la présence de facteurs de risques tel que la cirrhose du foie ou une immunodéficience. Les auteurs émettent comme hypothèse qu'en absence de ces pathologies pré-existantes chez les patients, ces sérotypes auraient un pouvoir pathogène moindre (Arends & Zanen, 1988, Nghia et al., 2008, Kerdsin et al., 2009, Vötsch et al., 2018).

Parmi les cas d'infection identifiés chez le porc dans le monde entier entre 2002 et 2013, la majorité (67,1%) ont été décrits en Amérique du Nord avec pour sérotypes, les sérotypes 2 (27,9%), 9 (19,4%) et 3 (15,9%) (Goyette-Desjardins et al., 2014, Segura et al., 2017). En Europe, le sérotype 9 est le plus décrit dans les cas pathologiques chez le porc. Il est suivi par les sérotypes 2, 7, 8 et 3 (Goyette-Desjardins et al., 2014). En France, dans les élevages porcins, les sérotypes 2 et 9 prédominent (représentant à eux deux 50% des isolats). Ils sont suivis par les sérotypes 7, 3 et 1 (Labocéa, com. pers.).

Une étude mondiale de la répartition géographique des différents ST (Figure 7) a mis en évidence une dominance des ST25 et ST28 en Amérique du Nord et de la ST1 en Europe et en Asie (Estrada et al., 2019). L'analyse des CC a confirmé l'omniprésence du CC1 comme l'illustre la Figure 8 (Schultsz et al., 2012, Hatrongjit et al., 2020, Wu et al., 2023). Ce CC inclut

d'autres ST que le ST1 en particulier le ST7, responsable des épidémies de 1998 et 2005 et est principalement présent en Chine (Goyette-Desjardins et al., 2014).

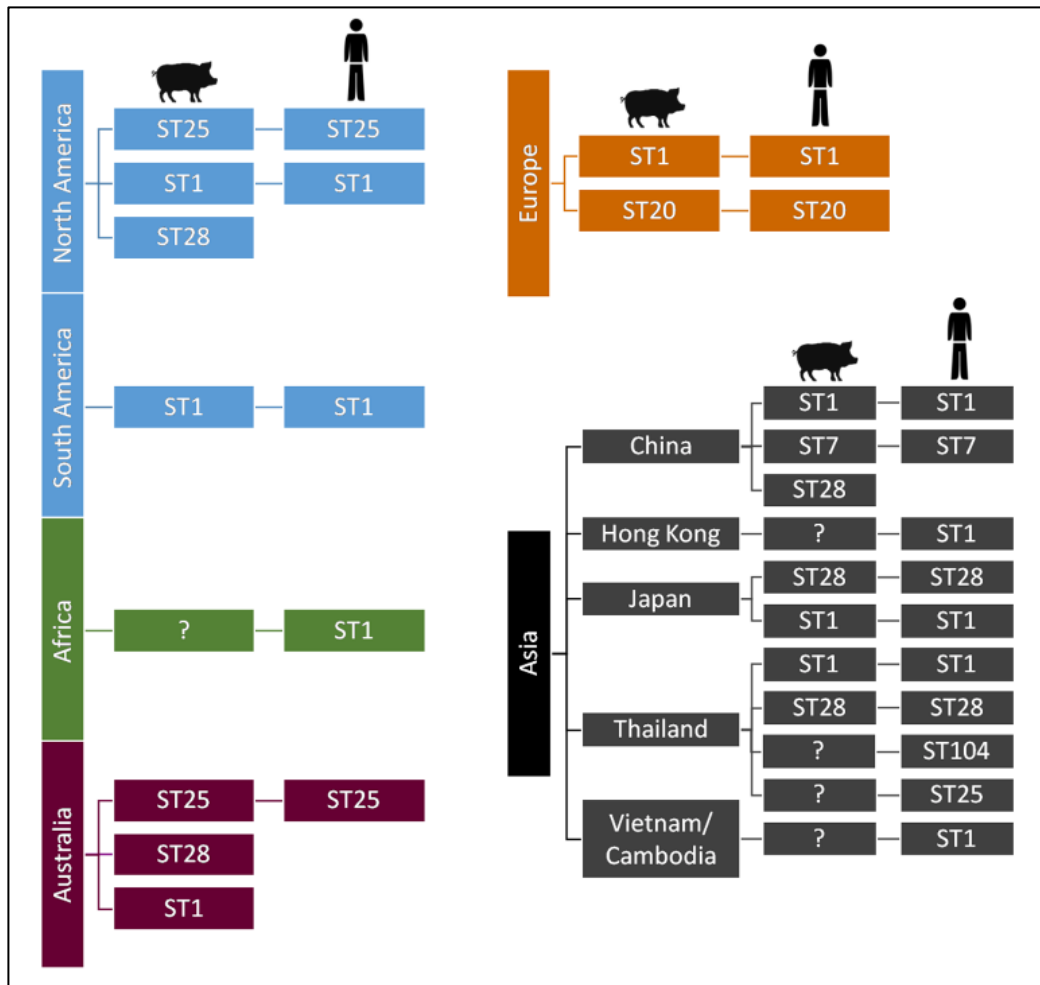


Figure 7 : Principaux ST parmi les souches de *S. suis* de sérotype 2 identifiées entre 2002 et 2013 (Segura et al., 2017).

Une étude de 2012 menée sur 148 souches de *S. suis* (24 souches d'origine humaine et 124 souches d'origine porcine) a permis d'identifier le CC1 (n=58%) et de pointer l'émergence du CC20 (42%) au Pays-Bas pour les souches d'origine humaine alors que le CC16 (50%) était présents chez des infections d'origine porcine (Schultsz et al., 2012, Hatrongjit et al., 2020). Les CC25 ou CC28 ont été signalés en Amérique du Nord, en Asie et en Australie mais sont peu fréquents en Europe (Figure 8) (Goyette-Desjardins et al., 2014, Groves et al., 2015, Kerdsin et al., 2018, Oh et al., 2018). Enfin, les CC104 et CC233/379 semblent endémiques en Thaïlande (Figure 8) (Hatrongjit et al., 2020).

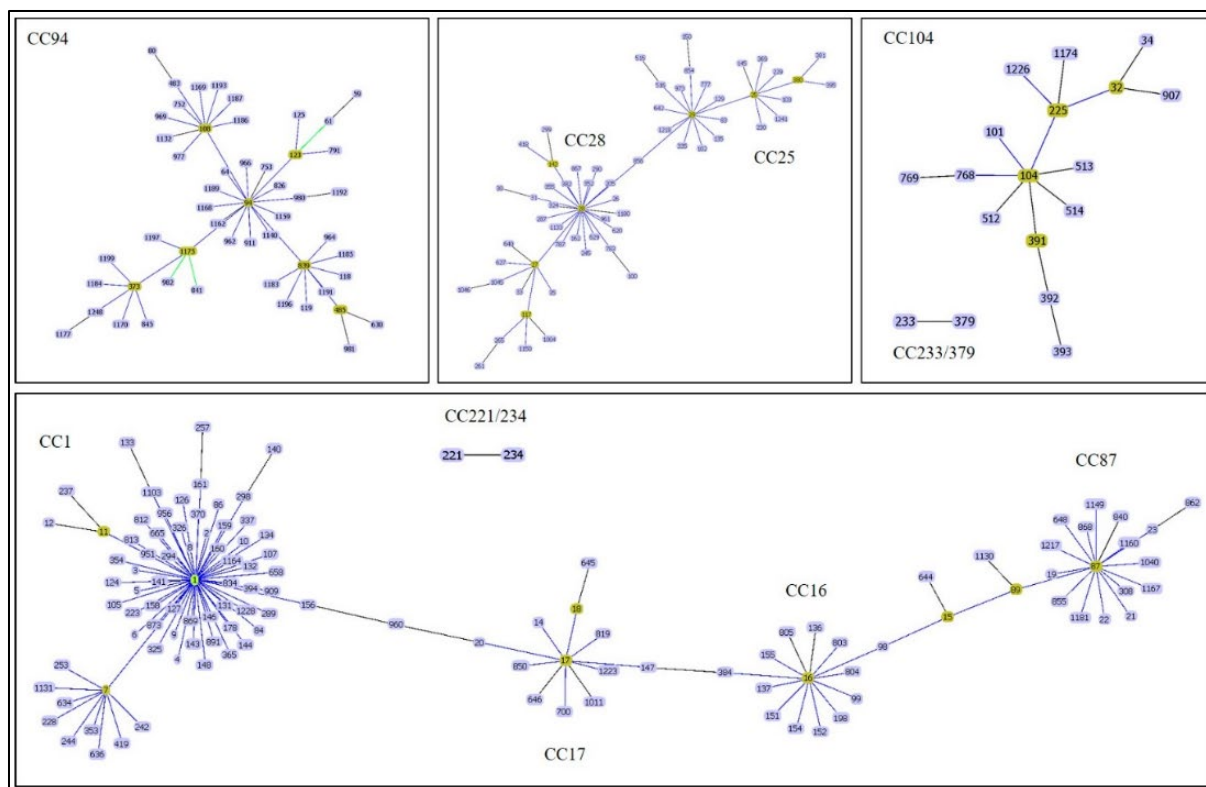


Figure 8 : Principaux complexes clonaux de *S. suis* à l'origine d'infections chez l'homme et le porc. CC1 est apparenté à CC17, tandis que CC17 est étroitement lié à CC16. CC16 et CC87 sont apparentés via ST15 et ST89. CC25 et CC28 sont apparentés via ST856. Les autres CC sont indépendants (Hatrongjit et al., 2020).

Il en va de même pour les CC27 et CC1832 récemment identifiés sur ce territoire (Wu et al., 2023). La surveillance des souches par l'identification des ST et leur regroupement en CC permet d'observer l'émergence de nouveaux ST sur un territoire donné.

iii. Infection et transmission de *S. suis*

Deux mammifères omnivores de la famille des suidés constituent le réservoir naturel de *S. suis* : *Sus scrofa* (le sanglier) et *Sus domesticus* (le porc) (Baums et al., 2007, Sánchez del Rey et al., 2014, Vötsch et al., 2018). Ceci n'est pas étonnant puisque le porc est issu de la domestication du sanglier et qu'il fût longtemps considéré comme une sous-espèce du sanglier (*Sus scrofa domesticus*) (Gentry A. et al., 2004). *S. suis* peut aussi infecter d'autres animaux tels que les lapins, les moutons, les chèvres, les vaches, les chiens, les chats, ou encore les oiseaux (Figure 9) (Segura, 2020).

Les fréquences de transmission de *S. suis* au sein des exploitations varient en fonction de l'âge des porcs mais également de la conduite des élevages (Gottschalk & Segura, 2019). Différents facteurs aggravants ont été identifiés tel que le sevrage ou le mélange de différentes portées. Ces facteurs ont une influence sur la fréquence et/ou l'intensité des contacts entre porcs et donc sur la transmission de *S. suis* (Dekker et al., 2013). Plusieurs facteurs prédisposants au déclenchement de la maladie ont été décrits : la surpopulation porcine, le manque de ventilation, les conditions climatiques extrêmes, de faibles conditions d'hygiène, la pollution de l'air avec un fort taux d'ammoniac ainsi que tout autre facteur induisant un stress chez l'animal (Figure 10) (Dee SA et al., 1993, Vötsch et al., 2018, Obradovic et al., 2021). La présence de maladies intercurrentes en élevage influence également la sensibilité des porcs à *S. suis* (Gottschalk & Segura, 2019). En effet, différentes études ont montré l'impact délétère pour l'hôte d'une infection induite par *S. suis* couplée à une infection induite par des virus respiratoires tel que le « Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus » ou PRRSV (Obradovic et al., 2021).

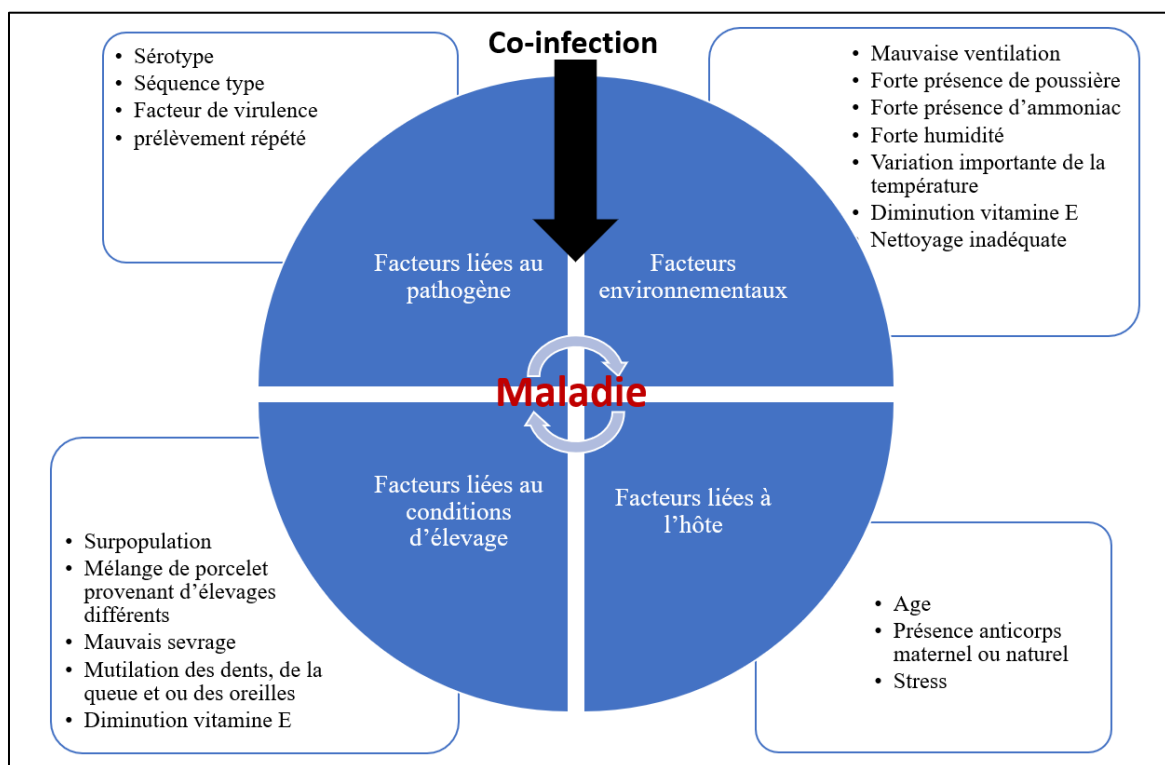


Figure 10 Facteurs prédisposants à l'apparition de signes cliniques suite à une infection par *S. suis*. D'après Obradovic et al., 2021.

Cloutier et ses collaborateurs ont mis en évidence la part non négligeable que représente l'Hôte dans le développement des symptômes : en plus de l'âge, l'indice de santé de l'animal,

notamment l'immunosuppression ou encore les facteurs génétiques joueraient un rôle (Cloutier et al., 2003, Postma et al., 2015, Obradovic et al., 2021). L'infection par *S. suis* et le développement de pathologies est donc multifactorielle.

Symptômes, diagnostic et traitement

Les symptômes liés à une infection par *S. suis* chez le porc ont largement été décrits dans la littérature au cours des 70-80 dernières années. Les manifestations cliniques induites sont principalement liées à une atteinte systémique (hyperthermie, apathie) et/ou neurologique (symptômes méningés) et/ou articulaire (boiteries, réticence au déplacement). Il a été estimé que le taux de mortalité pour les porcs infectés par ce pathogène à travers le monde était de 20% (Higgins R & Gottschalk M., 2006). D'autres maladies induisent les mêmes signes cliniques visibles, il est donc important de réaliser un diagnostic de laboratoire avec une culture bactérienne et des tests biochimiques tels que l'absence de croissance en gélose NaCl à 6,5 %, ou encore la présence d'une hémolyse alpha sur gélose au sang. L'identification des colonies suspectes par spectrométrie de masse (Maldi-Tof) s'est démocratisée ces dernières années dans les laboratoires de diagnostic. Le sérotypage avec un test d'agglutination ou un test PCR peut également être effectué comme décrit dans la partie Typage génomique et MLST des souches de *S. suis* précédemment page 10.

Une fois le diagnostic posé, les porcs malades sont traités principalement par des anti-inflammatoires et des antibiotiques (Higgins R & Gottschalk M., 2006). Une étude, réalisée en 2002 par l'AFSSA sur 110 souches françaises (isolats cliniques n=83, isolats non cliniques n=27) a montré que la totalité des souches était sensible aux β -lactamines (pénicilline, amoxicilline, et céftiofur). En revanche, l'étude a mis en évidence un taux de résistance élevé vis-à-vis de la tétracycline (79%), et de l'érythromycine (30%) (Marie et al., 2002). Peu d'études sur les souches de *S. suis* isolées en France sont disponibles, hormis les rapports annuels du réseau de l'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales « Résapath » (Anses, 2019). En 2019, le rapport fait état de 79% des souches de *S. suis* testées comme résistantes aux tétracyclines et que 67-71% sont résistantes aux macrolides-lincosamides. Il souligne la différence entre les taux de résistance à la tétracycline qui sont restés les mêmes en 17 ans alors que la résistance aux macrolides a elle doublé en 18 ans ; mais également que 0,5% des souches présentent une résistance à l'amoxicilline et 3% à l'oxacilline. A noter que les infections à *S. suis* sont traitées avec des β -lactamines (dont font partie les pénicillines).

Une alternative aux antibiotiques est la vaccination, celle-ci serait très rentable pour l'industrie porcine et intéressante en termes de santé animale et santé publique (Postma et al., 2015). Cependant, la vaccination contre *S. suis* doit faire face à d'importants défis. En effet, la variabilité génétique de la capsule de *S. suis* rend difficile le développement d'un vaccin universel. Les autovaccins (ou vaccins autogènes) sont souvent utilisés en élevage (Haas & Grenier, 2018, Segura, 2020). Le développement d'un autovaccin nécessite de récupérer les bactéries ayant infecté les animaux d'une ferme et de les utiliser sous forme inactivée pour vacciner les autres animaux de cette même ferme uniquement (Figure 11) (Tan et al., 2019). Les autovaccins sont employés pour prévenir les infections à *S. suis*, mais ne peuvent pas traiter une infection existante. Ils sont utilisés chez les porcelets ou les truies, même si peu de données sont disponibles quant à leur efficacité. Cependant, celle-ci semble d'autant meilleure que d'autres facteurs, tel que la biosécurité, sont maîtrisés. L'autovaccination présente deux contraintes majeures. La première est liée aux possibles effets secondaires du vaccin. Pour minimiser les risques, il est recommandé de tester l'autovaccin sur une fraction de porcs avant de vacciner l'ensemble du troupeau (Haesenbrouck et al., 2004). La deuxième contrainte est de s'assurer que la souche isolée et utilisée pour fabriquer l'autovaccin correspond bien à la souche pathogène présente dans l'élevage, et non à une souche commensale. En effet, si la souche utilisée n'est pas celle qui a induit la maladie, l'autovaccin pourrait se révéler potentiellement inefficace. Un guide retraçant les étapes des prélèvements en élevage a été rédigé par Ceva Biovac en collaboration avec Labofarm pour guider les professionnels dans leur démarche.

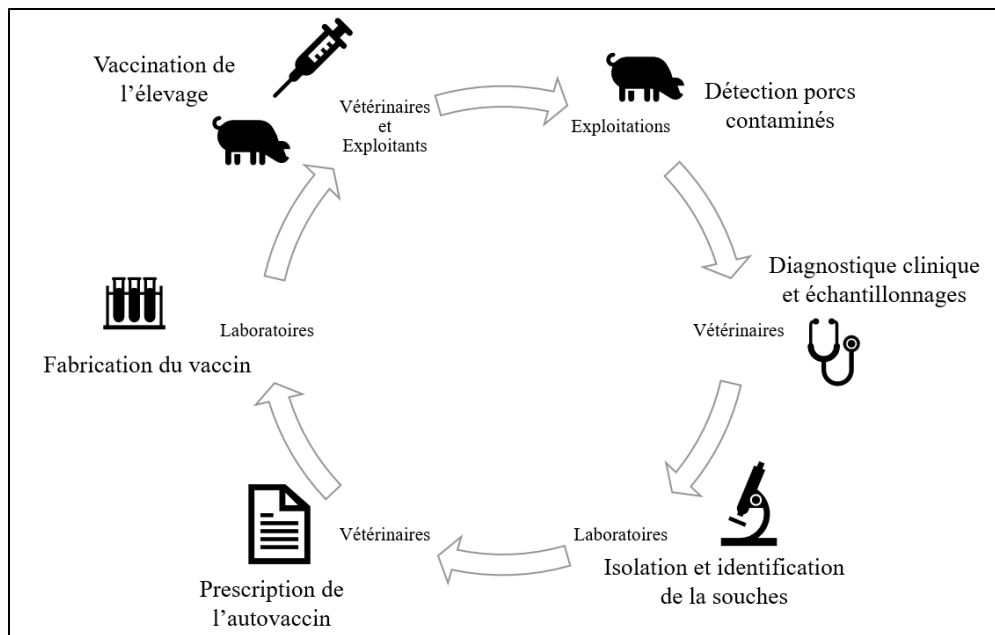


Figure 11 : Démarches pour l'administration d'un autovaccin (ou vaccin autogène). D'après une figure CEVA BIOVAC.

L'efficacité de ces autovaccins dépend de nombreux facteurs : la nature de la souche (sérotypage, ST), la concentration bactérienne, la méthode d'inactivation des bactéries et des adjuvants utilisés (Segura, 2020). L'efficacité réelle des autovaccins est donc encore débattue. Les recherches se concentrent maintenant sur l'identification de facteurs contribuant à la virulence de *S. suis* et sur l'analyse de leurs propriétés immunogènes dans le but de développer un vaccin universel capable de conférer une protection (universelle) contre *S. suis* (Haas & Grenier, 2018, Tan et al., 2019).

Idéalement, ces antigènes doivent être exprimés à la surface de tous les sérotypes virulents afin de stimuler le système immunitaire et être accessibles aux anticorps de l'hôte. Plusieurs facteurs de virulence tels que la MRP, la suilysine, le facteur extracellulaire ou encore l'antigène SAO (« Surface Antigen One ») ont été étudiés comme candidats potentiels pour le développement d'un vaccin (Jacobs et al., 1996, Wisselink et al., 2001, Y. Li et al., 2006, Y. Li et al., 2007, Du et al., 2013, Hsueh et al., 2017). Ces protéines sont présentes dans presque tous les sérotypes de *S. suis* et, malgré des tailles variables, elles restent conservées au sein de l'espèce. Des tests *in vivo* sont en cours pour tester l'efficacité de ces candidats aux vaccins chez le porc (Hsueh et al., 2017). On peut également citer, les vaccins à ARNm, pour lesquels l'activité contre les bactéries a été rapportée pour la première fois dans un modèle préclinique de souris infectées par des streptocoques de groupe A et B (Maruggi et al., 2017). Cette nouvelle

approche vaccinale pourrait explorer différents transcrits (ARNm) codant des protéines immunogènes bactériennes comme candidats potentiels pour l'élaboration d'un vaccin à ARNm (Maruggi et al., 2017, C. Zhang et al., 2019).

Une autre alternative aux antibiotiques pourrait être envisagée, la phagothérapie qui visent à utiliser des virus ou phages qui sont capables d'induire la lyse d'une bactérie cible de façon spécifique (Figure 12).

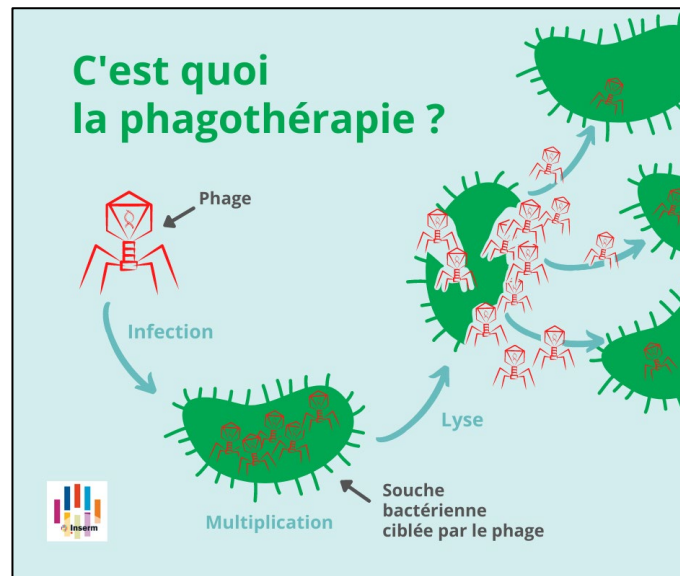


Figure 12 : Principe de la phagothérapie (iconographie Inserm).

Peu de bactériophages lytiques infectant *S. suis* sont connus. On peut tout de même citer le phage lytique SMP infectant des souches de *S. suis* sérotype 2 (Ma & Lu, 2008a), mais aussi les quatre bactériophages lytiques, SS1, SS2, SS3 et SS4 (Laddika et al., 2021). Le spectre d'efficacité le plus grand a été observé pour les phages SS1, SS2 et SS3 montrant une activité lytique contre les sérotypes 1/2, 2, 3, 7 et 9 de *S. suis*, tandis que le phage SS4 s'est avéré lytique uniquement contre les sérotypes 2 et 7. Ces bactériophages codent des lysines qui hydrolysent les liaisons peptidoglycanes de la paroi cellulaire bactérienne tuant ainsi les bactéries cibles plus vite qu'aucun agent non chimique connu (Gilmer et al., 2017). Des dérivés de bactériophages peuvent donc également être utilisés tels que la lysine PlySs2 ou encore Csl2 (Gilmer et al., 2017, Vázquez et al., 2017, X. X. Li et al., 2023). La compréhension des interactions hôte-bactériophage est essentielle pour leurs utilisations en tant qu'agents thérapeutiques spécifiques contre *S. suis*. Ces interactions comprennent tout d'abord la préservation des prophages dans les génomes des hôtes. Une étude de 2022 a montré

l'omniprésence de prophages (91,7%) dans les génomes de 133 souches de *S. suis* étudiées (Osei et al., 2022). Les bactéries hôtes peuvent se défendre contre ces bactériophages grâce à l'expression de systèmes de défense. Parmi ces systèmes, on peut citer les systèmes RM (Restriction-Modification). La majorité d'entre eux reposent sur une première étape de méthylation de l'ADN bactérien et une deuxième étape de restriction utilisant une activité endonucléase coupant les ADN non méthylés, ce qui permet une discrimination du soi et du non soi. Des systèmes RM sont présents dans 90,2% des génomes de *S. suis* étudiés (Hampton et al., 2020, Osei et al., 2022).

Enfin, d'autres études réalisées en laboratoires ont mis en évidence l'activité anti-*S. suis* de différentes huiles essentielles notamment celle réalisée à partir de clou de girofle et ayant comme principe actif l'eugénol (Wongsawan et al., 2019). L'extrait de rhubarbe aurait un effet inhibiteur sur la formation de biofilm de *S. suis* en monoculture, notamment grâce à son composé actif, l'antraquinone (Ding et al., 2017). L'huile essentielle de pivoine, contenant la paeoniflorine et l'albiflorine, a quant à elle un effet inhibiteur sur le niveau de transcription de *luxS*, ce qui entraîne des effets inhibiteurs sur le « quorum sensing » (système de communication utilisé par les bactéries dépendant de la densité cellulaire) et la formation de biofilm (Li et al., 2022). Ces études ont mis en évidence des molécules ayant une activité anti-*S. suis* et/ou anti-biofilm de *S. suis* mais d'autres études sont nécessaires afin d'étudier la faisabilité d'un tel traitement. Le développement de vaccins, la phagothérapie et ces nouvelles approches pourraient permettre de réduire l'utilisation d'antibiotiques dans les élevages (Postma et al., 2015, Collineau et al., 2017, Ducrot et al., 2022).

Perte économique

Lorsqu'un cas d'infection par *S. suis* est identifié dans un élevage, les porcs malades doivent être isolés, en partie pour leur propre bien mais aussi parce qu'ils diffusent de grandes quantités de bactéries virulentes dans leurs sécrétions nasales ou buccales. Les animaux reçoivent alors un traitement médicamenteux à base d'antibiotiques (β -lactamines) et restent isolés jusqu'à leur rétablissement (Higgins R & Gottschalk M., 2006). Les traitements et soins particuliers apportés aux porcs infectés par *S. suis* représentent un coût important pour les exploitations, estimé en moyenne à 0,60€/porc en Espagne, à 0,96€/porc au Pays-Bas et à 1,30€/porc en Allemagne (Neila-Ibáñez et al., 2021). Hélas, aucune estimation n'est disponible pour la France, à ma connaissance.

Lorsque l'isolement et la médication des animaux n'est pas/plus possible, leur mise à mort est alors nécessaire. Elle représente, là encore, un coût important dans la mesure où ces porcs sont impropres à la vente. De plus, l'éleveur doit éliminer les carcasses par équarrissage, filière spécialisée d'élimination des cadavres animaux qui a un coût puis, réaliser un nettoyage et une désinfection minutieuse des installations (Code du travail : articles R. 4421-1 à R. 4427-5 et D 4152-3). Toutes ces mesures sanitaires permettent de prévenir les contaminations mais représentent un coût économique élevé pour les exploitations porcines.

b. Chez l'Homme

Sources de contamination et facteurs de risque

Chez l'Homme, la contamination par *S. suis* peut se produire par contact direct avec le porc malade ou sa carcasse *via* des lésions cutanées généralement localisées sur les mains. Cette voie de transmission concerne surtout les personnes qui travaillent en contact avec des animaux malades ou leurs carcasses, notamment les éleveurs, le personnel des abattoirs ou encore les bouchers (Ho et al., 2011, Rayanakorn et al., 2018). L'origine de contamination peut également être l'ingestion de produits alimentaires contaminés. Pour des raisons culturelles, cette voie est plus répandue dans le sud-est de l'Asie que dans le reste du monde. En effet, la consommation de viande de porc crue ou insuffisamment cuite est courante dans cette région du globe. C'est notamment le cas au Vietnam où par exemple : le « tiet canh » et le « nem chua » (Figure 13) sont deux plats composés de sang ou de viande de porc crue fermentée (Pham Hai Vu & Marie-Vivien Delphine, 2017).



Figure 13: Deux plats vietnamiens utilisant du sang et/ou de la viande de porc crue

En mars 2021, un foyer épidémique, avec 19 cas confirmés de septicémie et de méningite ayant entraîné deux décès, a été rapportée dans la province de Nakhon Ratchasima, en Thaïlande (Brizuela et al., 2023). L'étude révèle que la source de contamination est liée à la

consommation d'un plat à base de porc crue lors d'une cérémonie bouddhiste. Historiquement en Asie et notamment en Chine, deux épidémies de *S. suis* ont eu lieu chez l'Homme (H. Yu et al., 2006). La première était localisée dans la province de Jiangsu en 1998, et elle a touché 25 personnes, parmi lesquelles 14 sont décédées. L'origine de contamination n'avait pas été mise en évidence au cours de cette première épidémie. La deuxième épidémie est survenue dans la province du Sichuan en 2005 : 204 personnes ont été contaminées dont 38 sont décédées. L'origine de contamination a été identifiée : une exposition à des carcasses de porcs contaminés. Le gouvernement chinois a alors mis en place des moyens de prévention et de contrôle. Depuis, la prévalence des infections à *S. suis* chez l'Homme a diminué dans les différentes provinces de Chine (Liu et al., 2023). En France, les cas d'infection chez l'Homme sont rares moins d'un cas par an et ils sont souvent liés à la manipulation de carcasses de sanglier contaminées (Bensaid et al., 2003).

Il est à remarquer que l'infection de *S. suis* chez l'Homme est majoritairement décrite chez des individus en bonne santé. Toutefois, l'âge, l'hygiène de vie et la condition physique (immunosuppression) ont été décrits comme étant des facteurs de risque pouvant accroître la sensibilité des personnes à l'infection par *S. suis* (Arends & Zanen, 1988, Ma & Lu, 2008). Il est à noter que Kerdsin et ses collaborateurs ont rapporté un cas d'infection par *S. suis* chez une enfant de deux ans, sans qu'il n'y ait eu *a priori* de contact avec des suidés (porcs ou sanglier) (Kerdsin et al., 2016). Étant donné le jeune âge de la patiente et le fait qu'elle soit décédée peu de temps après son admission en milieu hospitalier, la voie de contamination s'avère sujette à hypothèses. L'enfant a peut-être mis à la bouche un morceau de viande sans que les adultes qui cuisinaient ne l'aient vue. Il est également envisageable qu'elle soit entrée en contact avec un autre animal, non-suidé, porteur de cette bactérie pathogène.

Selon l'INRS, la période médiane d'incubation de cette bactérie pathogène est estimée à deux jours. Les symptômes courants d'une infection par *S. suis* sont la fièvre, des maux de tête, des frissons et des arthralgies. Le tableau clinique régulièrement décrit est celui de la méningite fébrile et de la septicémie avec quelques fois un syndrome de type choc toxique streptococcique (Arends & Zanen, 1988, J. Tang et al., 2006, Nghia et al., 2008, Kerdsin et al., 2011, 2016, Callejo et al., 2014, Gustavsson & Ramussen, 2014, Taniyama et al., 2016, Segura et al., 2016, Vötsch et al., 2018, Hatrongjit et al., 2020). Cependant, d'autres formes cliniques existent. Ainsi, des cas de pneumonie, d'endocardites ou encore de péritonites ont été décrits. À savoir qu'au niveau mondial, le taux de mortalité est de 12,8% (Huong et al., 2014). Par

ailleurs, des phénomènes de surdités séquellaires sont fréquemment constatés chez les survivants de méningites. Cela étant, le diagnostic d'une infection par *S. suis* est d'abord basé sur l'observation des symptômes. Si le médecin soupçonne une méningite, le patient sera traité avec des antibiotiques. Le traitement sera ensuite complété/réajusté par les résultats des analyses microbiologiques avec notamment les résultats des antibiogrammes. L'isolement de la bactérie après mise en culture de prélèvements biologiques (sang, liquide céphalo-rachidien) est un prérequis pour pouvoir traiter efficacement l'infection (Prescott et al., 2013).

Impact socio-économique

L'impact socio-économique des infections à *S. suis* chez l'Homme est multifactoriel. Les premières victimes en sont les individus contaminés qui se retrouvent dans l'incapacité de produire un travail rémunéré. Par corollaire, ceci peut fortement impacter leur sphère familiale. Ce phénomène est d'autant plus vrai s'ils sont issus de foyers modestes. Le coût d'une telle infection pour l'individu et la collectivité n'a pas été étudié en France. La France possède une culture et un système de santé qui lui est propre ainsi la comparaison du coût socio-économique d'une telle infection avec d'autres pays est hasardeuse et ne sera pas développé ici.

iv. Pathogenèse de *S. suis* et facteurs de virulence

Les différents facteurs de virulence dont dispose cette bactérie pour coloniser son hôte et échapper à son système immunitaire et les étapes de la pathogenèse, c'est-à-dire le processus d'infection induit par la colonisation de *S. suis*, sont décrits ci-dessous.

a. *Les facteurs de virulence de S. suis*

S. suis est une bactérie commensale, c'est-à-dire qu'elle peut être présente chez les porcs sans forcément engendrer une réponse du système immunitaire de l'hôte (Segura et al., 2016). Certaines souches dites « opportunistes » peuvent être retrouvées au niveau de l'appareil respiratoire inférieur (poumons). D'autres souches sont capables de franchir la barrière épithéliale pour provoquer des infections. L'expression de divers facteurs de virulences va être nécessaire au cours des différentes étapes de l'infection. Ces facteurs localisés au niveau de la paroi cellulaire de la bactérie ou sécrétés vont permettre à *S. suis* de s'adapter rapidement à son environnement (Figure 14). La présence du microorganisme pathogène et l'expression de ses facteurs de virulence vont entraîner toute une cascade de signalisation aboutissant à une réponse immunitaire chez l'hôte.

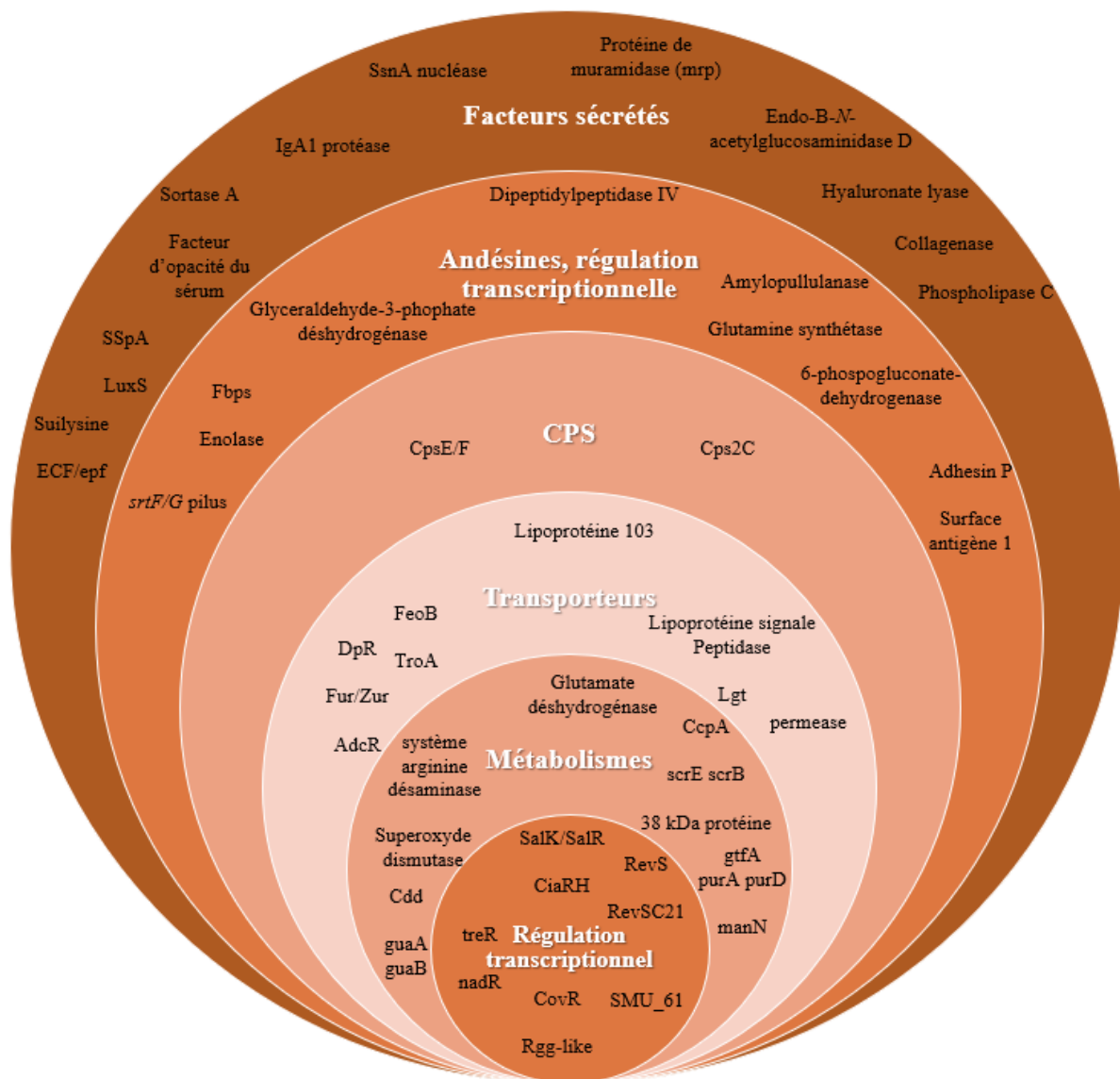


Figure 14 : Facteurs associés à la virulence de *S. suis*.

Néanmoins, tous les facteurs présentés ci-dessus ne sont pas forcément exprimés chez une souche pathogène et la désignation de certains en tant que facteurs de virulence fait débat dans la communauté scientifique. Nous emploierons donc plutôt le terme de « facteurs associés à la virulence ». Un consensus existe pour les facteurs de virulence MRP (« muramidase-released protein »), EPF (« extracellular protein factor ») et SLY (suilysine) qui sont couramment utilisés pour le pathotypage des souches. La présence des marqueurs *mrp* et *epf* a été décrite chez les souches pathogènes dès 1991 par Vecht et col., le phénotype *mrp*⁺ *epf*⁺ induisant une réponse du système immunitaire chez l'hôte (Vecht et al., 1991). L'étude de ces

deux facteurs de virulence a permis en 1996 de concevoir la virulence des souches de *S. suis* comme multifactorielle c'est-à-dire que plusieurs facteurs (certains étant interchangeables) sont impliqués dans la virulence des souches et qu'aucun facteur de virulence n'est indispensable (H. E. Smith et al., 1996). L'identification de la suilysine chez *S. suis* est concomitante à l'identification de la Mrp et de l'EpF (Jacobs et al., 1994). Néanmoins, dès les années 2000 après l'étude de souches isolées au Canada et en France, des disparités dans les profils de virulence des souches sont constatées en fonction de l'origine géographique des souches. En effet, la majorité des souches pathogènes au Canada présentent un profil MRP- et EPF- (72% des souches pathogènes publiées en 1998) et seulement une souche (sur les 98 testées) produit de la suilysine (Gottschalk et al., 1998). Pour les souches françaises, 46% des souches pathogènes de sérotype 2 présentent un profil MRP+ EPF- SLY- (Berthelot-Hérault et al., 2000). Depuis, d'autres marqueurs de virulence ont été proposés allant jusqu'à plus d'une centaine décrits dans la littérature (Segura et al., 2017).

b. Entrée dans l'organisme hôte

La première étape est la contamination des porcs qui peut avoir lieu par blessures transcutanées ou *via* la sphère oro-pharyngée (Segura et al., 2016). La souche est qualifiée de pathogène dès lors qu'elle franchit la barrière épithéliale de l'hôte (Fittipaldi et al., 2012). Cette dernière constitue une entrave mécanique à l'accès aux tissus de l'hôte sans solliciter pour autant les acteurs du système immunitaire spécifique (Fittipaldi et al., 2012, Segura et al., 2016).

c. Adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte

La deuxième étape du processus infectieux consiste en l'adhésion aux cellules épithéliales et en leur invasion. Au niveau de la sphère oro-pharyngée, se trouve le tissu lymphoïde amygdalien. Celui-ci est recouvert d'un épithélium muqueux présentant des invaginations profondes formant de nombreuses cryptes ramifiées. Il semblerait que ces dernières soient le principal point d'entrée de *S. suis* dans l'organisme (Fittipaldi et al., 2012, Segura et al., 2016). Pour pouvoir envahir le tissu épithélial, il a été démontré que *S. suis* utilise différents mécanismes. La sécrétion d'adhésines au niveau de sa surface permet la fixation de *S. suis* aux cellules épithéliales (Figure 15). Ces adhésines sont multiples : l'énolase, Fbps (« fibronectin-fibrinogen binding proteins »), l'adhésine P ou encore la glutamine synthétase (GS) (de Greeff et al., 2002, Jobin et al., 2004, Brassard et al., 2004, Wang Kaicheng & Lu

Chengping, 2007, Tan et al., 2007, Esgleas et al., 2008, Ge et al., 2009, Ferrando et al., 2010). Leur diversité, couplé au fait que ces adhésines présentent d'autres fonctions au sein de la cellule (« moon lighting proteins »), explique la difficulté pour la communauté scientifique d'identifier les protéines essentielles à la pathogenèse de *S. suis*.

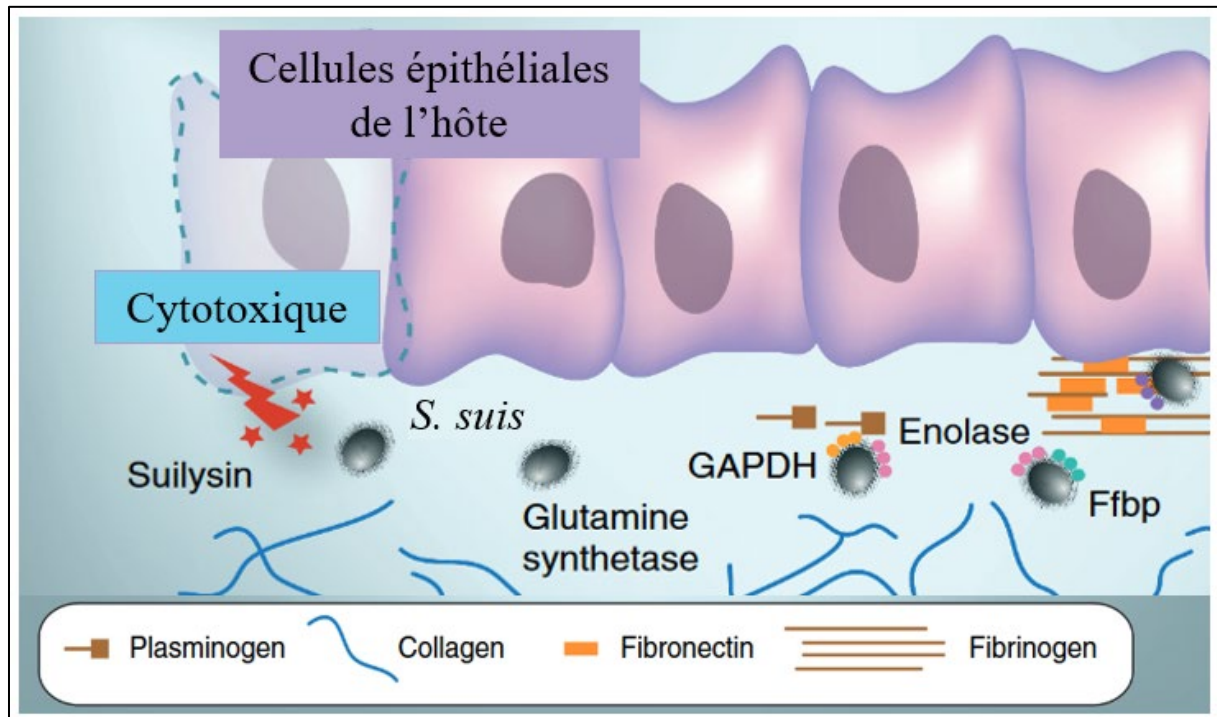


Figure 15 : Interactions de *S. suis* avec les cellules épithéliales et les protéines de la matrice extracellulaire. D'après Fittipaldi et al., 2012.

d. Invasion des cellules épithéliales

Une fois la bactérie *S. suis* fixée aux cellules épithéliales, elle va pouvoir mettre en place des systèmes de production de molécules cytotoxiques afin d'envahir le tissu auquel elle a adhéré. Une des molécules les plus connues est la suilysine (Figure 15) (Fittipaldi et al., 2012). Cette enzyme est sécrétée dans le milieu extracellulaire et a pour propriété de détruire les jonctions cellulaires. Ceci permet le passage de *S. suis* dans la circulation sanguine et ainsi sa dissémination dans l'organisme. La surexpression du gène *sly* codant la suilysine induit la lyse des érythrocytes et la libération d'hémoglobine (Arenas et al., 2019). Cette libération d'hémoglobine induit une production de molécules pro-inflammatoires par les macrophages.

e. *Echappement au système immunitaire*

Afin de lutter contre l'invasion d'agents pathogènes, le système immunitaire produit généralement une plus forte quantité d'immunoglobulines A (IgA) au niveau des muqueuses. Cependant, il a été établi que *S. suis* était capable de synthétiser une protéase codée par le gène *iga* dont le rôle est de cliver les IgA de l'hôte (A. Zhang et al., 2011). De cette manière, la bactérie esquivait la première attaque du système immunitaire.

La phagocytose est principalement réalisée par les macrophages présents dans la circulation sanguine dont le rôle est de détecter les cellules du non-soi pour les éliminer. Les anticorps et molécules du complément vont se fixer sur les corps étrangers et ainsi permettre leur reconnaissance, la phagocytose et la lyse des cellules du non-soi par les macrophages. Les souches de *S. suis* produisant des CPS sont capables d'échapper à la phagocytose (figure 6). Il a été également démontré que les gènes *codY* et *ciaR* sont impliqués dans la résistance à la phagocytose et dans l'échappement au système immunitaire (J. Li et al., 2011, Feng et al., 2016). *CodY* est impliqué dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes associés à la virulence (en particulier la production d'acide sialique dans la capsule). Le système à deux composants *CiaRH* est, quant à lui, impliqué dans la régulation de l'expression de gènes suite à des stress environnementaux (J. Li et al., 2011).

La composition de la chaîne polysaccharidique du CPS et la présence de résidus d'acide sialique au niveau de la partie terminale du CPS ont un impact sur la fixation des molécules du complément sur la bactérie (H. E. Smith et al., 1999). *S. suis* encapsulé n'est alors pas reconnu par les macrophages/neutrophiles (Bleuzé et al., 2021). Comme les macrophages, les neutrophiles sont également des acteurs importants de la réponse immunitaire. Plusieurs études ont mis en évidence la grande variété de facteurs produits par *S. suis* pour échapper à l'action des neutrophiles (Bleuzé et al., 2021).

f. *Infection locale ou systémique*

Enfin, la cinquième étape de la pathogenèse consiste en l'infection locale ou systémique. En effet, diverses pathologies peuvent résulter de l'infection par *S. suis* en fonction de la localisation de la bactérie dans l'organisme. Comme indiqué précédemment, cet agent pathogène peut être responsable de diverses pathologies telles que des méningites, septicémies, arthrites, endocardites et autres polysérites. Ces différentes affections ont toutes en commun de

déclencher une forte production d'interleukines, de chimiokines ainsi que d'autres médiateurs de l'inflammation (Fittipaldi et al., 2012). Il faut préciser que cela constitue une réponse de l'hôte à la reconnaissance de différents facteurs de virulence de l'agent pathogène.

Des études transcriptomiques ont mis en évidence l'expression de différents facteurs de virulence en fonction de l'organe infecté. On peut citer la surexpression de la protéine SpxA1 pour les souches isolées dans le cerveau (Arenas et al., 2019). Cette protéine joue un rôle dans des cascades de régulation impliquées dans la réponse au stress oxydatif (C. Zheng et al., 2014). Les auteurs ont également observé la surexpression des régulateurs CodY, CiaR et CovRS chez les souches isolées à partir du sang et du cerveau (Arenas et al., 2019).

g. Production de bactériocines

S. suis est capable de sécréter des peptides de petite taille ayant un effet antibactérien. Ces molécules sont appelées bactériocines. Elles ne sont pas actives contre la souche productrice (Sun et al., 2019).

L'analyse de 214 génomes de *S. suis* canadiens a démontré la présence de clusters de synthèse de trois bactériocines dans les souches, la suicine 65, la suicine 90-1330 et la suicine 3908 (Libante et al., 2019). Ces trois lantibiotiques (petits peptides appartenant au groupe des bactériocines) avaient déjà été caractérisés dans une partie de ces génomes de *S. suis* canadiens avec une répartition hétérogène (large présence de la suicine 65 dans les génomes étudiés [n=48/51]) (Athey Taryn B T et al., 2016). Le mode de production de ces trois lantibiotiques diffère. La suicine 65 est produite sur milieu solide, indiquant un possible lien avec le « quorum sensing » alors que la suicine 90-1330 et la suicine 3908 sont, elles, produites en milieu liquide (Vaillancourt et al., 2015).

D'autres bactériocines sont également retrouvées dans des souches de *S. suis* isolées en Asie, la souche WUSS351 a été décrite l'année dernière comme productrice de lactococcine Lcn351 en plus de la lantibiotique suicine 3908 (Z. Liang et al., 2022). La suicine 3908 induit la perméabilisation membranaire de la bactérie cible (*S. suis* ou une autre bactérie de la même niche écologique) et la lactococcine Lcn351 inhibe la croissance de bactéries telles que *Bacillus subtilis* et *S. suis*. De plus, Lcn351 altère la composition du microbiote amygdalien du porc et réduit l'abondance relative des souches de *S. suis* (Z. Liang et al., 2022). Les auteurs supposent que les souches de *S. suis* sont la principale cible de cette bactériocine. Une autre souche de

S. suis (MGGUS3) produit deux suïcines : la suïcine 90-1330 et la suïcine 3908 qui montrent toute les deux une activité contre *S. suis* (Vaillancourt et al., 2015).

Cette production de bactériocines permet à *S. suis* de coloniser plus facilement de nouvelles niches écologiques en lysant les autres micro-organismes présents dans son environnement ou limitant leur croissance (Z. Liang et al., 2022). Les lantibiotiques suïcine 65, suïcine 90-1330 et suïcine 3908 montrent tous une activité anti-*S. suis* permettant d'envisager une alternative aux traitements antibiotiques.

II. Antibiotiques et mécanismes de résistance

Afin de pouvoir lutter contre ce pathogène et traiter les individus (animaux ou humains) souffrant d'une infection par *S. suis*, le traitement aux antibiotiques est la thérapeutique privilégiée. Différents antibiotiques peuvent être utilisés.

i. Utilisation et réglementation des antibiotiques

L'utilisation vétérinaire des antibiotiques est soumise à une autorisation de mise sur le marché et doit être indiquée dans la fiche "Summary of product characteristics" (SPC). Ce document décrit les propriétés et les conditions d'utilisation officiellement approuvées d'un médicament. Des contrôles de la distribution, la prescription et l'utilisation en médecine vétérinaire sont opérés en accord avec les lois européennes (JO L 4 du 7.1.2019, p. 43–167) et des sanctions pénales peuvent être prononcées en cas de manquement à ces lois.

En 2000, l'Union Européenne a initié une approche "One Health" (Figure 16). Ce concept part du postulat qu'il y a une interconnexion entre la santé humaine, la santé animale et plus généralement la santé environnementale. Pour ce faire, quatre grands principes sont mis en avant : la bonne indication, la bonne molécule, le bon dosage et enfin et surtout une juste durée du traitement promu par l'HAS (la Haute Autorité de Santé). Une démarche similaire a été lancée au niveau mondial sous l'égide de l'OMS (Organisation mondiale de la santé), l'OIE (Office International des Épizooties) et la FAO (« Food and Agriculture Organization ») (*Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*, 2015).



Figure 16 : Concept de « One Health », iconographie issue du site de l'OMS.

La France contrôle depuis 1999 le volume total des ventes d'antibiotiques enregistrées sur son territoire en tonnages d'antibiotiques vendus par an (Figure 17). La valeur enregistrée en 1999 s'est élevée à un total de 1311 tonnes d'antibiotiques vendus et est devenue la valeur de référence (Anses-anmv & Chauvin, 2020).

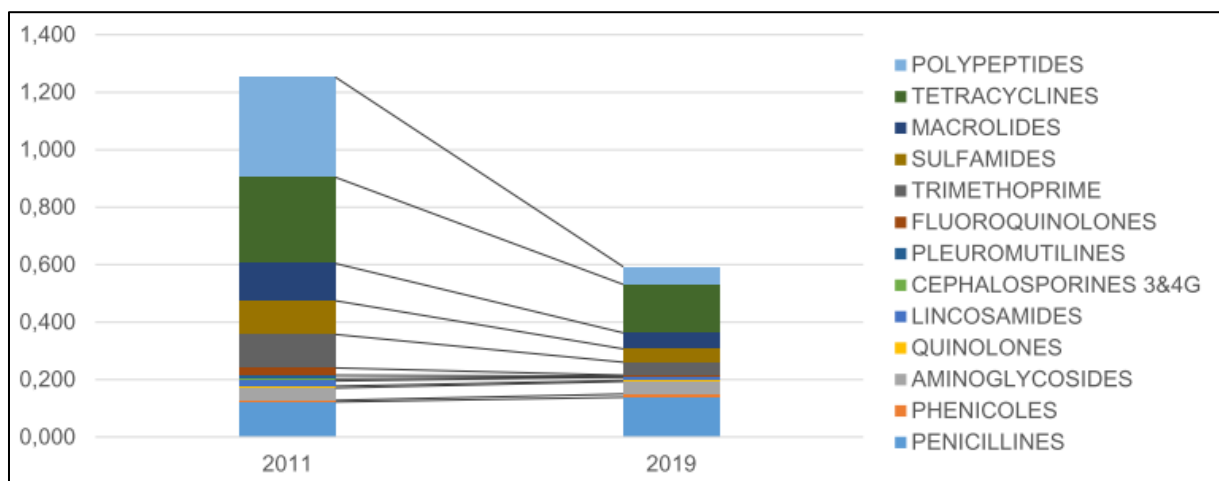


Figure 17 : Comparaison des niveaux d'exposition des porcs aux différentes familles d'antibiotiques en 2011 et en 2019. (Anses-anmv & Chauvin, 2020)

La France a mis en place en 2012-2017 le premier plan «EcoAntibio» qui avait comme objectif de réduire de plus de 25% l'utilisation d'antibiotiques vétérinaires en 5 ans (ministère

de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt, 2016). Ce premier plan a été un succès avec la réduction de 37% de l'utilisation des antibiotiques en France. Un second plan "EcoAntibio2" a été lancé sur les années 2017-2022, visant cette fois-ci à réduire de façon substantielle l'exposition des animaux aux antibiotiques. En 2019, le volume total des ventes d'antibiotiques sur le territoire était de 422 tonnes. Ce tonnage est le plus faible enregistré depuis le début du contrôle. Le contrôle du tonnage des ventes a également permis d'observer une réduction de 53,3% du tonnage vendu en France entre 2011 (date de référence pour le premier plan "EcoAntibio") et 2019 (Anses-anmv & Chauvin, 2020). Le volume des ventes d'antibiotiques entre 2020 et 2021 est toujours en baisse (-10,7%) avec chez le porc une baisse d'exposition des animaux aux antibiotiques de -7,2% entre 2020 et 2021(Anses, 2022).

Au début de l'année 2016, le conseil d'Etat a commencé à légiférer sur l'utilisation des antibiotiques « critiques » (appellation réservée aux antibiotiques ne possédant pas d'alternatives thérapeutiques) en médecine vétérinaire avec un décret datant du 1er avril visant à interdire leurs prescriptions pour des traitements prophylactiques (préventifs) et l'obligation d'un examen clinique avant leurs prescriptions à des fins curatives ou métaphylactiques (traitements préventifs d'un lot d'animaux en contact avec un animal malade) (JORF n°0066 du 18 mars 2016). Parallèlement en mars de la même année, deux arrêtés sont publiés visant à limiter voire interdire l'utilisation de certains antibiotiques « critiques » en médecine vétérinaire afin de conserver ces molécules pour la médecine humaine. Ces documents ont été mis à jour un an plus tard en décembre 2018 (JORF n°0298 du 22 décembre 2017).

L'OMS (Organisation mondiale de la santé) a publié une première fois en 2005 la liste CIA concernant les Antibiotiques d'Importance Critique pour la médecine humaine. Ces antibiotiques sont classés selon deux critères, (1) leur niveau d'« importance » avec trois niveaux, « Importants », « Importance haute », « Importance critique » et (2) leur niveau de priorité avec deux classes « priorité majeure » et « haute priorité ». Ces hiérarchisations prennent en compte la présence de résistances à ces molécules, la transmission de cette résistance, la rareté de la molécule (peu/pas d'alternatif thérapeutique) et son importance dans les traitements de dernier recours. Cette liste a fait place depuis 2017 à la classification AWaRe qui distingue trois catégories d'antibiotiques « Access, Watch and Reserve ». En France, la liste des antibiotiques critiques est définie par la Société Française d'Infectiologie en cohérence avec la classification AWaRe (Comité des référentiels de la SPILF, 2022).

En parallèle des recommandations de l’OMS, l’OIE (renommé récemment OMSA pour Organisation mondiale de la santé animale) a également publié une liste d’agents antimicrobiens importants en médecine vétérinaire (Résolution n°XXVIII) mis à jour en 2021 (OIE, 2020). Cette liste vise à guider les vétérinaires dans le choix des antibiotiques à utiliser ou dont il faut limiter l’usage. Là encore, les familles d’antibiotiques ont été classées selon la rareté de la molécule et son importance dans les traitements de dernier recours. Cette classification crée ainsi trois catégories, les « Agents antimicrobiens d’importance critique en médecine vétérinaire (AICV) », les « Agents antimicrobiens très importants en médecine vétérinaire (ATIV) » et enfin, les « Agents antimicrobiens importants en médecine vétérinaire » (AIV).

Ces deux listes (AWaRe et Résolution n°XXVIII) permettent une prescription plus simple et éclairée des antibiotiques en rappelant les enjeux d’une surconsommation et ses conséquences sur la sélection de résistances pour certaines familles d’antibiotiques.

Les ventes d’antibiotiques pour les filières porcines sont en baisse depuis 1999 et sont proches de 133 tonnes pour l’année 2020 (Anses, 2021; Delphine Urban et al., 2020). En 2022, la mise en application du règlement européen (Règlement (UE) 2019/4) visant à interdire l’usage préventif d’aliments médicamenteux renfermant des antimicrobiens a permis une baisse de la vente d’antibiotiques pour les élevages. Dans le dossier de presse de l’Anses de novembre 2023, il est rapporté que l’évolution de l’exposition des porcs aux antibiotiques entre 2021 et 2022 a diminué de 21 % et que cette baisse était vraisemblablement à relier à la mise en application de cet arrêté.

Les antibiotiques les plus souvent utilisés chez le porc sont les tétracyclines qui sont principalement prescrites contre les diarrhées observées au moment du sevrage de l’animal (l’Union européenne, 2015, Zeineldin et al., 2019).

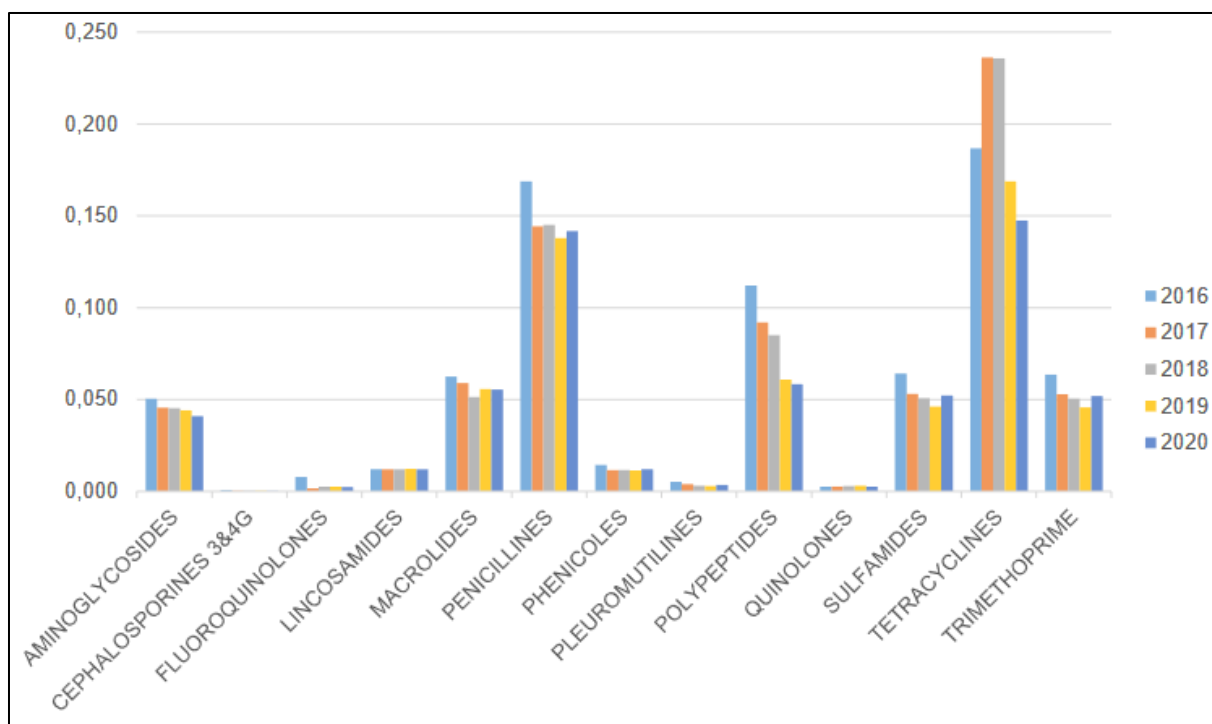


Figure 18 : Évolution de l'exposition des porcs à différentes familles d'antibiotiques en France depuis 2016. L'axe y est exprimé en indicateur AELA « Animal level of exposure to antimicrobials » correspondant au rapport entre le poids vif traité estimé et la biomasse de la population animale en France (Anses, 2021).

Le « Niveau d'exposition des animaux aux antimicrobiens » évalué par l'Anses en 2018, indique que les antibiotiques les plus fréquemment utilisés dans les industries porcines sont les tétracyclines, les pénicillines, les polypeptides, les macrolides, les sulfamides et le triméthoprime (Figure 18). Les tétracyclines, les pénicillines, les macrolides, les sulfamides et le triméthoprime sont généralement utilisés contre les infections respiratoires, les polypeptides et les tétracyclines contre les septicémies et les infections digestives. Seules les pénicillines sont indiquées pour traiter les infections à *S. suis*.

ii. Mode action des antibiotiques utilisés contre *S. suis*

Différentes molécules antibiotiques sont utilisées dans les élevages porcins en France mais aussi à travers le monde. Afin de mieux comprendre pourquoi ces molécules sont utilisées leurs modes de fonctionnement et d'action vont être présentés (Figure 19) et détaillés dans le texte (Uruén et al., 2022).

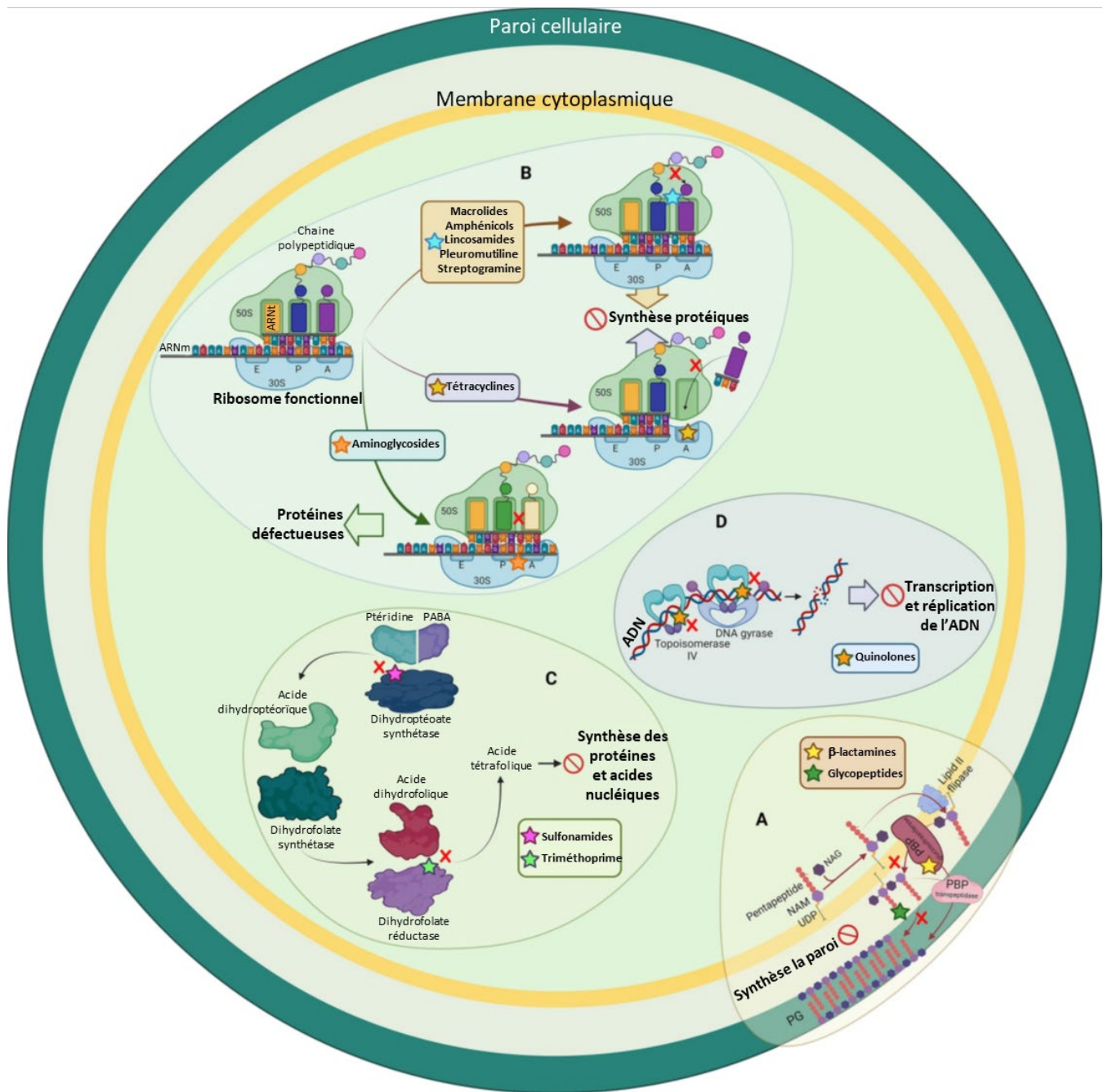


Figure 19 : Mode d'action des antibiotiques pour traiter les infections à *S. suis*. En fonction de leur cible, les antibiotiques peuvent être classifiés comme A inhibiteur de la synthèse du peptidoglycane (PG) composant la paroi cellulaire en bloquant les protéines de liaison aux pénicillines (PBP) (β -lactamines) ou la fixation à la chaîne peptidique D-Ala-D-Ala du précurseur du PG, lipid II (glycopeptide), B inhibiteur des ribosomes en se fixant aux sous-unités 50S (macrolides, amphénicols, lincosamides et pleuromutilines) ou 30S (tétracyclines et aminoglycosides), C inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique (sulfonamides et triméthoprime) et D inhibiteurs de la transcription et de la réplication de l'ADN en interférant avec l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (quinolones). Abréviations : PABA, acide para-aminobenzoïque ; ptéridine, 7,8-dihydro-6-hydroxyméthylpterin-pyrophosphate ; UDP, uridine diphosphate. D'après Uruén et al., 2022.

a. Inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne

Beta-lactamines

La cible des inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne sont les enzymes responsables de la transpeptidation des acides aminés composant la paroi cellulaire. C'est le cas des β -lactamines, pénicillines, carbapénèmes et céphalosporines (Dessen et al., 2001). La pénicilline va se fixer aux « Penicillin Binding Protein (PBP) ». Les enzymes responsables de la synthèse du peptidoglycane ne pouvant se fixer aux PLP, la synthèse de peptidoglycane est donc arrêtée (Dessen et al., 2001). La présence de chaînes incomplètes au niveau du peptidoglycane induit la lyse de la cellule bactérienne.

Glycopeptides

Les glycopeptides vont se lier à un intermédiaire de la synthèse du peptidoglycane en se fixant sur les extrémités peptidyl-D-Ala-D-Ala des précurseurs lipopeptidiques lorsqu'ils émergent de la membrane cytoplasmique (Dessen et al., 2001). Cette fixation inhibe la transglycosylation et la transpeptidation induisant donc des défauts dans la synthèse du peptidoglycane puis la lyse cellulaire.

Peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (antimicrobial peptides ou AMPs) sont quant à eux capables de se fixer à la paroi cellulaire de la bactérie et créer des « trous » entraînant une perméabilisation de la membrane bactérienne puis sa lyse. (Teixeira et al., 2012, Epanand et al., 2016). Certains polypeptides, tel que la bacitracine, sont capables d'inhiber le transfert des précurseurs de la paroi cellulaire.

b. Inhibiteurs de la synthèse protéique

Les inhibiteurs de la synthèse protéique (macrolides, phénicolés, tétracyclines, aminosides, pleuromutilines) se lient aux ribosomes, ou à l'ARNm ou à l'ARNt et inhibent l'allongement de la chaîne peptidique. Cette inhibition stoppe le processus de traduction. Par exemple, l'érythromycine se lie à la sous-unité 50S du ribosome et bloque la sortie du polypeptide (Dessen et al., 2001). De par sa structure et son cycle céto-éthanol, la tétracycline va se lier au complexe ARNm/ribosome et bloquer le complexe.

c. *Inhibiteurs de voies métaboliques*

Cette catégorie inhibe la synthèse de composés essentiels pour le métabolisme cellulaire et induit ainsi un arrêt de la prolifération bactérienne. C'est le cas des sulfamides et du triméthoprime qui vont inhiber la voie de synthèse des folates. Le sulfaméthoxazole bloque la synthèse de dihydroptéroate et le triméthoprime bloque la dihydrofolate réductase. Ces deux composés utilisés ensemble, inhibent ainsi la production de tétrahydrofolate, composé essentiel à la production de thymidine, une pyrimidine désoxynucléotide composant l'ADN.

d. *Inhibiteurs de la synthèse nucléique*

Les inhibiteurs de synthèse d'acides nucléiques (quinolones/fluoroquinolones par exemple) inhibent la topoisomérase ou l'ADN gyrase, inhibant la réplication de l'ADN et sa transcription (Dessen et al., 2001).

iii. Prévalence de la résistance et mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *S. suis*

Trois types de mécanismes de résistance peuvent être distingués : (1) modification ou dégradation de l'antibiotique, (2) efflux et (3) protection ou modification de la cible de l'antibiotique. Une synthèse bibliographique a été réalisée lors de ma première année de thèse et publiée dans la revue *Microorganisms* (Dechêne-Tempier et al., 2021). Elle portait sur 1) la prévalence de la résistance aux antibiotiques chez *S. suis*, 2) les mécanismes de résistance décrits chez *S. suis*, 3) les gènes de résistance associés et 4) la résistance aux antibiotiques conférée par les biofilms.

iv. Revue "Update on the Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Mobile Resistome in the Emerging Zoonotic Pathogen *Streptococcus suis*"

Une version actualisée (donnée bibliographiques août 2023) de la figure 1 est présentée à la suite de cette revue.

Erratum : présence d'erreurs sur la figure 1 de la revue. Les protéines ABC-F ne sont pas des transporteurs mais des RPP : « Ribosome Protection Proteins ». Plusieurs gènes ne sont pas à la bonne place sur le schéma : *lsa(E)*, *lnu(B)*, *lnu(C)* et *optr(A)*.

La Table S1 est reproduite en Annexe 1.



Review

Update on the Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Mobile Resistome in the Emerging Zoonotic Pathogen *Streptococcus suis*

Manon Dechêne-Tempier ^{1,2}, Corinne Marois-Créhan ¹, Virginie Libante ², Eric Jouy ¹,
Nathalie Leblond-Bourget ² and Sophie Payot ^{2,*}

¹ Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzane-Niort, Unité Mycoplasmatologie, Bactériologie et Antibiorésistance, F-22440 Ploufragan, France; manon.dechene-tempier@univ-lorraine.fr (M.D.-T.); Corinne.MAROIS@anses.fr (C.M.-C.); eric.jouy@anses.fr (E.J.)

² Université de Lorraine, INRAE, DynAMic, F-54000 Nancy, France; virginie.libante@univ-lorraine.fr (V.L.); nathalie.leblond@univ-lorraine.fr (N.L.-B.)

* Correspondence: sophie.payot-lacroix@inrae.fr

Abstract: *Streptococcus suis* is a zoonotic pathogen causing important economic losses in swine production. The most commonly used antibiotics in swine industry are tetracyclines, beta-lactams, and macrolides. Resistance to these antibiotics has already been observed worldwide (reaching high rates for macrolides and tetracyclines) as well as resistance to aminoglycosides, fluoroquinolones, amphenicols, and glycopeptides. Most of the resistance mechanisms are encoded by antibiotic resistance genes, and a large part are carried by mobile genetic elements (MGEs) that can be transferred through horizontal gene transfer. This review provides an update of the resistance genes, their combination in multidrug isolates, and their localization on MGEs in *S. suis*. It also includes an overview of the contribution of biofilm to antimicrobial resistance in this bacterial species. The identification of resistance genes and study of their localization in *S. suis* as well as the environmental factors that can modulate their dissemination appear essential in order to decipher the role of this bacterium as a reservoir of antibiotic genes for other species.

Keywords: *Streptococcus suis*; antibiotic resistance; mechanisms; resistance genes; horizontal gene transfer; competence; conjugation; mobile genetic elements; ICEs; IMEs; GIs; UCSs; prophages; plasmids; biofilm



Citation: Dechêne-Tempier, M.; Marois-Créhan, C.; Libante, V.; Jouy, E.; Leblond-Bourget, N.; Payot, S. Update on the Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Mobile Resistome in the Emerging Zoonotic Pathogen *Streptococcus suis*. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1765. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081765>

Academic Editor: Carlo Pazzani

Received: 12 July 2021

Accepted: 12 August 2021

Published: 18 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Streptococcus suis is a bacterial pathogen causing important economic losses in swine production. *S. suis* colonizes the upper respiratory tract of piglets, in particular the pharyngeal and palatine tonsils, during or soon after pig birth. These early colonization events may lead to an asymptomatic carriage but are also considered the first step for the development of an invasive disease. Symptoms of *S. suis* pig infection have been largely described in the literature over the past 70–80 years and can include arthritis, meningitis, pneumonia, sepsis, endocarditis, encephalitis, polyserositis, abortion in females, and abscesses in growing animals [1,2]. Other animals can also be infected with this pathogen such as ruminants, cats, dogs, deer, or horses [3,4]. Furthermore, *S. suis* can also infect humans and is one of the most common causes of adult bacterial meningitis in South-East Asia (Thailand, Vietnam, China). In Asia, the incidence rate of this pathogen is the highest with up to 0.8 cases per 100,000 population [5]. Sporadic cases have been reported in Western European countries as well, but the ranges are 10 times lower [5]. Cases of *S. suis* human infections have already been observed worldwide. A late diagnostic or an inappropriate or late antibiotic treatment can be fatal, particularly due to a toxic shock-like syndrome [6–8]. In pig, *S. suis* is one of the opportunist pathogens of the porcine respiratory disease complex (PRDC), for which

the causes of infection are multifactorial [9,10]. In the PRDC, cases of co-infection with other pathogenic bacteria (e.g., *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Glaesserella parasuis*) and/or viruses (e.g., porcine reproductive and respiratory syndrome virus, swine influenza virus, porcine circovirus, porcine respiratory coronavirus) have been documented and generally result in a more severe clinical disease [2,10]. Four major criteria affect swine health: (1) host factors, (2) management inputs, (3) the existence of a stable microbial ecosystem, and (4) facilities [11], and therefore play a role in the infection by this pathogen. The serotype of the bacterium is also a key determinant. Serotypes are defined according to the composition of the extracellular capsule (CPS). Among the 29 already described serotypes, only a few are responsible for most of the diseases caused by *S. suis* [2]. The distribution of serotypes responsible for clinical cases is different between continents [2]. Serotype 2 is found recurrently in North America, South America, Asia, Australia, and Europe. In North America (Canada), serotypes 1, 1/2, and 2 seem to be the most frequently found in cases of infections by this pathogen, whereas in South America, a slight difference in the proportions of serotypes is observed, with a dominance of serotypes 1/2, 2, and 3. In Europe, serotypes 2, 4, 7, and 9 predominate [2]. The serotype distribution can also change with time in the same territory. A new very virulent serotype, the Chz serotype, responsible for meningitis in pigs, seems to have emerged in recent years, and 20 new cps loci (NCL) have been identified in non-typeable isolates [12,13]. Strains of *S. suis* can also be classified into three groups according to their pathotypes: (i) a “non-clinical” group for strains originating from the upper respiratory tract microbiota that do not trigger symptoms or cause the death of its host, (ii) a “respiratory” or “possibly opportunistic” group of strains generally sampled in lungs from clinically sick animals or from clinically healthy animals in farms that have suffered from outbreaks of *S. suis*, and (iii) a “pathogenic” or “systemic” group of strains obtained from samples of blood nervous and/or articular systems and identified as the causes of infection [14,15].

2. Antibiotics Used to Treat *S. suis* Infections in Pig Production

In pig production, antibiotics are used to eradicate weaning diarrhea, intestinal infections, and respiratory diseases (“Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine” UE 2015). The most commonly used antibiotics in swine industry are tetracyclines, beta-lactams, and macrolides [16,17]. Penicillin/amoxicillin can also be used in combination with aminoglycosides, macrolides, lincosamides, fluoroquinolones, or tetracyclines. Quinolones are not active against streptococci because of their intrinsic resistance, but fluoroquinolones can be used to treat streptococcal infections [18]. Second-generation (thiamphenicol) and third-generation (florfenicol) amphenicols are approved for treatment of swine respiratory disease in several countries including in Europe (European Medicines Agency: EMEA/CVMP/2316/2005-FINAL January 2005). Even if *S. suis* is not always targeted, it can be exposed to these antibiotics since it is present in the upper respiratory tract of pigs. Amphenicols are largely used in China but less in Europe [17]. The use of antibiotics in veterinary medicine, more or less important depending on the country, has led to an enhanced selection pressure, and resistance of *S. suis* isolates have increased worldwide [18,19].

3. Mechanisms of Antimicrobial Resistance (AMR) and Resistance Genes Found in *S. suis*

Antibiotics considered in this review have different targets: (i) cell wall inhibitors (such as beta-lactams, glycopeptides, and bacitracin) inhibit the enzymes involved in peptidoglycan synthesis, (ii) protein synthesis inhibitors (such as macrolides, lincosamides, amphenicols, tetracyclines, aminoglycosides, streptothricin, and oxazolidinones) inhibit the elongation of the peptide chain during translation, and (iii) nucleic acid synthesis inhibitors inhibit enzymes (topoisomerase IV, DNA gyrase) involved in DNA replication. According to the mechanism of action of the antibiotic, several mechanisms of resistance can be encountered. For some antibiotic families, up to three different types of resistance mecha-

nisms (antibiotic degradation or modification, efflux and target protection or modification) have been described (Figure 1).

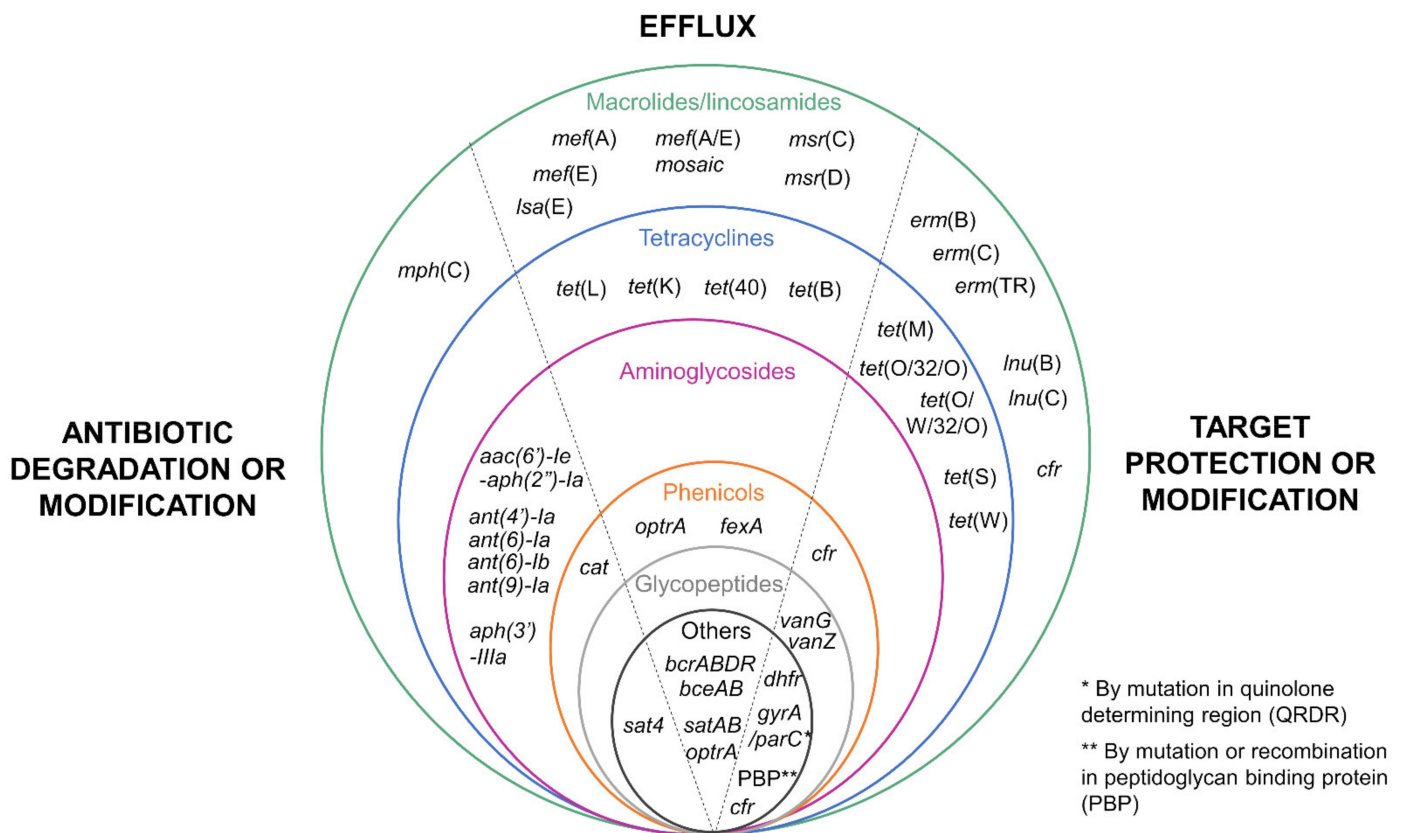


Figure 1. Resistance genes described in *Streptococcus suis*. The different genes conferring antibiotic resistance are classified in two ways: (i) according to their mechanism of resistance (on the left: degradation or modification of the target antibiotic; in the middle: efflux mechanisms; and on the right: target protection or modification, separated by a dotted line) and (ii) according to the family of antibiotics they target (circles of different colors: green for macrolides/lincosamides, blue for tetracyclines, pink for aminoglycosides, orange for amphenicolis, gray for glycopeptides, black for other families).

The rate of resistant strains observed in *S. suis* isolates is particularly high against tetracyclines (up to >90%) and macrolides (up to >70%). This is a worldwide phenomenon described for several decades now, and the genetic basis for these resistances has been extensively studied [19]. Many *S. suis* strains resistant to other families of antibiotics have also been described. Multiresistant strains are very frequent, and a huge diversity of resistance gene combinations has been described (Figure 2). The pattern of multiresistance can be impressive—up to 15 resistances observed in strain R61 [20] and 18 in a strain isolated in Spain [21].

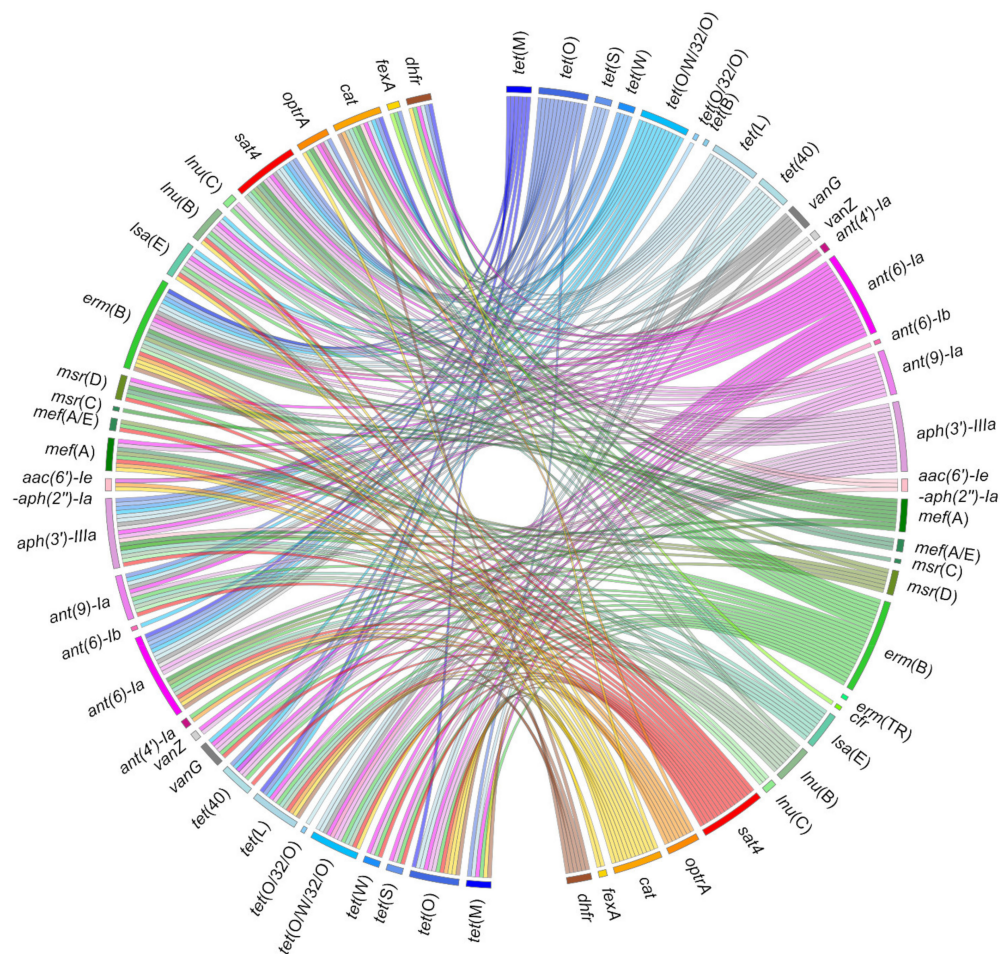


Figure 2. Co-occurrences of resistance genes described in *Streptococcus suis*. Ribbons indicate the co-occurrences between antibiotic resistance genes that have been reported in *S. suis*. The right panel includes all the genes described in *S. suis*. The left panel only includes those that have been described in association with other genes in the same strain of *S. suis*. The color code used is the same as for Figure 1. Detailed data are available as Supplementary Materials (Table S1).

3.1. Resistance to Tetracyclines

The World Health Organization “WHO” has classified antibiotics according to their use and observed resistance [22]. This classification categorizes tetracyclines as “highly important antimicrobials”. Resistance to tetracyclines in *S. suis* has been widely observed and documented throughout the world with, for example, a percentage of resistant strains ranging from 8% in Sweden (first observation in 1992) to 97% in Brazil (2009–2010 period) [18]. The French surveillance network for antimicrobial resistance in bacteria from diseased animals stated in its annual report of 2019 a resistance rate of 80% to tetracycline for *S. suis* isolated from pigs (RESAPATH 2020).

Two mechanisms of resistance to tetracyclines have been characterized in *S. suis*: (i) efflux pumps that expel the antibiotic outside the cell and are encoded either by *tet(L)*, *tet(B)*, *tet(K)*, or *tet(40)* genes [19,23–31] and (ii) ribosome protection proteins, encoded by *tet(O)* (the most frequently described gene in *S. suis*), *tet(M)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(O/W/32/O)*, or *tet(O/32/O)* genes [18,21,23–26,30,32,33] (Figure 1).

3.2. Resistance to Macrolides and Lincosamides

The WHO has classified macrolides as “critically important antimicrobials of highest priority” [22]. Resistance to macrolides in *S. suis* has also been widely observed, ranging from a rate of 52% in the first observation in Norway in 1986 to 94% in Korea for the 2010 to 2013 period [18]. In France, the annual report of RESAPATH indicated in 2019, 60% of

resistance to macrolides and lincosamides (54% for erythromycin, 65% for tylosin, 58% for spiramycin, and 61% for lincomycin) (RESAPATH 2020).

S. suis can use two energy-dependent transport systems to counteract the activity of macrolides and lincosamides: (i) ATP-binding cassette (ABC) transporters encoded by *msr*(C) or *msr*(D), and (ii) major facilitator superfamily (MFS) transporters encoded by *mef*(A), *mef*(E), and a mosaic *mef*(A/E) gene [26,30,33–36]. However, the most frequently resistance mechanisms reported for *S. suis* rely on target site modifications that prevent the binding of macrolides. They are mediated by enzymes that methylate the targets of macrolides, ribosomes, and are encoded by *erm*(B), *erm*(C), and *erm*(TR) genes [21,24,30,34,35]. Another gene encoding a 23s rRNA methyl transferase (*cfr*) has been described to be involved in resistance to selected 16S-membered macrolides [37]. This gene also confers resistance to lincosamides, pleuromutilins, streptogramin A, amphenicols, and the oxazolidinone linezolid [38]. The macrolide phosphotransferases (MPH) enzymes encoded by the *mph*(C) gene phosphorylate macrolides and thereby inactivate them [24] (Figure 1).

Mechanisms of resistance specific to lincosamides have also been reported. The first corresponds to an ABC transporter encoded by the *lsa*(E) gene. This transporter also confers resistance to pleuromutilins and streptogramin A. The second relates to the modification of the target by a nucleotidyl-transferase, encoded by the *lnu*(B) or *lnu*(C) genes [30,35,39,40] (Figure 1).

3.3. Resistance to Aminoglycosides

The WHO also classified aminoglycosides as “critically important antimicrobials” [22]. Streptococci naturally exhibit a low-level resistance to aminoglycosides. These antibiotics are currently used in combination with β -lactams in veterinary practice [18]. In France, the annual report of RESAPATH indicated in 2019 a rate of 2% of high-level resistance to aminoglycosides (2% for streptomycin, 4% for kanamycin, 0% for gentamicin). High-level aminoglycoside resistance in *S. suis* is due to several genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes that modify the antibiotic compounds, thus leading to their inactivation. The three existing aminoglycoside-modifying enzyme types have been described in *S. suis*. The first one corresponds to aminoglycoside N-acetyltransferases encoded by the *aac* genes with the description of the mosaic *aac*(6'')-Ie-aph(2')-Ia gene, mediating high-level resistance to gentamicin and other aminoglycosides except streptomycin. The second type is aminoglycoside O-phosphotransferases encoded by the *aph* genes such as *aph*(3'')-IIIa, mediating resistance to several aminoglycosides including kanamycin and neomycin. The third type is aminoglycoside O-nucleotidyl transferases encoded by the *ant* genes such as *ant*(4')-Ia that mediate resistance to several aminoglycosides including tobramycin and amikacin, *ant*(6)-Ia (also called *aadE*), and *ant*(6)-Ib mediating streptomycin resistance or *ant*(9)-Ia mediating spectinomycin resistance [20,24,26,30,33,40–42] (Figure 1).

3.4. Resistance to Streptothricin

To our knowledge, there is only one streptothricin resistance mechanism described in *S. suis*: a streptothricin N-acetyltransferase encoded by the *sat4* gene that modifies the antibiotic and inactivates it [33,43] (Figure 1).

3.5. Resistance to β -Lactams

Beta-lactams, which notably include penicillin, are a large family of antibiotics, classified as a “highly important antimicrobial” by the WHO [22]. Surprisingly, despite the worldwide use of beta-lactams in pigs for over 50 years, the majority of clinical *S. suis* remain sensitive to these antibiotics. Resistance to penicillin in *S. suis* has been reported in human and pig isolates (ranging from a percentage of 0.3% between 2013 and 2015 in the Netherlands to 26.0% in Spain in a recent report) [8,18,21,44]. Resistance to ampicillin has been reported to be lower than resistance to penicillin or ceftiofur [21,24,45].

In streptococci, beta-lactam resistance can be due to the modification (altered molecular weight and/or decreased affinity for penicillin) of several classes of penicillin-binding proteins (PBP) that are essential for peptidoglycan biosynthesis [18,46]. In 2011, Hu and collaborators made a thorough analysis of the *pbp* mutations that could explain the resistance of the R61 multiresistant strain to cefuroxime (second-generation cephalosporin) and cefotaxime (third-generation cephalosporin). Four PBP proteins have been identified in this strain (PBP2x, PBP2b, PBP1a, and PBP2a) [20]. The highest number of modifications was observed in the PBP2x protein followed by the PBP2b protein. Molecular dynamics simulation later indicated that the modified Ala320, Gln553, and Thr595 residues of PBP2x affect the conformation of the drug-binding pocket and thus induce a reduction of the drug affinity for the PBP2x penicillin-binding protein [47] (Figure 1).

3.6. Resistance to Fluoroquinolones

The WHO has classified quinolones as “critically important antimicrobials of highest priority” [22]. Fluoroquinolone resistance is unusual, and less than 2% of resistance has been typically observed in *S. suis* in Europe [36,48]. However, a high rate of resistance to enrofloxacin (46.6%) and danofloxacin (61.2%) has been recently reported for *S. suis* pig isolates in Spain [21].

In streptococci, DNA gyrase (composed of two subunits, GyrA and GyrB) and topoisomerase IV (made up of ParC and ParE) are the primary targets of quinolone action. A single mutation in the quinolone resistance-determining region (QRDR) of *gyrA* or *parC* can reduce susceptibility to fluoroquinolones [49]. Changes reducing drug binding to the enzyme–DNA complex mostly occur at positions S79 and D83 in ParC and S81 and E85 in GyrA [24,29,48,50], with a probable mutation path ParC79→GyrA85→GyrA81 [51]. In the multiresistant strain R61, high-level resistance (>64-fold increase of MIC compared to susceptible strains) to the second-generation fluoroquinolone levofloxacin and to the third-generation fluoroquinolone gatifloxacin is associated with two modifications in GyrA (at positions S81 and E85 of GyrA) and one in ParC (at position S79) [20]. The second mechanism relies on an efflux system belonging to the ATP binding cassette family of transporters. It is encoded by the *sat(A)* and *sat(B)* genes and can extrude the norfloxacin and ciprofloxacin fluoroquinolones [52] (Figure 1).

3.7. Resistance to Glycopeptides

The WHO also classified glycopeptides as “critically important antimicrobials of highest priority” [22]. Vancomycin is among the last-resort antimicrobial agents in the treatment of multidrug-resistant Gram-positive bacterial infection. Glycopeptides bind to the end of the growing peptide chain D-Ala-D-Ala, leading to interferences with the activity of the PBP enzymes such as transpeptidases. Vancomycin resistance relies on the modification of the target site. This modification is due to the presence of the *vanG* gene [29] that codes for peptidoglycan precursors with C-terminal modifications. Normally peptidoglycan is terminated by an amino acid sequence D-Ala-D-Ala whereas *vanG* codes for a C-terminal D-Ala-D-Ser amino acid sequence. The replacement of D-Ala by D-Ser induces a reduction of the vancomycin affinity for the peptidoglycan. Resistance to vancomycin linked to the *vanG* locus has been reported in strains of *S. suis* isolated in China [29,42]. A *vanZ*-like gene called *vanZ_{ss}* that can confer resistance to teicoplanin has also been described in *S. suis* [30,53] (Figure 1).

3.8. Resistance to Amphenicols

The WHO classified phenicols (recently renamed as amphenicols) as “highly important antimicrobials” [22]. Amphenicol resistance in *S. suis* is scarce in Europe [21,35,36,54] compared to the rates observed in Asia (up to 41% of resistance) [24,43,55,56]. Amphenicol resistance is mediated by several mechanisms in *S. suis*. The first is the Cfr rRNA methyl-transferase encoded by the *cfr* gene as described above [37], and the second is a chloramphenicol acetyl-transferase mediated by the *cat* gene [57]. *S. suis* antimicrobial re-

sistance genes also encode efflux proteins of the major facilitator superfamily that transport amphenicol-chloramphenicol outside the bacteria, in particular the FexA protein composed of 14 transmembrane helices [24,37,44,58]. *S. suis* can also harbor the *optrA* gene that encodes an ATP-binding cassette (ABC) transporter [44,57,59] (Figure 1).

3.9. Resistance to Bacitracin

Bacitracin is a polypeptide produced by *Bacillus licheniformis* acting on Gram-positive bacteria. The WHO classified cyclic polypeptides as “important antimicrobials” [22]. Bacitracin was previously used as a growth-promoting supplement in animal feed [60]. Several efflux pumps conferring resistance to bacitracin have been described in *S. suis*: (i) the membrane transporter BceAB [60], (ii) the efflux pump SstFEG [60], and (iii) an ABC transporter encoded by the *bcrABDR* genes [61] (Figure 1).

3.10. Resistance to Oxazolidinones

Oxazolidinones, in particular linezolid, show high efficiency against most Gram-positive bacteria including pathogens of importance for human health such as vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. These antibiotics have been classified as “critically important antimicrobials” by the WHO [22]. Two different genes conferring resistance to these antibiotics have been detected in *S. suis*. The first one is the *cfr* gene (mentioned earlier as it also confers resistance to amphenicols) that encodes a rRNA methyl-transferase [37]. The second one is the *optrA* gene encoding an ABC transporter (also previously mentioned as it confers resistance to several antibiotics including amphenicols and lincosamides) [44,57,59,61]. These genes should be scrutinized with attention due to their potential transfer to pathogens of importance for human health.

4. Dissemination of AMR Genes through Horizontal Gene Transfer in *S. suis*

Most of the resistance mechanisms described above are encoded by antibiotic resistance genes and can be transferred to other bacteria through horizontal gene transfer (HGT). By comparison with vertical gene transfer, consisting in genetic information transfer between a cell and its two-daughter cells, HGT enables the acquisition of exogenous genes between distantly related cells [62].

The three most described mechanisms of HGT are transformation, conjugation (through conjugative mobile genetic elements such as plasmids and integrative conjugative elements), and transduction (through phages) [62,63]. More recently described membrane vesicles could also participate to HGT [64].

4.1. Horizontal Gene Transfer by Transformation in *S. suis*

Competence is defined by two natural abilities of the bacteria: (i) the acquisition of naked DNA from the environment and (ii) the integration in their genome [65]. Competence was observed in different bacterial species, but its triggering and regulation have not been deciphered for all [66]. The first evidence of *S. suis* competence induction was reported by Zaccaria and collaborators in 2014 [67]. The *S. suis* transformation-signaling cascade can be divided into several steps. The first step consists of the internalization of an extracellular peptide by a membrane transporter (Opp). The mature peptide derives from a secreted peptide synthesized by the *comS* gene. Once internalized in the cell, the peptide (called a pheromone) interacts specifically with a transcriptional regulator (ComR). This specific interaction is the basis for the definition of different phenotypes. Three have been described thus far in *S. suis* [68]. The interaction of ComR with the pheromone activates the regulator that in turn activates the transcription of the *comX* gene that encodes the σ^X sigma factor. The latter controls the transcription of late competence genes encoding the transformasome competence machinery. The transformasome includes a multi-protein complex involved in the assembly of a type IV-like pilus (encoded by the *comY* operon in *S. suis*) and proteins involved in DNA transport (ComEA, EC, FA, and FC) [69]. After entry into the cells, foreign DNA is taken over by DNA-binding proteins and the homologous recombination

system. A fratricidal protein called CrfP regulated by ComR and ComX has been described recently in *S. suis* [70]. This protein is an exported murein hydrolase composed of one N-terminal CHAP domain capable of lysing the target cell and two SH3b domains capable of recognizing and binding the cell wall of *S. suis*. Inactivation of this protein reduced the transformation rate [70]. The biological function of CrfP is likely to lyse and release DNA from related *Streptococcus* strains to provide homologous DNA to competent recipient cells.

Transformation is expensive in terms of energy, and therefore mechanisms of competence shut down exist. In streptococci, shut down occurs through post-transcriptional regulation through a σ^X degradation system or by shutting down *comX* expression. None of these mechanisms have yet been characterized in *S. suis* [69].

Competence in streptococci is induced by environmental stresses such as DNA damage, nutrient limitation, or the presence of antibiotics [65,71,72]. Activation of *S. suis* transformation was observed during growth in active porcine and human sera [73]. Transformation is random in the types of genes integrated to the recipient cells. Since DNA integration can be deleterious for the bacteria, long-term maintenance of the transformed alleles will be determined by the ratio of beneficial vs. deleterious genes [65]. DNA acquired by transformation can include mutated chromosomal copies of topoisomerase IV or gyrase genes (conferring fluoroquinolone resistance) or *pbp* genes (conferring resistance to beta-lactams), single or multiple (if grouped on genetic elements) resistance genes, or even whole genetic elements (either mobile or defective ones) carrying AMR genes. These events provide a selective advantage in case of exposure to these antibiotics.

4.2. Horizontal Gene Transfer by Conjugation in *S. suis*

The most frequent mobile genetic elements carrying AMR genes in *S. suis* are integrative and conjugative elements (ICEs) and integrative and mobilizable elements (IMEs) [25,30,33]. Both kinds of elements are chromosomal genetic elements that transfer by conjugation after excision from the chromosome. ICEs can transfer autonomously using a conjugation machinery that they encode. DNA is taken over by a complex called a relaxosome made up of a relaxase and other proteins [74]. The relaxase of this complex is recognized by a coupling protein (CP), which will then interact with the type IV secretion system (T4SS) present in the cell wall that enables the translocation of the DNA–relaxase complex into the recipient cell. IMEs are not autonomous and rely on the conjugation machinery of autonomous conjugative elements (ICEs or plasmids) for their transfer [75]. IMEs are poorly studied and thus overlooked, but likely play a major role in the transfer of resistance genes in *S. suis* [30]. Many studies carried on *S. suis* genomes do not include a proper search of ICEs and IMEs since the available bioinformatic tools are usually not efficient and cannot cope with the presence of multiple related elements in the same strain, internal accretions, elements in tandem, and mosaic patterns (between conjugative elements but also with prophages) observed in this bacterial species.

ICEs and IMEs can be integrated in different sites depending on the recombination enzyme (called integrase) they encode: tRNA genes, ribosomal protein-encoding genes, and other conserved genes, some of them being located inside other mobile genetic elements. ICEs and IMEs are delimited by attachment sites (*attL* to the left and *attR* to the right) that enable integrase binding and recombination, allowing integration or excision of the genetic element.

Five ICE families (defined by their conjugation genes) carrying AMR genes have been described in *S. suis*: elements of the Tn5252, Tn1549, and Tn916 families; elements related to TnGBS2; and ICEs integrated in the *lysS* gene related to ICE*vanG*. These various ICEs carrying AMR genes are presented in Figure 3 [25,26,29,30,33,42,76,77]. Until now, only ICEs of the Tn5252 family have been studied experimentally to evaluate their mobility in *S. suis* [12,23,25,30,33,57,77].

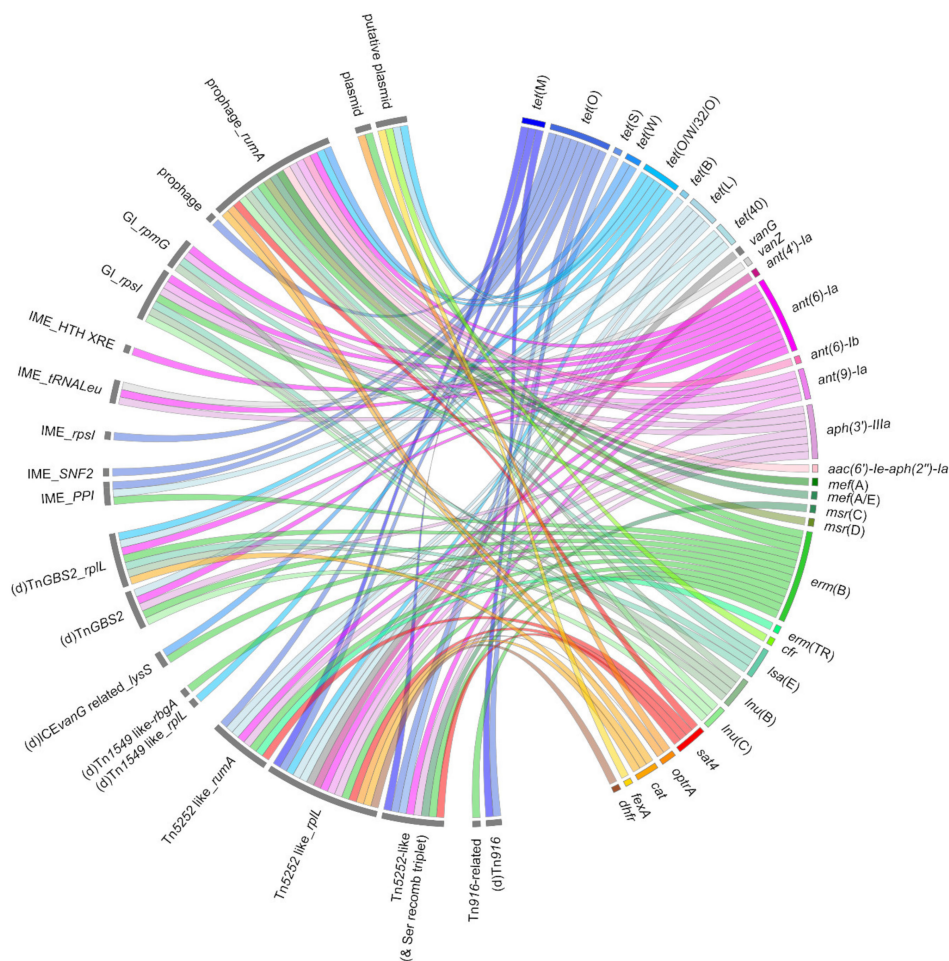


Figure 3. Mobile genetic elements carrying resistance genes described in *Streptococcus suis*. Ribbons indicate the association between resistance genes (appearing in the right panel) and mobile genetic elements (on the left panel). The color code used to distinguish the different resistance genes is the same as for Figures 1 and 2.

ICEs can integrate into a site already harboring a genetic element leading to the formation of a tandem. Two types of tandems have been described thus far: ICE–ICE tandems and ICE–prophage tandems [26,33]. ICEs can also integrate inside other ICEs (internal accretions), e.g., Tn916 and Tn5397 integrations inside Tn5252-related ICEs [26,33].

ICEs can also host IMEs carrying antibiotic resistance genes. This is the case for IMEs integrated in the SNF2 (encoding a putative helicase) and PPI (peptidylprolyl isomerase) genes of ICEs of the Tn5252 family that carry *tet(O)* or *tet(O)-erm(B)* genes [30].

Several other putative IMEs carrying AMR genes have been identified in *S. suis*: IME_ *rpsI* carrying *tet(O)* (tetracycline resistance), IME_HTH-XRE with the *ant(6)-Ia* gene (streptomycin resistance), and IME_ *tRNA^{Leu}* carrying *aph(3')-IIIa-vanZ-delta sat4-ant(6)* genes conferring resistance to kanamycin, teicoplanin, streptothricin, and streptomycin respectively (Figure 3) [30]. Like ICEs, IMEs can form tandems [30]. Further studies are needed to identify the conjugative elements that enable the mobilization of these IMEs carrying AMR genes.

Genomic islands (GIs) integrated in the *rpsI* gene have been mis-annotated as ICEs, even if they lacked conjugation genes [40]. These elements could be mobilizable by diverting the necessary elements of an ICE. Several resistance genes were located on GIs integrated in *rpsI*: *ant(9)-erm(B)*, *ant(9)-lnu(B)*, *ant(9)-lnu(C)*, *ant(9)-erm(B)-lnu(B)*, *ant(9)-lnu(C)-erm(B)*, *ant(9)-lnu(B)-lsa(E)*, and *ant(9)-aph(3')-IIIa-lnu(B)-lsa(E)-ant(6)*, conferring resistance to macrolides, lincosamides, and aminoglycosides (Figure 3) [30].

Unconventional circularizable structures (UCSs) are genetic elements that lack recombinase but can excise as a circular form thanks to extensive direct repeats (DRs) flanking the DNA segment [78]. In *S. suis*, UCSs can carry multiple antibiotic resistance genes *tet(O/W/32/O)*, *tet(40)*, *erm(B)*, *ant(6)-Ia*, and *aph(3'')-IIIa* [79]. By targeting a conserved site on ICEs of the Tn5252 family that transfer at high frequency, these genetic elements may employ a parasitic strategy to spread among the streptococcal population [79].

Until now, there has been no description of conjugative (or even mobilizable) plasmid carrying AMR genes in *S. suis*. Some AMR genes (*erm(B)* and *tet(O/W/32/O)*, *tet(B)*, *cfr* or *optrA*) could be carried by non-self-transmissible plasmids, but further studies are needed for most of them to confirm these results (Figure 3) [37,79–81]. If they are carried by transposons, these genes may move intracellularly or gain intercellular mobility by integrating in conjugative elements.

4.3. Horizontal Gene Transfer by Transduction in *S. suis*

Bacteriophages can be integrated into the bacterial chromosome as prophages. After entry into lytic phase, bacterial DNA can be fortuitously packaged in the viral capsid and be transferred into another cell. This process is called transduction. In 2008, Ma and Lu were the first to demonstrate the existence of a lytic bacteriophage (bacteriophage SMP) capable of infecting *S. suis* [82]. In 2015, a genomic study of 375 *S. suis* genomes highlighted five genes presenting sequence homology with genes of a lytic bacteriophage [14]. In 2017, Huang and collaborators described the *optrA* resistance gene carried by a prophage (Φ m46.1) [59]. This prophage belongs to a family originally described in *S. pyogenes* and *S. agalactiae*, thus suggesting the ability of this prophage to infect other streptococcal species. Resistance genes such as *erm(B)*, *mef(A)*, *aph(3')-III*, *ant(6)-Ia*, *aac(6')-aph(2'')*, *cat(pC₁₉₄)*, *optrA*, *sat4*, *tet(O/W/32/O)*, and *tet(W)* were also observed in prophages (Figure 3) [40,42,57]. ICEs and prophages can also be found together in chimeric and tandem forms [26].

5. Formation of Biofilm and Antimicrobial Resistance

Bacteria are present in two forms in the environment, in planktonic form (isolated in suspension in a liquid medium) and in sessile form in contact with a surface (forming a biofilm). The development of bacteria in biofilms is a major survival strategy. In a biofilm, bacteria aggregate into a complex structure, embedded in an extracellular matrix also including protozoan and micro-invertebrate communities. This matrix contains an extracellular polymeric substance (EPS) secreted by the bacteria and mainly composed of polysaccharides, extracellular DNA, proteins, and cellulose [83]. The biofilm confers protection to the bacterial communities colonizing these surfaces against antibiotics [84] and biocides [83]. Biofilm development of *S. suis* increases its resistance to penicillin and ampicillin [85].

Within this biofilm and generally in the environment, the bacteria communicate with each other through quorum sensing. Quorum sensing is an intercellular communication system used by many bacteria including *S. suis* [77,86–88]. When the concentration of signaling molecules, such as the LuxS autoinducer-2, reaches a threshold level, bacteria can induce the expression of genes that participate to diverse processes, in particular, biofilm formation and antibiotic resistance. Strains with a LuxS quorum sensing system showed an increased susceptibility to fluoroquinolones [87], while addition of exogenous AI-2 signaling molecule increases resistance to tetracycline though a regulatory effect on Tn916 carrying *tet(M)* [89]. Other molecules, in particular sub-inhibitory concentrations of amoxicillin, lincomycin, and oxytetracycline, were described in the literature to induce biofilm formation [77,90]. In 2020, Wang and collaborators suggest a possible cooperation between *S. suis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* [88]. They found an increase in antibiotic resistance when the two bacteria are co-cultured in biofilms. Different mechanisms are responsible for antibiotic resistance of *S. suis* embedded in biofilm: high expression of EPS,

efflux pumps, reduced growth and metabolic adaptation, stress response induction, high probability of gene mutations, and horizontal gene transfer [77].

6. Conclusions

S. suis is a bacterial pathogen responsible for severe infections in pigs and consequently causes animal suffering and important economic losses in pig production. This bacterial species can also colonize other animal hosts, including wild fauna, and is a zoonotic pathogen for humans. A plethora of antibiotic resistance genes have been described in this bacterium, most of them being carried by mobile genetic elements (in particular ICEs, IMEs, and prophages). It is worrying since *S. suis* can serve as a reservoir of resistance genes to other species sharing the same habitats. It is therefore essential to further characterize the mobile resistome of this pathogen that can compromise animal and human health and participate to the dissemination of AMR genes between animals and humans. This is one of the worldwide challenges to be taken up in the incoming years in order to preserve the activity of critical antimicrobials.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms9081765/s1>, Table S1: Associations between antimicrobial resistance genes reported in *Streptococcus suis*.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Goyette-Desjardins, G.; Auger, J.-P.; Xu, J.; Segura, M.; Gottschalk, M. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—An update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg. Microbes Infect.* **2014**, *3*, 1–20. [CrossRef] [PubMed]
- Segura, M.; Aragon, V.; Brockmeier, S.L.; Gebhart, C.; De Greeff, A.; Kerdsin, A.; O’Dea, M.A.; Okura, M.; Saléry, M.; Schultsz, C.; et al. Update on *Streptococcus suis* Research and Prevention in the Era of Antimicrobial Restriction: 4th International Workshop on *S. suis*. *Pathogens* **2020**, *9*, 374. [CrossRef] [PubMed]
- Staats, J.; Feder, I.; Okwumabua, O.; Chengappa, M. *Streptococcus suis*: Past and Present. *Vet. Res. Commun.* **1997**, *21*, 381–407. [CrossRef]
- Gottschalk, M. Streptococcosis. In *Diseases of Swine*, 10th ed.; Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W., Eds.; Wiley-Blackwell Publishing: Ames, IA, USA, 2012; p. 841. Available online: https://www.academia.edu/24526077/Diseases_of_Swine_10th_edition (accessed on 12 July 2021).
- Huong, V.T.L.; Ha, N.; Huy, N.T.; Horby, P.; Nghia, H.D.T.; Thiem, V.D.; Zhu, X.; Hoa, N.T.; Hien, T.T.; Zamora, J.; et al. Epidemiology, Clinical Manifestations, and Outcomes of *Streptococcus suis* Infection in Humans. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1105–1114. [CrossRef] [PubMed]
- Eisenberg, T.; Hudemann, C.; Hossain, H.M.; Hewer, A.; Tello, K.; Bandorski, D.; Rohde, M.; Valentin-Weigand, P.; Baums, C.G. Characterization of Five Zoonotic *Streptococcus suis* Strains from Germany, Including One Isolate from a Recent Fatal Case of Streptococcal Toxic Shock-Like Syndrome in a Hunter. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 3912–3915. [CrossRef]
- López-Mestanza, C.; Bolaño-Navarro, A.; Sánchez-Sánchez, A.; Aldea-Mansilla, C. Primer caso de shock séptico por *Streptococcus suis* de posible etiología alimentaria en España. *Med. Intensiv.* **2016**, *40*, 516–518. [CrossRef]
- Dutkiewicz, J.; Sroka, J.; Zajac, V.; Wasiński, B.; Cisek, E.; Sawczyn-Domańska, A.; Kloc, A.; Wójcik-Fatla, A. *Streptococcus suis*: A re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part I—Epidemiology. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2017**, *24*, 683–695. [CrossRef]
- Vötsch, D.; Willenborg, M.; Weldearegay, Y.B.; Valentin-Weigand, P. *Streptococcus suis*—The “Two Faces” of a Pathobiont in the Porcine Respiratory Tract. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 480. [CrossRef]
- Marois-Créhan, C.; Segalés, J.; Holtkamp, D.; Chae, C.-H.; Deblanc, C.; Opriessnig, T.; Fablet, C. Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* with other pathogens and economic impact. In *Mycoplasmas in Swine*; CABI Publishing: Wallingford, UK, 2021; pp. 127–145.
- Zeineldin, M.; Aldridge, B.; Lowe, J. Antimicrobial Effects on Swine Gastrointestinal Microbiota and Their Accompanying Antibiotic Resistome. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1035. [CrossRef]
- Pan, Z.; Ma, J.; Dong, W.; Song, W.; Wang, K.; Lu, C.; Yao, H. Novel Variant Serotype of *Streptococcus suis* Isolated from Piglets with Meningitis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *81*, 976–985. [CrossRef]

13. Huang, J.; Liu, X.; Chen, H.; Chen, L.; Gao, X.; Pan, Z.; Wang, J.; Lu, C.; Yao, H.; Wang, L.; et al. Identification of six novel capsular polysaccharide loci (NCL) from *Streptococcus suis* multidrug resistant non-typeable strains and the pathogenic characteristic of strains carrying new NCL s. *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**, *66*, 995–1003. [CrossRef]
14. Weinert, L.A.; BRaDP1T Consortium; Chaudhuri, R.; Wang, J.; Peters, S.E.; Corander, J.; Jombart, T.; Baig, A.; Howell, K.J.; Vehkala, M.; et al. Genomic signatures of human and animal disease in the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6740. [CrossRef]
15. Estrada, A.A.; Gottschalk, M.; Rossow, S.; Rendahl, A.; Gebhart, C.; Marthaler, D.G. Serotype and Genotype (Multilocus Sequence Type) of *Streptococcus suis* Isolates from the United States Serve as Predictors of Pathotype. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e00377-19. [CrossRef] [PubMed]
16. Cuong, N.V.; Padungtod, P.; Thwaites, G.; Carrique-Mas, J.J. Antimicrobial Usage in Animal Production: A Review of the Literature with a Focus on Low- and Middle-Income Countries. *Antibiotics* **2018**, *7*, 75. [CrossRef]
17. Lekagul, A.; Tangcharoensathien, V.; Yeung, S. Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. *Vet. Anim. Sci.* **2019**, *7*, 100058. [CrossRef] [PubMed]
18. Haenni, M.; Lupo, A.; Madec, J.-Y. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp. *Microbiol. Spectr.* **2018**, *6*, e0008-2017. [CrossRef]
19. Varela, N.P.; Gadbois, P.; Thibault, C.; Gottschalk, M.; Dick, P.; Wilson, J. Antimicrobial resistance and prudent drug use for *Streptococcus suis*. *Anim. Health Res. Rev.* **2013**, *14*, 68–77. [CrossRef] [PubMed]
20. Hu, P.; Yang, M.; Zhang, A.; Wu, J.; Chen, B.; Hua, Y.; Yu, J.; Chen, H.; Xiao, J.; Jin, M. Comparative Genomics Study of Multi-Drug-Resistance Mechanisms in the Antibiotic-Resistant *Streptococcus suis* R61 Strain. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e24988. [CrossRef]
21. Petrocchi-Rilo, M.; Martínez-Martínez, S.; Aguarón-Turrientes, Á.; Roca-Martínez, E.; García-Iglesias, M.-J.; Pérez-Fernández, E.; González-Fernández, A.; Herencia-Lagunar, E.; Gutiérrez-Martín, C.-B. Anatomical Site, Typing, Virulence Gene Profiling, Antimicrobial Susceptibility and Resistance Genes of *Streptococcus suis* Isolates Recovered from Pigs in Spain. *Antibiotics* **2021**, *10*, 707. [CrossRef]
22. WHO. Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance, World Health Organization, Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: Ranking of Antimicrobial Agents for Risk Management of Antimicrobial Resistance due to Non-Human Use. Available online: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255027/1/9789241512220-eng.pdf> (accessed on 12 July 2021).
23. Chen, L.; Song, Y.; Wei, Z.; He, H.; Zhang, A.; Jin, M. Antimicrobial Susceptibility, Tetracycline and Erythromycin Resistance Genes, and Multilocus Sequence Typing of *Streptococcus suis* Isolates from Diseased Pigs in China. *J. Vet. Med. Sci.* **2013**, *75*, 583–587. [CrossRef]
24. Gurung, M.; Tamang, M.D.; Moon, D.C.; Kim, S.-R.; Jeong, J.-H.; Jang, G.-C.; Jung, S.-C.; Park, Y.-H.; Lim, S.-K. Molecular Basis of Resistance to Selected Antimicrobial Agents in the Emerging Zoonotic Pathogen *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 2332–2336. [CrossRef] [PubMed]
25. Huang, J.; Eliang, Y.; Eguo, D.; Eshang, K.; Ege, L.; Ekashif, J.; Ewang, L. Comparative Genomic Analysis of the ICESa2603 Family ICEs and Spread of *erm*(B)- and *tet*(O)-Carrying Transferable 89K-Subtype ICEs in Swine and Bovine Isolates in China. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 55. [CrossRef]
26. Huang, J.; Ma, J.; Shang, K.; Hu, X.; Liang, Y.; Li, D.; Wu, Z.; Dai, L.; Chen, L.; Wang, L. Evolution and Diversity of the Antimicrobial Resistance Associated Mobilome in *Streptococcus suis*: A Probable Mobile Genetic Elements Reservoir for Other Streptococci. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, *6*, 118. [CrossRef]
27. Munita, J.M.; Arias, C.A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*, 42–51. [CrossRef]
28. Markley, J.; Wenciewicz, T.A. Tetracycline-Inactivating Enzymes. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1058. [CrossRef] [PubMed]
29. Huang, J.; Chen, L.; Li, D.; Wang, M.; Du, F.; Gao, Y.; Wu, Z.; Wang, L. Emergence of a *vanG*-carrying and multidrug resistant ICE in zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *Vet. Microbiol.* **2018**, *222*, 109–113. [CrossRef]
30. Libante, V.; Nombre, Y.; Coluzzi, C.; Staub, J.; Guédon, G.; Gottschalk, M.; Teatero, S.; Fittipaldi, N.; Leblond-Bourget, N.; Payot, S. Chromosomal Conjugative and Mobilizable Elements in *Streptococcus suis*: Major Actors in the Spreading of Antimicrobial Resistance and Bacteriocin Synthesis Genes. *Pathogens* **2019**, *9*, 22. [CrossRef] [PubMed]
31. Tan, M.; Tan, J.; Zeng, Y.; Li, H.; Yang, Q.; Zhou, R. Antimicrobial resistance phenotypes and genotypes of *Streptococcus suis* isolated from clinically healthy pigs from 2017 to 2019 in Jiangxi Province, China. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *130*, 797–806. [CrossRef]
32. Hoa, N.T.; Chieu, T.T.B.; Nghia, H.D.T.; Mai, N.T.H.; Anh, P.H.; Wolbers, M.; Baker, S.; Campbell, J.I.; Chau, N.V.V.; Hien, T.T.; et al. The antimicrobial resistance patterns and associated determinants in *Streptococcus suis* isolated from humans in southern Vietnam, 1997–2008. *BMC Infect. Dis.* **2011**, *11*, 6. [CrossRef]
33. Palmieri, C.; Valardo, P.E.; Facinelli, B. *Streptococcus suis*, an Emerging Drug-Resistant Animal and Human Pathogen. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 235. [CrossRef]
34. Gajic, I.; Mijac, V.; Opavski, N.; Stanojevic, M.; Lazarevic, I.; Smitran, A.; Hadnadjev, M.; Ranin, L. Distribution of macrolide-resistant genes among isolates of macrolide resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* in Serbia. *Arch. Biol. Sci.* **2014**, *66*, 93–98. [CrossRef]
35. Bojarska, A.; Molska, E.; Janas, K.; Skoczynska, A.; Stefaniuk, E.; Hryniewicz, W.; Sadowy, E. *Streptococcus suis* in invasive human infections in Poland: Clonality and determinants of virulence and antimicrobial resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *35*, 917–925. [CrossRef]

36. Holmer, I.; Salomonsen, C.M.; Jorsal, S.E.; Astrup, L.B.; Jensen, V.F.; Høg, B.B.; Pedersen, K. Antibiotic resistance in porcine pathogenic bacteria and relation to antibiotic usage. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 1–13. [[CrossRef](#)]
37. Wang, Y.; Li, D.; Song, L.; Liu, Y.; He, T.; Liu, H.; Wu, C.; Schwarz, S.; Shen, J. First Report of the Multiresistance Gene *cfr* in *Streptococcus suis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 4061–4063. [[CrossRef](#)]
38. Shen, J.; Wang, Y.; Schwarz, S. Presence and dissemination of the multiresistance gene *cfr* in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 1697–1706. [[CrossRef](#)]
39. Bozdogan, B.; Berrezouga, L.; Kuo, M.-S.; Yurek, D.A.; Farley, K.A.; Stockman, B.; Leclercq, R. A New Resistance Gene, *linB*, Conferring Resistance to Lincosamides by Nucleotidylation in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 925–929. [[CrossRef](#)]
40. Huang, K.; Zhang, Q.; Song, Y.; Zhang, Z.; Zhang, A.; Xiao, J.; Jin, M. Characterization of Spectinomycin Resistance in *Streptococcus suis* Leads to Two Novel Insights into Drug Resistance Formation and Dissemination Mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 6390–6392. [[CrossRef](#)]
41. Holden, M.T.G.; Hauser, H.; Sanders, M.; Ngo, T.H.; Cherevach, I.; Cronin, A.; Goodhead, I.; Mungall, K.; Quail, M.A.; Price, C.; et al. Rapid Evolution of Virulence and Drug Resistance in the Emerging Zoonotic Pathogen *Streptococcus suis*. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6072. [[CrossRef](#)]
42. Du, F.; Lv, X.; Duan, D.; Wang, L.; Huang, J. Characterization of a Linezolid- and Vancomycin-Resistant *Streptococcus suis* Isolate That Harbors *optrA* and *vanG* Operons. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2026. [[CrossRef](#)]
43. Yongkiettrakul, S.; Maneerat, K.; Arechanajan, B.; Malila, Y.; Srimanote, P.; Gottschalk, M.; Visessanguan, W. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs, asymptomatic pigs, and human patients in Thailand. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 1–12. [[CrossRef](#)]
44. O’Dea, M.A.; Laird, T.; Abraham, R.; Jordan, D.; Lugsomya, K.; Fitt, L.; Gottschalk, M.; Truswell, A.; Abraham, S. Examination of Australian *Streptococcus suis* isolates from clinically affected pigs in a global context and the genomic characterisation of ST1 as a predictor of virulence. *Vet. Microbiol.* **2018**, *226*, 31–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zhang, B.; Ku, X.; Yu, X.; Sun, Q.; Wu, H.; Chen, F.; Zhang, X.; Guo, L.; Tang, X.; He, Q. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens in Chinese pig farms from 2013 to 2017. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Sauvage, E.; Kerff, F.; Terrak, M.; Ayala, J.; Charlier, P. The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 234–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ge, Y.; Wu, J.; Xia, Y.; Yang, M.; Xiao, J.; Yu, J. Molecular Dynamics Simulation of the Complex PBP-2x with Drug Cefuroxime to Explore the Drug Resistance Mechanism of *Streptococcus suis* R61. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Escudero, J.A.; Millan, A.S.; Catalan, A.; de la Campa, A.; Rivero, E.; Lopez, G.; Dominguez, L.; Moreno, M.; Gonzalez-Zorn, B. First Characterization of Fluoroquinolone Resistance in *Streptococcus suis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 777–782. [[CrossRef](#)]
49. Hooper, D.C.; Jacoby, G.A. Mechanisms of drug resistance: Quinolone resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2015**, *1354*, 12–31. [[CrossRef](#)]
50. Hernandez-Garcia, J.; Wang, J.; Restif, O.; Holmes, M.A.; Mather, A.E.; Weinert, L.A.; Wileman, T.M.; Thomson, J.R.; Langford, P.R.; Wren, B.W.; et al. Patterns of antimicrobial resistance in *Streptococcus suis* isolates from pigs with or without streptococcal disease in England between 2009 and 2014. *Vet. Microbiol.* **2017**, *207*, 117–124. [[CrossRef](#)]
51. Ostrer, L.; Khodursky, R.F.; Johnson, J.R.; Hiasa, H.; Khodursky, A. Analysis of Mutational Patterns in Quinolone Resistance-Determining Regions of *gyrA* and *parC* of Clinical Isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2019**, *53*, 318–324. [[CrossRef](#)]
52. Escudero, J.A.; San Millan, A.; Gutierrez, B.; Hidalgo, L.; La Ragione, R.M.; AbuOun, M.; Galimand, M.; Ferrándiz, M.J.; Dominguez, L.; de la Campa, A.G.; et al. Fluoroquinolone Efflux in *Streptococcus suis* Is Mediated by *satAB* and Not by *smrA*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 5850–5860. [[CrossRef](#)]
53. Lai, L.; Dai, J.; Tang, H.; Zhang, S.; Wu, C.; Qiu, W.; Lu, C.; Yao, H.; Fan, H.; Wu, Z. *Streptococcus suis* Serotype 9 Strain GZ0565 Contains a Type VII Secretion System Putative Substrate EsxA That Contributes to Bacterial Virulence and a *vanZ*-like Gene That Confers Resistance to Teicoplanin and Dalbavancin in *Streptococcus agalactiae*. *Vet. Microbiol.* **2017**, *205*, 26–33. [[CrossRef](#)]
54. El Garch, F.; de Jong, A.; Simjee, S.; Moyaert, H.; Klein, U.; Ludwig, C.; Marion, H.; Haag-Diergarten, S.; Richard-Mazet, A.; Thomas, V.; et al. Monitoring of Antimicrobial Susceptibility of Respiratory Tract Pathogens Isolated from Diseased Cattle and Pigs across Europe, 2009–2012: VetPath Results. *Vet. Microbiol.* **2016**, *194*, 11–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Tan, S.; Dvorak, C.M.T.; Estrada, A.A.; Gebhart, C.; Marthaler, D.G.; Murtaugh, M.P. MinION Sequencing of *Streptococcus suis* Allows for Functional Characterization of Bacteria by Multilocus Sequence Typing and Antimicrobial Resistance Profiling. *J. Microbiol. Methods* **2020**, *169*, 105817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Ichikawa, T.; Oshima, M.; Yamagishi, J.; Muramatsu, C.; Asai, T. Changes in Antimicrobial Resistance Phenotypes and Genotypes in *Streptococcus suis* Strains Isolated from Pigs in the Tokai Area of Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **2020**, *82*, 9–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Shang, Y.; Li, D.; Hao, W.; Schwarz, S.; Shan, X.; Liu, B.; Zhang, S.-M.; Li, X.-S.; Du, X.-D. A Prophage and Two ICESa2603-Family Integrative and Conjugative Elements (ICEs) Carrying *optrA* in *Streptococcus suis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 2876–2879. [[CrossRef](#)]
58. Kehrenberg, C.; Schwarz, S. *fexA*, a Novel *Staphylococcus lentus* Gene Encoding Resistance to Florfenicol and Chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 615–618. [[CrossRef](#)]

59. Huang, J.; Chen, L.; Wu, Z.; Wang, L. Retrospective Analysis of Genome Sequences Revealed the Wide Dissemination of *optrA* in Gram-Positive Bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 614–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Ma, J.; Liu, J.; Zhang, Y.; Wang, D.; Liu, R.; Liu, G.; Yao, H.; Pan, Z. Bacitracin Resistance and Enhanced Virulence of *Streptococcus suis* via a Novel Efflux Pump. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 377. [[CrossRef](#)]
61. Huang, J.; Sun, J.; Wu, Y.; Chen, L.; Duan, D.; Lv, X.; Wang, L. Identification and Pathogenicity of an XDR *Streptococcus suis* Isolate That Harbours the Phenicol-Oxazolidinone Resistance Genes *optrA* and *cfr*, and the Bacitracin Resistance Locus *bcrABDR*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2019**, *54*, 43–48. [[CrossRef](#)]
62. Arber, W. Horizontal Gene Transfer among Bacteria and Its Role in Biological Evolution. *Life* **2014**, *4*, 217–224. [[CrossRef](#)]
63. Soucy, S.M.; Huang, J.; Gogarten, J.P. Horizontal Gene Transfer: Building the Web of Life. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 472–482. [[CrossRef](#)]
64. Soler, N.; Forterre, P. Vesiduction: The Fourth Way of HGT. *Environ. Microbiol.* **2020**, *22*, 2457–2460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Fontaine, L.; Wahl, A.; Fléchar, M.; Mignolet, J.; Hols, P. Regulation of Competence for Natural Transformation in Streptococci. *Infect. Genet. Evol.* **2014**, *33*, 343–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Shanker, E.; Morrison, D.A.; Talagas, A.; Nessler, S.; Federle, M.J.; Prehna, G. Pheromone Recognition and Selectivity by ComR Proteins among *Streptococcus* Species. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Zaccaria, E.; van Baarlen, P.; de Greeff, A.; Morrison, D.A.; Smith, H.; Wells, J.M. Control of Competence for DNA Transformation in *Streptococcus suis* by Genetically Transferable Pherotypes. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99394. [[CrossRef](#)]
68. Okura, M.; Nozawa, T.; Watanabe, T.; Murase, K.; Nakagawa, I.; Takamatsu, D.; Osaki, M.; Sekizaki, T.; Gottschalk, M.; Hamada, S.; et al. A Locus Encoding Variable Defense Systems against Invading DNA Identified in *Streptococcus suis*. *Genome Biol. Evol.* **2017**, *9*, 1000–1012. [[CrossRef](#)]
69. Zaccaria, E.; Wels, M.; van Baarlen, P.; Wells, J.M. Temporal Regulation of the Transformosome and Competence Development in *Streptococcus suis*. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1922. [[CrossRef](#)]
70. Zhu, Y.; Ma, J.; Zhang, Y.; Zhong, X.; Bai, Q.; Dong, W.; Pan, Z.; Liu, G.; Zhang, C.; Yao, H. CrfP, a Fratricide Protein, Contributes to Natural Transformation in *Streptococcus suis*. *Vet. Res.* **2021**, *52*, 50. [[CrossRef](#)]
71. Bjedov, I.; Tenaillon, O.; Gérard, B.; Souza, V.; Denamur, E.; Radman, M.; Taddei, F.; Matic, I. Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria. *Science* **2003**, *300*, 1404. [[CrossRef](#)]
72. Claverys, J.-P.; Prudhomme, M.; Martin, B. Induction of Competence Regulons as a General Response to Stress in Gram-Positive Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **2006**, *60*, 451–475. [[CrossRef](#)]
73. Ferrando, M.L.; Gussak, A.; Mentink, S.; Gutierrez, M.F.; van Baarlen, P.; Wells, J.M. Active Human and Porcine Serum Induce Competence for Genetic Transformation in the Emerging Zoonotic Pathogen *Streptococcus suis*. *Pathogens* **2021**, *10*, 156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Bellanger, X.; Payot, S.; Leblond-Bourget, N.; Guédon, G. Conjugative and Mobilizable Genomic Islands in Bacteria: Evolution and Diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* **2014**, *38*, 720–760. [[CrossRef](#)]
75. Guédon, G.; Libante, V.; Coluzzi, C.; Payot, S.; Leblond-Bourget, N. The Obscure World of Integrative and Mobilizable Elements, Highly Widespread Elements That Pirate Bacterial Conjugative Systems. *Genes* **2017**, *8*, 337. [[CrossRef](#)]
76. Ambroset, C.; Coluzzi, C.; Guédon, G.; Devignes, M.-D.; Loux, V.; Lacroix, T.; Payot, S.; Leblond-Bourget, N. New Insights into the Classification and Integration Specificity of *Streptococcus* Integrative Conjugative Elements through Extensive Genome Exploration. *Front. Microbiol.* **2016**, *6*, 1483. [[CrossRef](#)]
77. Yi, L.; Jin, M.; Li, J.; Grenier, D.; Wang, Y. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Streptococcus suis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 8649–8660. [[CrossRef](#)]
78. Palmieri, C.; Mingoaia, M.; Varaldo, P.E. Unconventional Circularizable Bacterial Genetic Structures Carrying Antibiotic Resistance Determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 2440–2441. [[CrossRef](#)]
79. Palmieri, C.; Magi, G.; Mingoaia, M.; Bagnarelli, P.; Ripa, S.; Varaldo, P.E.; Facinelli, B. Characterization of a *Streptococcus suis* tet(O/W/32/O)-Carrying Element Transferable to Major Streptococcal Pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 4697–4702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Chander, Y.; Oliveira, S.R.; Goyal, S.M. Identification of the tet(B) Resistance Gene in *Streptococcus suis*. *Vet. J.* **2011**, *189*, 359–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Zhang, C.; Zhang, P.; Wang, Y.; Fu, L.; Liu, L.; Xu, D.; Hou, Y.; Li, Y.; Fu, M.; Wang, X.; et al. Capsular Serotypes, Antimicrobial Susceptibility, and the Presence of Transferable Oxazolidinone Resistance Genes in *Streptococcus suis* Isolated from Healthy Pigs in China. *Vet. Microbiol.* **2020**, *247*, 108750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Ma, Y.L.; Lu, C.P. Isolation and Identification of a Bacteriophage Capable of Infecting *Streptococcus suis* Type 2 Strains. *Vet. Microbiol.* **2008**, *132*, 340–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Klausen, M.; Gjermansen, M.; Kreft, J.-U.; Tolker-Nielsen, T. Dynamics of Development and Dispersal in Sessile Microbial Communities: Examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* Model Biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *261*, 1–11. [[CrossRef](#)]
84. Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* **1999**, *284*, 1318–1322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Grenier, D.; Grignon, L.; Gottschalk, M. Characterisation of Biofilm Formation by a *Streptococcus suis* Meningitis Isolate. *Vet. J.* **2009**, *179*, 292–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

86. Wang, Y.; Wang, Y.; Sun, L.; Grenier, D.; Yi, L. *Streptococcus suis* Biofilm: Regulation, Drug-Resistance Mechanisms, and Disinfection Strategies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 9121–9129. [[CrossRef](#)]
87. Wang, Y.; Liu, B.; Li, J.; Gong, S.; Dong, X.; Mao, C.; Yi, L. LuxS/AI-2 System Is Involved in Fluoroquinolones Susceptibility in *Streptococcus suis* through Overexpression of Efflux Pump SatAB. *Vet. Microbiol.* **2019**, *233*, 154–158. [[CrossRef](#)]
88. Wang, Y.; Gong, S.; Dong, X.; Li, J.; Grenier, D.; Yi, L. In Vitro Mixed Biofilm of *Streptococcus suis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* Impacts Antibiotic Susceptibility and Modulates Virulence Factor Gene Expression. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 507. [[CrossRef](#)]
89. Liu, B.; Yi, L.; Li, J.; Wang, Y.; Mao, C.; Wang, Y. Autoinducer-2 Influences Tetracycline Resistance in *Streptococcus suis* by Regulating the *tet(M)* Gene via Transposon Tn916. *Res. Vet. Sci.* **2020**, *128*, 269–274. [[CrossRef](#)]
90. Waack, U.; Nicholson, T.L. Subinhibitory Concentrations of Amoxicillin, Lincomycin, and Oxytetracycline Commonly Used to Treat Swine Increase *Streptococcus suis* Biofilm Formation. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

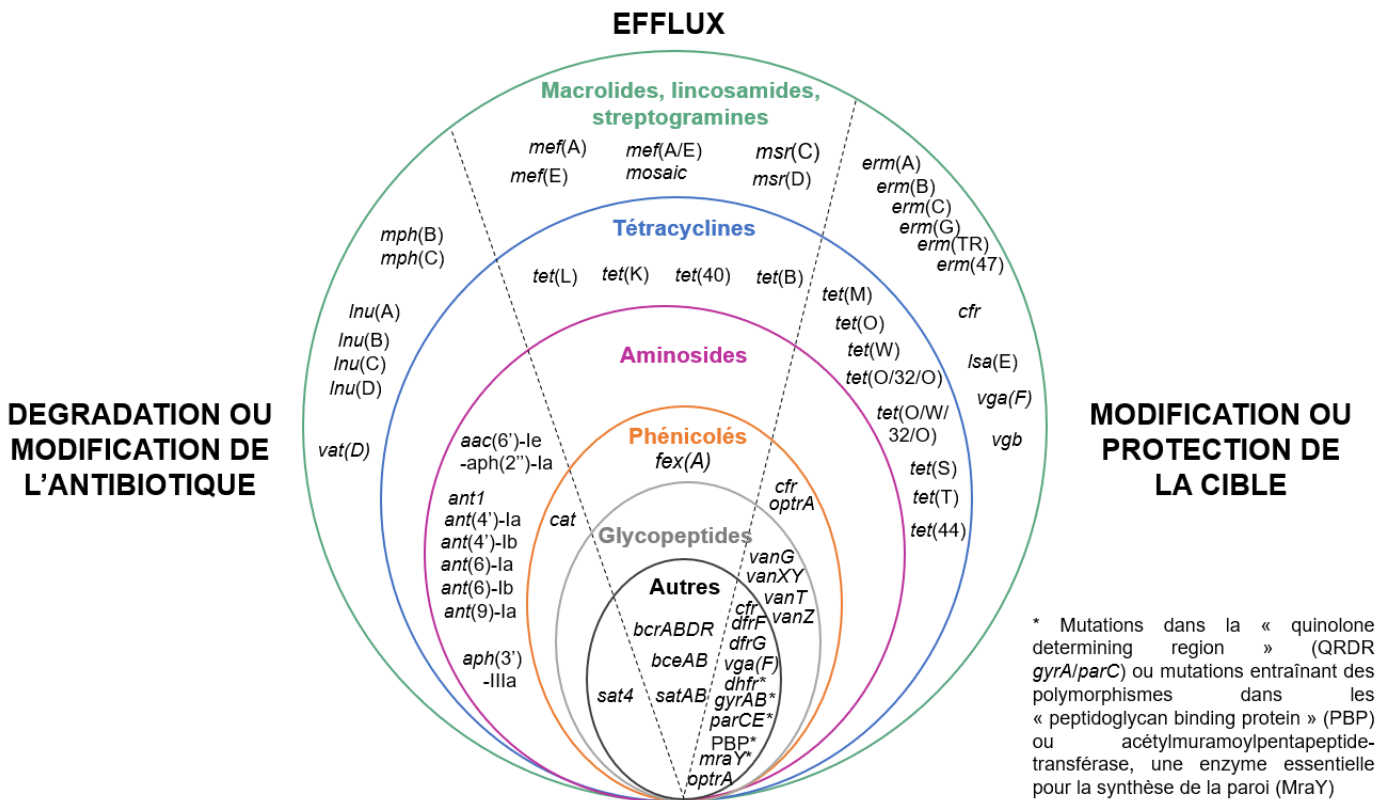


Figure 20 : Gènes de résistance décrits chez *S. suis*. Les différents gènes conférant une résistance aux antibiotiques sont classés de deux manières : (i) selon leur mécanisme de résistance (à gauche : dégradation ou modification de l'antibiotique cible ; au milieu : mécanismes d'efflux ; et à droite : protection ou modification de la cible, séparés par une ligne pointillée) et (ii) selon la famille d'antibiotiques qu'ils ciblent (cercles de différentes couleurs : vert pour les macrolides/lincosamides, bleu pour les tracyclines, rose pour les aminoglycosides, orange pour les amphénicolés, gris pour les glycopeptides, noir pour les autres familles). * Mutations dans la « quinolone determining region » (QRDR *gyrA/parC*) ou mutations entraînant des polymorphismes dans les « peptidoglycan binding protein » (PBP) ou acétylmuramoylpentapeptide-transférase, une enzyme essentielle pour la synthèse de la paroi (MraY). S. Payot com. pers.

v. Mise à jour des connaissances depuis la publication de cette revue (2021)

Depuis la rédaction de cette revue, plusieurs articles scientifiques sur la résistance aux antibiotiques chez *S. suis* ont été publiés (Hu et al., 2020, C. Zhang et al., 2022, Uruén et al., 2022, C.-Z. Wang et al., 2023). Concernant tout d'abord la prévalence de la résistance aux antibiotiques chez *S. suis* selon les différentes régions du monde, cette résistance est variable en fonction de la région du monde concernée et des antibiotiques étudiés (Uruén et al., 2022).

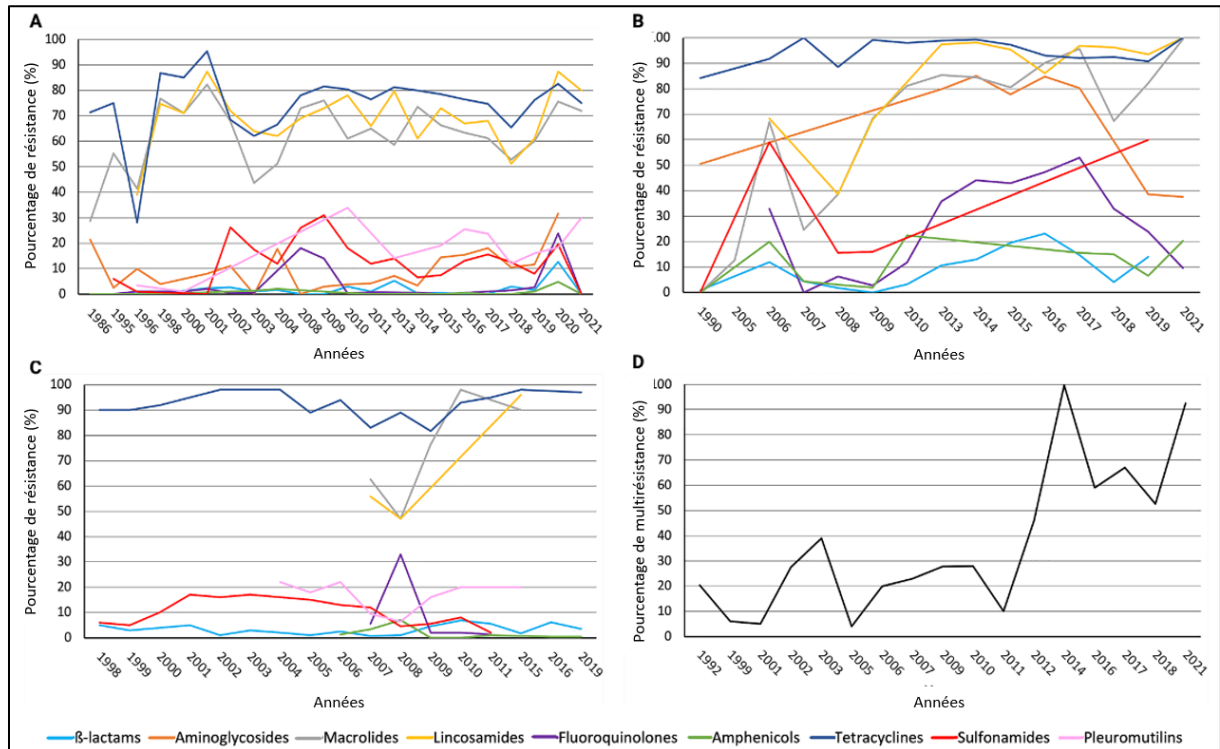


Figure 21 : Évolution de la résistance à différentes familles d'antibiotiques mesurée chez *S. suis* en A Europe, B Asie et C Amérique (Amérique du Nord et du Sud). En D le pourcentage de multirésistance enregistré dans le monde. D'après Uruén et al., 2022.

Intéressons-nous aux trois premières familles d'antibiotiques principalement touchées par la résistance aux antibiotiques. En Europe, le taux de résistance à la tétracycline reste en dessous des 80% (figure 21A) avec en Suède un taux de résistance supérieur à cette moyenne (85,1% des souches testées, n=94) isolées en 2018-2019. Les derniers chiffres de résistance semblent être en hausse en Asie et atteignent 100% (n=96) de souches résistantes en 2023 (figure 21B) en Chine (C.-Z. Wang et al., 2023). En Amérique, les taux de résistances à la tétracycline sont constants (figure 21C) avec 97% (n=103) de souches résistantes testées en 2022 aux Etats-Unis (Nicholson & Bayles, 2022). Pour ce qui est de la résistance au macrolides-

lincosamides, les différents taux de résistance présentés dans la figure 21 sont très proches de ceux enregistrés pour la tétracycline en fonctions des différentes régions. Le taux de résistance pour les USA est de 72% (n=76) (Nicholson and Bayles 2022), contre 91,7% (n=96) pour l'érythromycine et 96,9% pour la lincomycine en Chine (C.-Z. Wang et al., 2023).

En ce qui concerne les gènes de résistance aux aminosides, les gènes suivants ont été décrits chez *S. suis* (Figure 20) : (1) des variants de ANT(6)-Ia, *aadE1* et *aadE2* (82% et 66% d'identité nucléotidique avec ANT(6)-Ia respectivement) (Hadjirin et al., 2021), (2) un variant de ANT(9)-Ia, *aad9* (qui présente 59% d'identité nucléotidique avec le déterminant de résistance habituellement retrouvé chez *S. suis*) (Nicholson & Bayles, 2022), (3) le gène *aadD1/ANT(4')-Ib* (Hadjirin et al., 2021, Nicholson & Bayles, 2022), gène qui pourrait être porté par un plasmide et (4) le gène *antI/ANT(3'')-Ia*, qui code une adényltransferase/O-nucléotidyltransférase capable de modifier la streptomycine mais aussi la spectinomycine en position 3' (Hadjirin et al., 2021).

Des variants de gènes de résistance conférant une résistance aux macrolides-lincosamides/streptogramines ont été détectés chez *S. suis* : *erm(A)*, (X. Wang et al., 2023, Q. Yang et al., 2023), *erm(47)* (Nicholson & Bayles, 2022) *erm(G)* (Hadjirin et al., 2021) et *erm(T)* (Hu et al., 2020, R. Yu et al., 2022). Le gène *erm(T)* est localisé soit sur un plasmide, soit sur un élément intégratif conjugatif (ICE) (R. Yu et al., 2022). De plus, plusieurs nouveaux gènes ont été mis en évidence. Les gènes de résistance *lnu(A)* et *lnu(D)* qui codent pour une nucléotidyltransférase conférant une résistance aux lincosamides ont été détectés dans des souches américaines (Schwarz et al., 2016, Nicholson & Bayles, 2022). Une analyse détaillée du contexte génétique de ces gènes suggère qu'ils sont localisés sur des éléments génétiques mobiles chromosomiques. Le gène *vga(F)/srpA* codant une protéine ABC-F et donc conférant une protection du ribosome a également été retrouvé chez des souches de *S. suis* (Hadjirin et al., 2021, C. Zhang et al., 2022). Ce gène confère une résistance aux pleuromutilines mais aussi aux lincosamides. Les gènes de résistance *vgb* et *vat(D)* ont aussi été identifiés, dans 3 souches de *S. suis* (Nicholson & Bayles, 2022). Ces gènes confèrent une résistance contre, respectivement, la virginiamycine et les streptogramines A. Ces deux gènes sont potentiellement portés par un phage.

Deux variants de gènes conférant une résistance à la tétracycline, *tet(44)* et *tet(T)*, ont également été décrits (Hadjirin et al., 2021, Nicholson & Bayles, 2022). Ils codent tous deux pour une protéine de protection du ribosome (Levy et al., 1999, Abril et al., 2010). Les gènes

tet(32) et *tetA(P)*, codant, respectivement, pour une protection du ribosome et une pompe d'efflux (Roberts, 2005), ont été rapportés (non vérifiés car les données génomiques ne sont pas accessibles) (X. Wang et al., 2023).

Par ailleurs, deux gènes de résistance au triméthoprime, *dfrF* et *dfrK*, présents sur des plasmides, ont également été rapportés (Hadjirin et al., 2021, P. Liang et al., 2021).

Enfin, des mutations ont été décrites dans le gène *mraY* qui code une acétylmuramoylpentapeptide-transférase, une enzyme essentielle pour la synthèse de la paroi (Hadjirin et al., 2021).

III. Biofilms et résistance aux antibiotiques

i. Composition d'un biofilm

Dans l'environnement, les bactéries sont présentes sous deux formes, planctonique ou sessile. Lors de ce dernier mode de vie, elles peuvent se développer en biofilm (en consortium de bactéries, rassemblé au sein d'une matrice structurée accrochée à une surface). Cette forme de vie a été abordée succinctement dans la revue publiée en 2021 (Dechêne-Tempier et al., 2021). La formation de biofilm confère aux communautés bactériennes colonisant ces surfaces une protection contre les antibiotiques et le système immunitaire mais assure également une augmentation du transfert de gènes au sein de cette communauté.

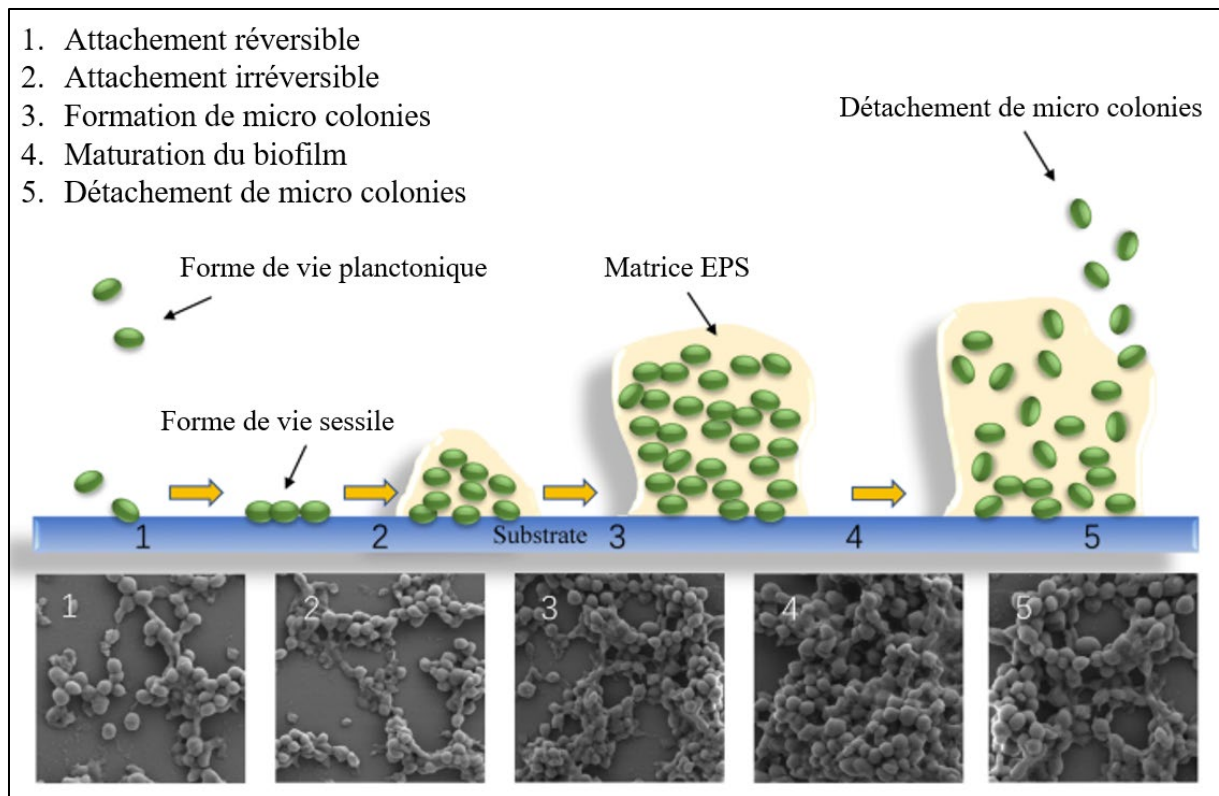


Figure 22 : Etapes de formation du biofilm. D'après Yi et al., 2020.

ii. Rôle du biofilm dans la résistance aux antibiotiques

L'organisation spatiale du biofilm ainsi que la répartition de sa biomasse induit la présence d'un gradient de concentrations au sein du biofilm (Figure 22). L'oxygène et les nutriments sont plus abondants au niveau des couches superficielles alors que le cœur de biofilm lui présente un milieu appauvri avec une accumulation de déchets métaboliques. Ces conditions particulières d'appauvrissement sont connues pour entraîner la libération de l'alarmone (p)ppGpp dans le milieu ce qui induit une réduction du métabolisme des bactéries et leur entrée en état de quiescence (T. Zhang et al., 2020). Chez *S. suis*, il a été montré que l'alarmone est synthétisée par une seule protéine, Rel_{ss}, qui transfère un groupement pyrophosphate de l'adénosine triphosphate (ATP) à la guanosine diphosphate ou triphosphate (GDP ou GTP respectivement) (T. Zhang et al., 2020). La présence de l'alarmone (p)ppGpp est capable d'induire la surexpression du gène *pdh* responsable de l'activité pyruvate déshydrogénase. Cette activité enzymatique est impliquée dans la réponse aux stress et la formation de biofilm mais également l'adhésion et l'invasion de tissus épithéliaux ce qui participe à la pathogénèse chez *S. suis*.

De plus, cette entrée en état de quiescence induit par la libération de (p)ppGpp participe à la résistance aux antibiotiques. En effet, le ralentissement voire l'absence de métabolisme des bactéries les rend insensibles à certaines molécules antibiotiques (Uruén et al., 2020, T. Zhang et al., 2020). Le manque de nutriment induit la réponse stringence et réduit ainsi la synthèse d'ARN ce qui lui-même participe à la résistance aux antibiotiques qui ciblent la transcription (Uruén et al., 2020). La présence d'ADN extracellulaire joue également un rôle dans la régulation du développement des biofilms. En effet, de par sa composition chimique, l'ADN est anionique et peut chélater des cations (Yi et al., 2020). Ces molécules cationiques peuvent être des peptides antimicrobiens ou encore les lipopolysaccharides ou des composés de la membrane externe d'autres bactéries pouvant représenter une menace (Yi et al., 2020).

En plus des propriétés intrinsèques du biofilm, il semble que la mixité des espèces au sein du biofilm joue un rôle important. Gao et ses collaborateurs ont montré qu'un biofilm formé par *Hamophilus parasus* (une bactérie pathogène du porc) et *S. suis* présentait une structure plus épaisse et plus résistante aux antibiotiques que les biofilms formés à partir d'une seule de ces deux espèces bactériennes (Gao et al., 2023). En plus de cette mixité, l'utilisation d'antimicrobien en concentration sub-inhibitrice dans les élevages sur une longue période favorise la formation de biofilm chez *S. suis*. En effet, Dong et col. proposent que l'utilisation de norfloxacine, de doxycycline ou encore de gentamicine induit une augmentation de la capacité des souches exposées à former un biofilm (Dong et al., 2023, Yi et al., 2020). Cette observation rejoint les travaux de Guo et col. qui avaient démontré que, chez *S. suis*, toutes les souches ne sont pas capables de produire un biofilm. En effet, la capacité à former un biofilm a été étudiée chez environ 50 isolats cliniques et montre une forte disparité (Guo et al., 2012).

Dans notre revue publiée en 2021, le système de communication appelé quorum sensing (QS) est abordé. En effet, lorsque la concentration de molécules signal AutoInducer-2 (AI-2) atteint une certaine concentration, celle-ci est détectée et engendre une cascade de signalisation aboutissant à l'expression de gènes spécifiques (Y. Wang et al., 2018). Ces gènes peuvent être impliqués dans différents mécanismes tels que la formation de biofilms. Les travaux de Xue et col. de 2022 présentent différents inhibiteurs du QS comme des alternatives prometteuses aux traitements antibiotiques actuellement utilisés (Xue et al., 2022). Plusieurs peptides ont été testés en tant qu'inhibiteurs, c'est le cas du peptide TNRHNP HHLHHV qui inhibe la protéine LuxS en se fixant sur cette dernière (Xue et al., 2022). Cette inhibition de LuxS diminue la formation d'AI-2. On peut également citer la metformine, une molécule initialement

commercialisée pour ses activités antitumorales, anti-inflammatoires ou encore régulatrice de la flore intestinale. Zuo et col. ont démontré en 2023 l'effet de cette molécule comme inhibiteur de LuxS (Zuo et al., 2023). Le repositionnement thérapeutique de telles molécules pourrait apporter de nouveaux moyens de lutte contre l'antibiorésistance.

iii. Influence du biofilm dans le transfert de gènes

La présence d'ADN dans le milieu est connue pour stabiliser la structure du biofilm. De plus, il a été montré que le transfert de gènes portés par des plasmides, éléments intégratifs conjugatifs et transposons est augmenté au sein d'un biofilm (Yi et al., 2020). La concentration de différentes communautés bactériennes, augmente la probabilité de survenue de mutations ou de déclenchement de réponses SOS au sein de biofilm (Yi et al., 2020, Uruén et al., 2022).

La capacité de *S. suis* à former un biofilm et se développer à l'intérieur de celui-ci lui permet de survivre à différents stress mais également d'échanger du matériel génétique par transfert horizontal de gènes que nous allons aborder dans la partie suivante.

IV. Le transfert de gènes chez *Streptococcus suis*

Griffith a démontré, en 1928, qu'une souche non virulente de *Streptococcus pneumoniae*, appelée souche R (« rough », formant des colonies rugueuses) pouvait acquérir le caractère virulent d'une souche S (« smooth », formant des colonies mucoïdes) après avoir été mise en contact avec une culture S dont les cellules ont été tuées par la chaleur (2 ou 3 h à 60°C) (Figure 23) (Fred Griffith, 1928). Ce changement de phénotype a été confirmé par la croissance des streptocoques, issus du sang des animaux morts, dont l'aspect des colonies était devenu « smooth ». Ce phénomène a été qualifié par Griffith de « transformation ».

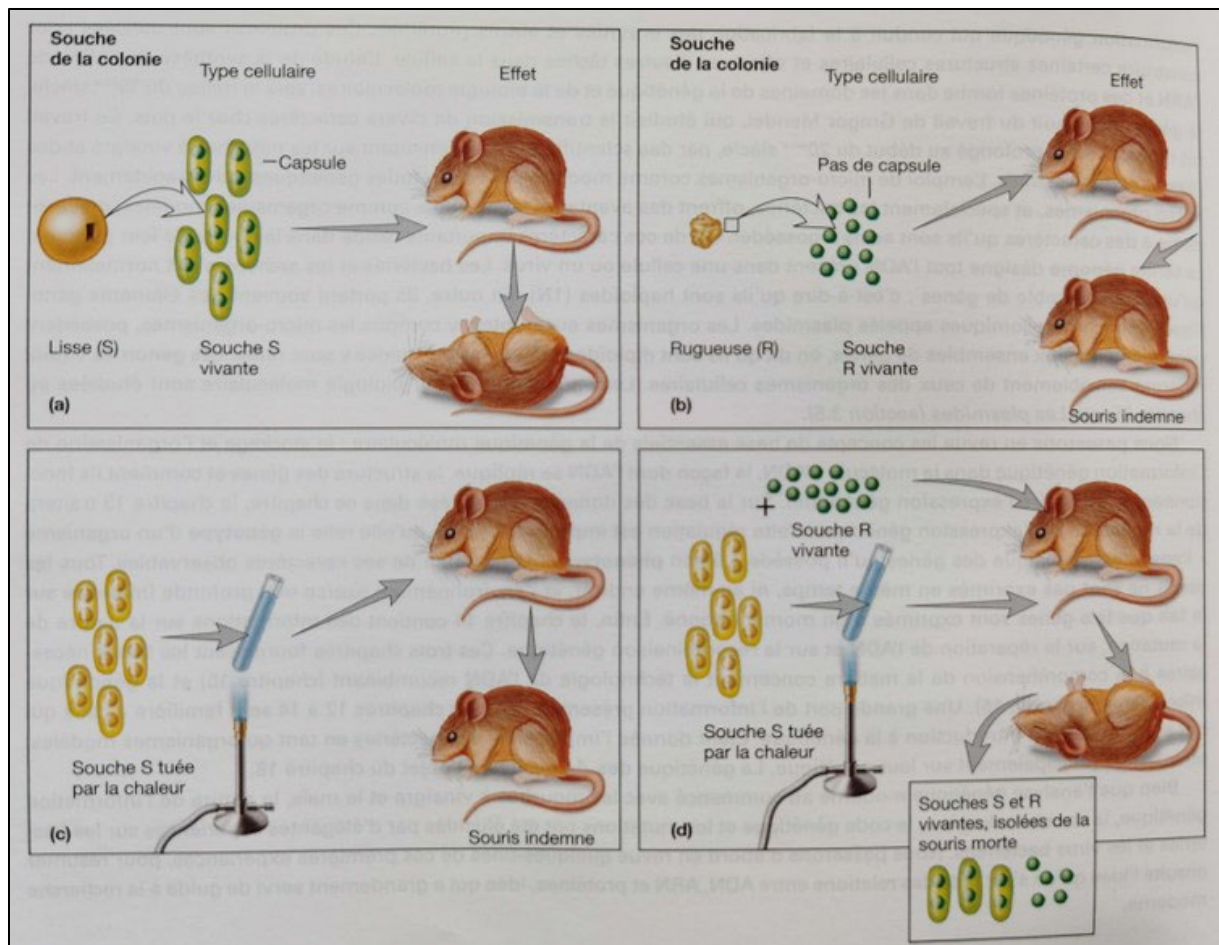


Figure 23 : Expérience de transformation bactérienne de Griffith. De gauche à droite : injection de souche S (virulente), les souris meurent ; injection de souche R (non virulente), les souris survivent ; injection de souche S tuée par la chaleur, les souris survivent ; injection d'un mélange souche R-souche S tuée par la chaleur, les souris meurent (Prescott et al., 2013).

En 1944, Avery, MacLeod et McCarty poursuivent ces travaux et identifient le support de l'information responsable du caractère virulent des souches S (Avery et al., 1944). Pour ce faire, ils ont préparé différents extraits de la souche S (virulente) qu'ils ont mélangé avec une culture de souche R, avant mise en contact avec un sérum anti-R. Si des clones S sont présents dans la culture, ils ne seront pas précipités par le sérum et pourront former des colonies « smooth » sur boîte de Petri. Après élimination des lipides et des sucres, les extraits ont été filtrés et les protéines précipitées. Malgré ces traitements, le pouvoir transformant était conservé. C'était également le cas des échantillons traités par la trypsine et une ribonucléase, ce qui leur a permis de conclure qu'il ne s'agissait ni de protéines ni d'ARN. Le seul traitement entraînant une perte de l'activité transformante consistait en l'ajout de « dépolymérase de l'acide desoxyribonucléique » (DNase). Lorsque cet extrait, traité par la DNase, était mélangé avec une culture de la souche R, il n'y avait pas de développement de colonies « smooth »

(Figure 24). Ils ont ainsi pu déterminer que le caractère virulent était porté par l'ADN et que ce dernier était donc le support de l'information génétique (Avery et al., 1944).

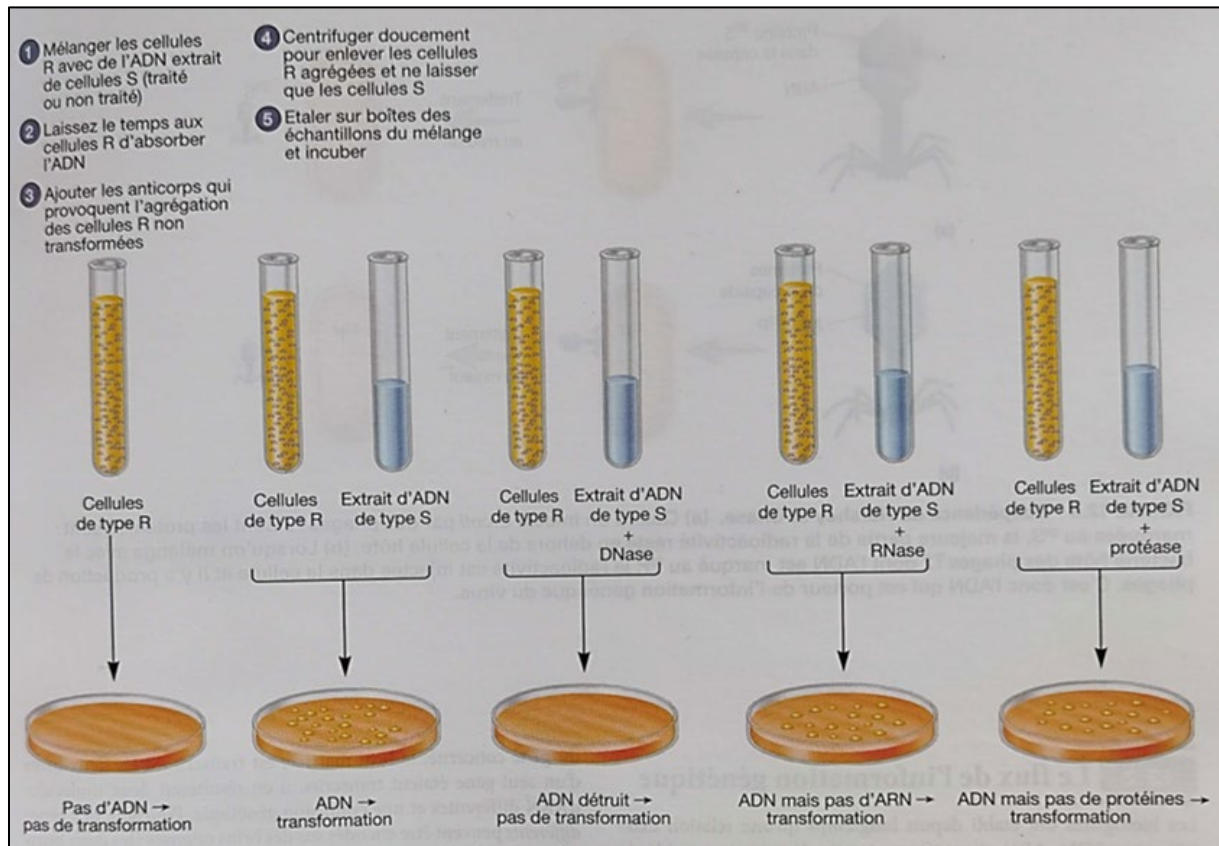


Figure 24 : Expérience d'Avery, MacLeod and McCarty. Une culture de souche S est tuée par la chaleur puis après élimination des sucres et des lipides, différents traitements sont appliqués à cet extrait cellulaire. De gauche à droite : Témoins négatif, positif, traitement : DNase, RNase, protéase, Ces différents extraits sont mélangés avec une culture de souche R. Seul le traitement DNase bloque la transformation de cellules R en cellules S. (Prescott., 2013).

Ainsi, ce fût la première démonstration d'une transmission d'information entre deux êtres vivants, sans que l'un soit le descendant de l'autre (transfert horizontal).

De nombreuses découvertes en génétique ont succédé à ces travaux. L'apparition des techniques de séquençage de l'ADN a ouvert la voie à l'étude des mécanismes d'expression de l'information génétique (gènes, opérons, régulons).

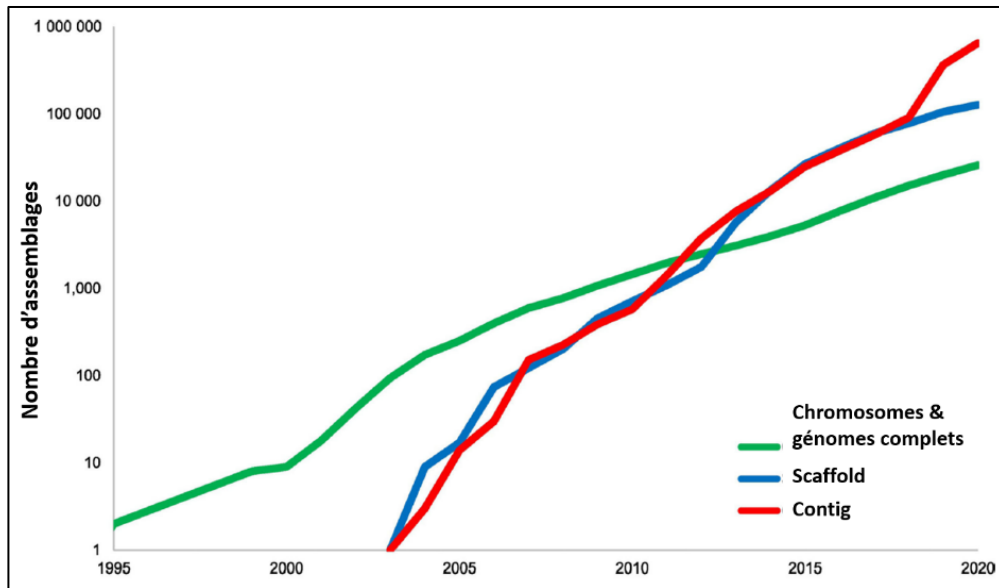


Figure 25 : Augmentation exponentielle des génomes procaryotes dans les bases de données au cours du temps. Nombre de génomes assemblés avec différents niveaux d'assemblages dans GenBank du NCBI. L'axe des X commence en 1995, l'année où les deux premiers génomes complets ont été publiés. Génomes complets : tous les chromosomes complètement assemblés avec des gaps n'excédant pas plus de 10 bases ambiguës. Chromosomes : tous les chromosomes assemblés mais pouvant contenir des gaps ou des « scaffolds » non-localisés. Contig : seuls les contigs non assemblés sont disponibles. D'après Koonin et al., 2021.

L'automatisation et l'apparition des techniques de séquençage à haut débit, associés à des analyses bio-informatiques de plus en plus sophistiquées (Figure 25), ont permis d'aborder l'étude de la totalité des gènes d'une bactérie (génomique) (Kobras et al., 2021), de l'espèce bactérienne (pangénomique) (Cummins et al., 2022) mais aussi plus largement de son écosystème (métagénomique) (Quince et al., 2017). Le développement des techniques d'études globales et sur cellule unique (« single cell ») apporte, par ailleurs, de nouvelles informations concernant la dynamique spatio-temporelle de l'évolution, de l'organisation et de l'expression des gènes au sein de la cellule bactérienne (Koonin et al., 2021, Bouwman et al., 2022). Ces nouvelles technologies laissent entrevoir la complexité des interactions des bactéries avec les autres microorganismes, ses hôtes et l'environnement et l'imbrication de tous ces processus. C'est le cas pour l'antibiorésistance puisque que l'on sait maintenant que la plupart des mécanismes de résistance aux antibiotiques sont codés par des gènes de résistance aux antibiotiques qui sont sur support génétique mobile et donc transférables à d'autres bactéries par transfert horizontal de gènes (THG) (Arnold et al., 2022). Après une présentation générale du THG, un focus sera fait sur les mécanismes les mieux caractérisés à l'origine du transfert horizontal, la façon dont ils interagissent et les barrières auxquelles il se trouvent confrontés.

i. Généralités sur le transfert horizontal

Par opposition au transfert vertical qui consiste en un transfert d'information génétique entre une cellule et sa descendance, le transfert horizontal permet l'acquisition de gènes exogènes entre une cellule dite donneuse et une cellule dite receveuse (Figure 26).

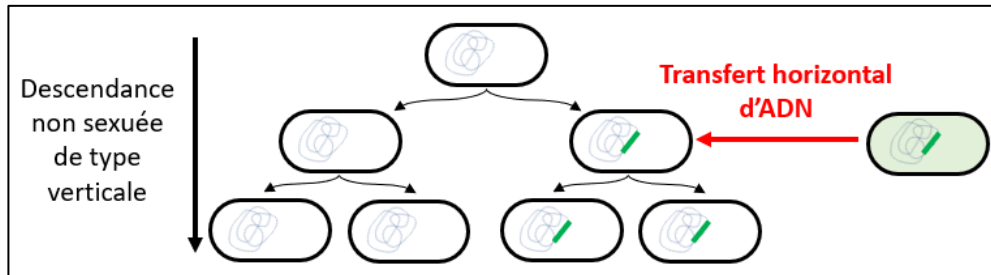


Figure 26 : Transfert vertical et horizontal de l'ADN bactérien Une bactérie mère (en haut) transmet son génome à ses deux cellules filles : transfert vertical. Une bactérie verte (à droite) transmet une partie de son génome (trait vert épais dessiné sur le chromosome) à une bactérie qui n'est pas sa descendante directe : transfert horizontal. Une fois que le fragment d'ADN vert est intégré dans le génome de la cellule réceptrice, il sera hérité par sa descendance. B. Aigle, com. pers.

L'acquisition de gènes exogènes peut se faire *via* quatre mécanismes différents : la transformation, la conjugaison, la transduction et la vésiduction. Le transfert de nouveaux gènes pouvant présenter un intérêt évolutif pour la cellule hôte (Johnson & Grossman, 2015) peut ainsi être la conséquence de processus très différents (Figure 27). L'intégration de ces fragments d'ADN peut être coûteux pour la bactérie et l'acquisition des gènes qu'ils portent peuvent se révéler inintéressant d'un point de vue évolutif. Leur maintien sur le long terme sera donc défini par un ratio bénéfice/coût (Fontaine et al., 2015). Les trois mécanismes de transfert horizontal de gène (THG) les mieux décrits sont la transformation, la conjugaison et la transduction. Des vésicules membranaires, assurant la vésiduction, décrites plus récemment, participent au THG et sont abordés dans la revue publiée lors de la 1ère année de thèse (Dechêne-Tempier et al., 2021). Dans la suite, je vais traiter succinctement la transformation et la transduction pour principalement m'intéresser au transfert de gènes par conjugaison.

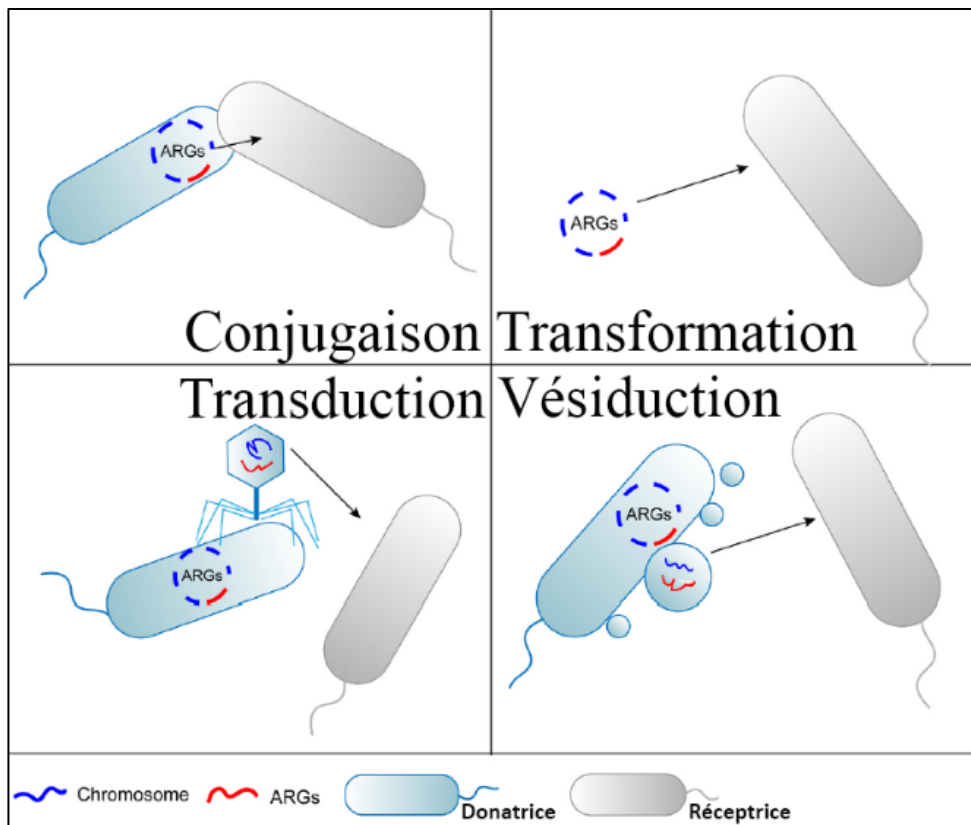


Figure 27 : Quatre voies de transfert horizontal : conjugaison (transfert de gènes d'antibiorésistance [ARG] au moyen d'un contact direct entre une cellule donatrice et une cellule réceptrice), transformation (intégration par la cellule réceptrice de gènes ARG provenant de l'environnement), transduction (les gènes ARG sont transportés de la cellule donatrice vers la cellule réceptrice au moyen d'un bactériophage) et vésiduction (la cellule donatrice sécrète des vésicules contenant les gènes ARG et ces vésicules sont transférées à la cellule réceptrice). D'après Zhu et al., 2023.

a. Transformation

La compétence est définie par deux capacités naturelles des bactéries : l'acquisition d'ADN nu de l'environnement et l'intégration dans leur génome (Figure 27). Le résultat de la compétence peut être la transformation des souches, lorsqu'il y a une modification du phénotype. La transformation a été observée initialement chez *S. pneumoniae*, comme décrit au début de cette partie et extensivement étudiée, en faisant un système modèle (Figure 28) (Johnston et al., 2014). Bien qu'elle ait été mise en évidence chez de nombreuses espèces bactériennes, son déclenchement et sa régulation n'ont pas été décryptés pour toutes les souches transformables naturellement.

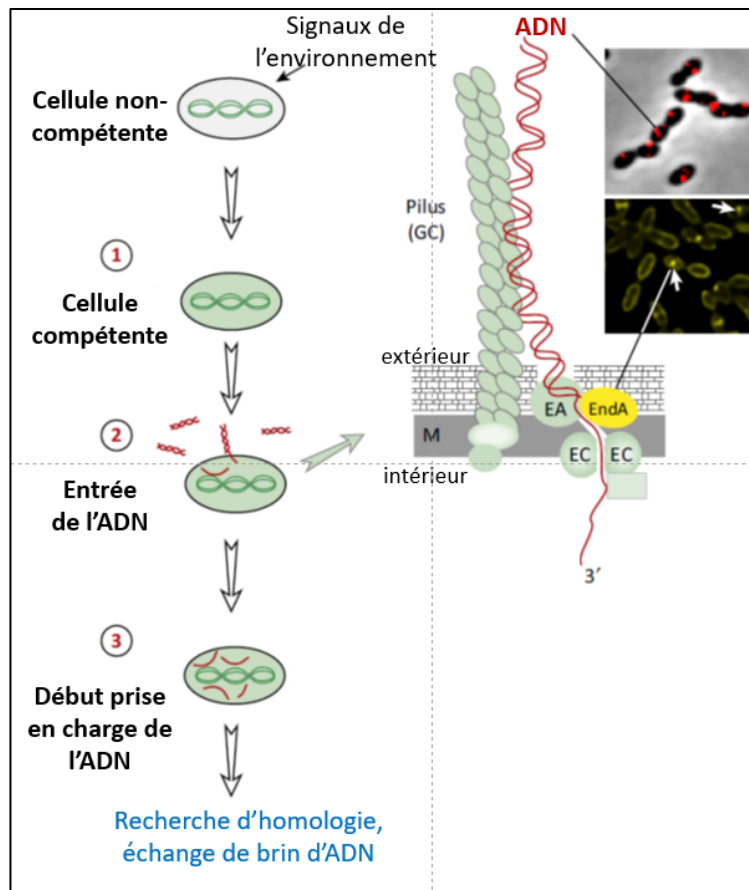


Figure 28 : Etapes initiales du processus de transformation chez *S. pneumoniae*. Des signaux de l'environnement vont déclencher la compétence naturelle dans une cellule. Une fois la cellule compétente (1), elle peut capturer l'ADNdb étranger grâce à un pilus de transformation. L'ADNdb à l'origine de la transformation est capturé au milieu des cellules (foci rouges, photo du haut), ce qui permet de penser qu'il s'agit des sites de localisation des pili. Après capture, l'ADNdb est transmis au récepteur ComEA, avant d'être transféré à la nucléase EndA (foci jaunes, photo du bas). EndA dégrade un brin de l'ADNdb capturé et l'ADNsb résultant est transféré à travers la membrane via un pore ComEC (2). Après internalisation, l'ADNsb est recouvert de nucléoprotéines (SsbB) qui le protègent et crée un réservoir d'ADNsb pour recombiner avec son génome (3). Suite à l'association avec une recombinase, il pourra y avoir échange de brins avec des séquences homologues du génome Adapté de Johnston et al., 2014

La première preuve de l'induction de la compétence de *S. suis* a été rapportée par Zaccaria et col. en 2014 (Zaccaria et al., 2014) après addition dans le milieu d'un peptide extracellulaire inducteur (XIP) du facteur sigma alternatif codé par le gène *comX*. La cascade de signalisation de transformation de *S. suis* ainsi que les facteurs environnementaux régulant ce transfert sont décrits dans notre revue de 2021 (Dechêne-Tempier et al., 2021). Depuis, des travaux ont démontré une induction de la compétence de la souche P1/7 de *S. suis* lorsqu'elle est cultivée dans du sérum porcin et humain activés (Ferrando et al., 2021). Le contact avec des sérums non-activés ou provenant de veau n'ont pas cet effet inducteur de la compétence. L'état de compétence induit par le sérum est indépendant (i) du XIP, (ii) du répresseur avec lequel il

interagit (ComR) et (iii) de ComX (facteur sigma alternatif responsable de la transcription des gènes tardifs de compétence), ce qui démontre l'existence d'une voie alternative assurant la mise en place des systèmes de capture et d'intégration de l'ADN chez *S. suis*. Il est donc envisagé par les auteurs que l'état de compétence puisse être mis en place chez l'hôte aux sites d'infection, entraînant l'intégration d'ADN étranger. Ce mécanisme pourrait contribuer à la virulence et/ou à la survie des bactéries.

Autant l'implication de la transformation bactérienne comme source de diversité génétique, (en permettant l'acquisition de nouveaux gènes et le brassage génétique au sein des populations bactériennes) est simple à appréhender autant son rôle antagoniste dans l'élimination de l'ADN étranger du génome semble plus complexe à saisir. Des modélisations *in silico* d'une population bactérienne dans des environnements stochastiques (pouvant exposer les bactéries à des stress aléatoires) a permis de tester le rôle de la compétence dans l'évolution bactérienne (Carvalho et al., 2020). Les facteurs pris en compte sont qu'un EGM intégratif peut apporter un avantage sélectif dans certaines conditions de stress tout en ayant un coût de conservation, en réduisant la croissance de son hôte. Ainsi, Croucher et col. en 2016 ont proposé que la transformation contribuerait à un « nettoyage chromosomique » en réintégrant un allèle sauvage en lieu et place d'un EGM (Croucher et al., 2016). Carvalho et col. ont montré que la transformation pourrait être une clé de la stabilité à long terme des génomes en permettant que l'acquisition des EGM intégratif soit transitoire (Croucher et al., 2016).

b. Transduction

La transduction est un mécanisme de transfert faisant intervenir des virus de bactéries (bactériophages ou phages) (Figure 27). Ils peuvent être intégrés dans le chromosome bactérien (prenant alors le nom de prophages) et sont maintenus de façon lysogène (système de transmission verticale). Lors de leur entrée en phase lytique, les prophages s'excisent du chromosome de leur hôte et des particules infectieuses vont être générées, suite à l'encapsidation du génome viral. Lors de cette étape du cycle de multiplication viral, des portions d'ADN bactérien peuvent être empaquetées dans la capsid virale et être transférées dans une autre cellule. Ce processus est appelé transduction. En 2008, Ma et Lu ont été les premiers à démontrer l'existence d'un bactériophage lytique capable d'infecter *S. suis*. Les auteurs soulignent que ce phage code une intégrase, ce qui permet d'envisager qu'il puisse être lysogène pour certaines souches (Ma & Lu, 2008b). De plus, différents travaux font état de

l'activation de prophages suite à l'exposition à la mitomycine C, un antibiotique générant des dommages sur l'ADN (Harel et al., 2003, F. Tang et al., 2013a, F. Tang et al., 2013b).

D'autres chercheurs ont mis en évidence l'impact des bactériophages dans le transfert de gènes et notamment le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques chez *S. suis*. Une synthèse en a été faite dans la revue que nous avons rédigée (Dechêne-Tempier et al., 2021). Depuis, une étude extensive des prophages présents dans 133 génomes de *S. suis* (isolés chez l'humain et le porc malade et sain) accessibles dans les bases de données a été publiée, faisant état de 91,7% des souches portant au moins un prophage (Figure 29) (Osei et al., 2022). Malgré différents degrés d'assemblage des génomes, ce sont 71 prophages complets dont les séquences ont été analysés de façon approfondie. Cette étude démontre la grande diversité des phages présents dans les génomes de *S. suis*. Pour 49,7% des gènes qu'ils portent, une fonction putative a pu leur être assignée. Un gène de résistance aux macrolides, *msr(D)* et un de résistance aux tétracyclines, *tet(O)*, sont ainsi pour la première fois, identifiés sur des prophages de *S. suis* et complètent la liste précédemment établie des 10 gènes d'antibiorésistance identifiés sur des séquences de prophages de *S. suis* (Dechêne-Tempier et al., 2021).

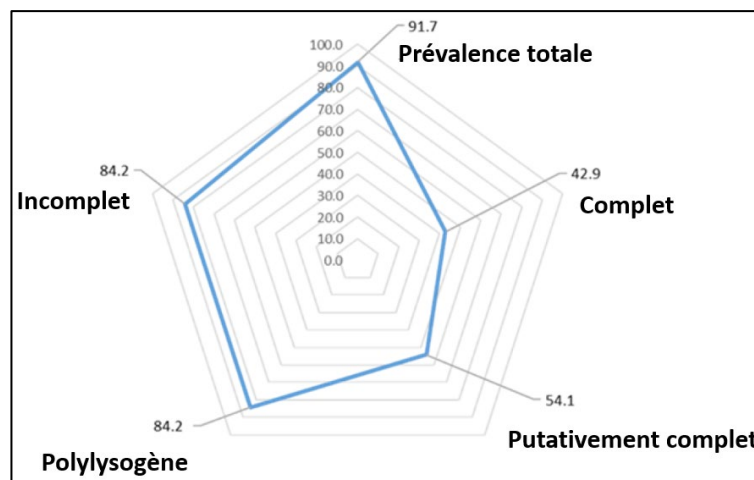


Figure 29 : Prévalence des prophages dans les génomes de *S. suis*. 91,7% des génomes portent au moins une région phagique, 84,2% des génomes sont polylysogènes (contiennent plus d'une région phagique avec une moyenne de 3,9 régions phagiques par souche), 42,9% des génomes portent au moins un prophage complet, 54,1% des génomes portent au moins un prophage putativement complet et 84% des génomes portent un prophage incomplet. Cette classification dépend du score de présence des CDS phagiques (>90, 90-70 et <70 respectivement). D'après Osei et al., 2022

L'ensemble de ces données souligne que ces EGM peuvent entraîner la dissémination des gènes d'antibiorésistance qu'ils portent.

c. Conjugaison

Le mécanisme dit de conjugaison est généralement défini par un contact direct entre une bactérie dite « donatrice » et une dite « réceptrice » (Figure 27). Ce contact se fait *via* un MPF (Mating Pore Formation system) qui fonctionne comme un système de sécrétion (système de sécrétion de type IV) ou d'un pilus (Guglielmini et al., 2013, Bellanger et al., 2014). La bactérie donatrice va alors transmettre un fragment d'ADN chromosomique ou plasmidique. L'ADNdb est pris en charge, entre autres, par une relaxase qui transforme l'ADN en molécule simple brin et assure son passage au travers du système de sécrétion vers une cellule réceptrice (Bellanger et al., 2014, Guédon et al., 2017). Hormis ce mécanisme de transfert d'ADNsb, largement répandu chez les bactéries Gram-négatives et Gram positives, il existe chez les actinobactéries un système de translocation à travers un pore constitué d'une seule protéine TraB (Thoma & Muth, 2016). Cette protéine fonctionne comme une pompe à ADNdb de type FtsK en se liant à des séquences spécifiques sur l'ADN à transférer et hydrolysant l'ATP. Ce mécanisme ne sera pas présenté davantage, car très éloigné du mécanisme de conjugaison des éléments étudiés dans cette thèse.

Suite au transfert conjugal, le devenir de l'ADNsb dans les cellules donatrices et les cellules réceptrices est dépendant du type d'EGM. Ces éléments ont une organisation modulaire, cela signifie que les gènes et séquences impliqués dans une fonction sont généralement groupés physiquement. Il existe des combinaisons plus ou moins complexes de ces modules qui définissent des familles d'éléments. Assigner un élément à une famille peut être complexe car (i) des modules différents peuvent assurer la même fonction (ii) des échanges de modules peuvent avoir lieu entre EGM et (iii) des modules peuvent être acquis ou perdus par un élément (Toussaint & Merlin, 2002) et (Burrus et al., 2002). Si l'ADN transféré est un plasmide conjugal, il portera, en plus du module de conjugaison, un module de réplication et un/des modules de maintien. Une fois sous forme circulaire double brin, il formera un réplicon extra-chromosomique et sera transmis verticalement. L'appellation d'Eléments Intégratifs Conjuguatifs (ICE) a été proposé (avec succès) pour se substituer à de multiples noms (transposon conjugal, plasmide intégratif, îlot génomique et élément non classifié). Cette catégorie d'EGM regroupe des éléments capables de s'intégrer (et s'exciser) au génome de son hôte par recombinaison et de se transférer par conjugaison (Burrus et al., 2002). Une fois l'ICE sous forme ADNdb circulaire, le système de recombinaison porté assurera son intégration au

chromosome de l'hôte receveur mais aussi sa réintégration dans le chromosome de la cellule receveuse. Ainsi, l'ICE sera transmis à la descendance des bactéries.

Les plasmides et les ICE ne sont pas les seuls EGM à pouvoir être transférés par conjugaison. Des plasmides et des Eléments Intégratifs Mobilisables (IME), bien que ne portant pas de module de conjugaison sont capables de pirater le MPF d'un élément conjugatif co-résident grâce à leur module de mobilisation (au minimum une séquence origine de transfert : *oriT*, mais plus fréquemment *oriT* + gène codant une relaxase ou *oriT*+gène de relaxase + gène codant une protéine de couplage) (Schröder & Lanka, 2005, Guédon et al., 2017) (Figure 30).

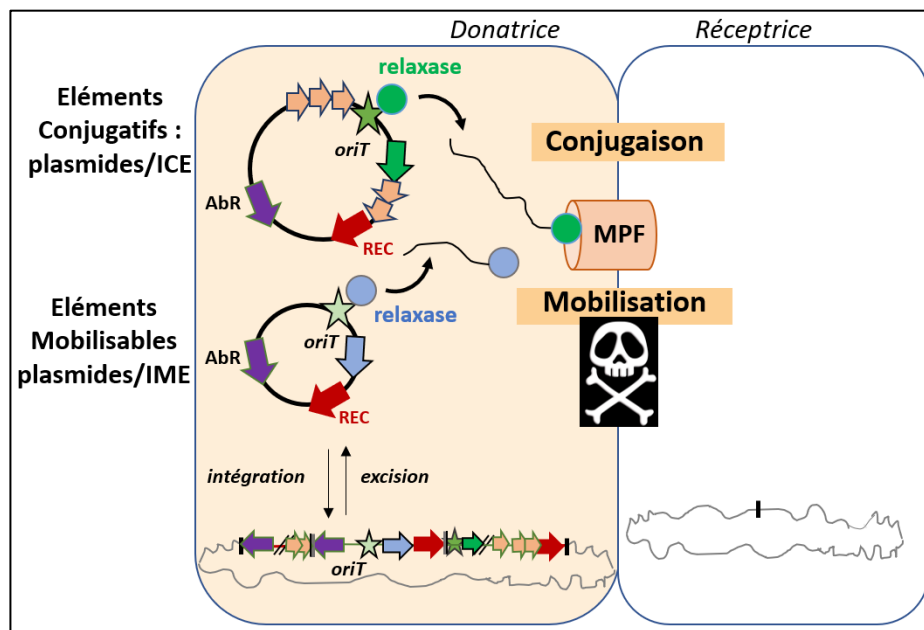


Figure 30 : EGM pouvant être transférés par conjugaison. Un MPF peut être établi entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice. Un plasmide conjugatif en plus de modules de réplication et de maintien, porte un module de conjugaison comprenant les gènes codant le MPF (flèches saumon), la relaxase (flèche verte) et séquence origine de transfert (*oriT* : étoile verte). La relaxase (rond vert) reconnaît spécifiquement la séquence *oriT*, y introduit une coupure à un site spécifique appelé *nic* (clivage simple brin) et s'y associe de façon covalente pour passer à travers le MPF. Un ICE porte, en plus, un module de recombinaison (flèche rouge) qui lui permet de s'exciser et s'intégrer dans le chromosome de son hôte (trait gris). Ces éléments peuvent porter des gènes cargos comme des gènes de résistance aux antibiotiques (flèche violette). Les éléments mobilisables plasmides et IME ne portent pas de module de conjugaison mais possèdent un module de mobilisation qui permet à leur ADN de pirater un MPF (tête de mort) déjà formé. Ils possèdent également des gènes cargos qui les rendent acteurs de la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. V. Libante com. pers.

Le rôle joué par les éléments intégratifs transférés par conjugaison dans l'échange de gènes, et notamment le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques, chez *S. suis* a été mis en évidence dans de nombreux travaux. Une synthèse en a été faite dans la revue que nous avons rédigée (Dechêne-Tempier et al., 2021) et un complément sera apporté plus loin dans le paragraphe V.vi.

Aucun plasmide conjugatif ou mobilisable, porteur de gènes de résistance aux antibiotiques n'a été formellement rapporté chez *S. suis*. En effet, il reste possible qu'un plasmide soit porteur du gène *erm*(T) à moins qu'il ne soit sur un ICE (R. Yu et al., 2022). Cependant, d'autres éléments moins conventionnels porteurs de gènes d'antibiorésistance ont été décrits. Certains de ces éléments sont susceptibles d'adopter une forme circulaire et ce, en absence de module de recombinaison. Ils peuvent être transférés par conjugaison comme une fonction accessoire d'un ICE. La description d'une structure circulaire non-conventionnelle (UCS : Unconventional circularizable structure), identifiée chez *S. suis* a été faite suite aux travaux de Palmieri et col. (Palmieri et al., 2012, 2013). Les UCS ne codent pas de recombinaison, mais sont bordés par des répétitions directes (DR : « direct repeat ») 100 fois plus longues que des DR cibles de recombinaisons spécifiques de site et leur excision/intégration est indépendante de *recA*. L'élément exploiterait des fonctions de l'hôte qui pourraient agir *en trans*. L'UCS 15K de *S. suis* porte de multiples gènes de résistance *tet*(O/W/32/O), *tet*(40), *erm*(B), *ant*(6)-Ia et *aph*(3'')-IIIa et est transférée comme une région cargo vers différentes espèces de streptocoques par l'ICE ICE*Ssu*32457 qui s'intègre à l'extrémité 3' du gène *rplL* (Palmieri et al., 2012). Chez une souche de *S. suis*, un gène *lsa*(E), au sein d'un cluster de gènes de résistance à différents antibiotiques (MDR) est intégré dans un ICE et peut adopter seul une forme circulaire extra-chromosomique et constitue une UCS (M. Yang et al., 2020). La production de bactériocines par la souche hôte n'a pas permis aux auteurs de l'utiliser comme donatrice et de tester la mobilisation de cet élément.

Un second type d'éléments circulaires extra-chromosomiques sont les unités translocables (TU : « Translocable Units »). Ce sont des séquences d'ADN délimitées par la présence de séquences d'insertion (IS) dans la même orientation. La formation d'une molécule d'ADN circulaire est due à la recombinaison entre les deux copies d'IS. Après excision, le chromosome et la TU portent chacun une copie d'IS rendant possible sa réintégration au chromosome (Figure 31).

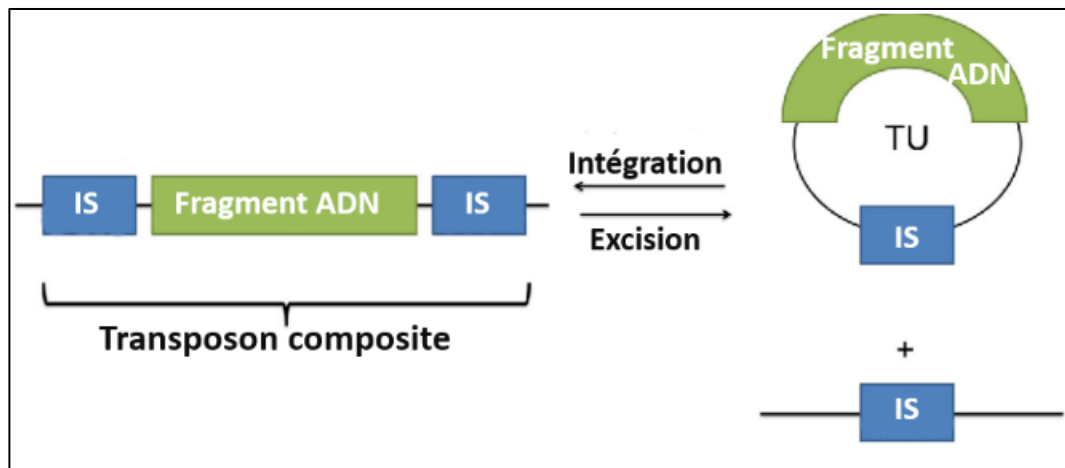


Figure 31 : Structure des transposons composites et des unités translocables (TU). Le transposon composite est un fragment d'ADN flanqué de deux séquences d'insertions (IS) en répétition directe. Le TU se circularise, suite à son excision du transposon composite. Le TU et le chromosome de l'hôte portent chacun une copie d'IS. D'après Tansirichaiya et al., 2016

Chez une souche de *S. suis*, deux copies identiques d'*IS1216E*, délimitent une région de 10kb qui contient les gènes de résistance *optrA*, *fexA*, *spc* and *erm(A)*. Cette TU est capable de s'exciser et a été identifiée chez différentes espèces (Q. Yang et al., 2023). Elle ne se transfère pas seule mais comme une partie d'ICESg5301 (ICE identifié simultanément chez *S. suis* et *Streptococcus gallolyticus*) qui s'insère à l'extrémité du gène *rplL* chez les réceptrices.

ii. Barrières au transfert horizontal et interactions entre EGM

Les mécanismes à l'origine du transfert horizontal se heurtent à différents types de barrières. Le premier frein est lié au mécanisme de transfert mis en jeu. La conjugaison nécessite une proximité physique entre cellules donatrice et réceptrice suffisante pour que le système MPF puisse s'établir. La transformation est tributaire de la stabilité de l'ADN dans l'environnement. La transduction, en raison de la résistance de la capsid phagique, permet quant à elle des transferts longue-distance mais la quantité d'ADN transférée est limitée par la taille de la capsid (Popa & Dagan, 2011).

Concernant les barrières cellulaires contre les EGM, le plus simple est d'empêcher leur entrée (Isaev et al., 2021). La plupart des bactéries sont capables de sécréter des polymères de haut poids moléculaire et se structurer en communauté incluses dans une matrice extracellulaire, rendant leurs membranes moins accessibles aux phages et à la formation de

MPF. La modification du récepteur cellulaire utilisé pour l'adsorption d'un phage le rendra incapable de pénétrer dans les cellules.

Les bactéries peuvent héberger de multiples EGM appartenant à différentes catégories qui peuvent interagir des façon synergique ou antagoniste (Horne et al., 2023). La figure 32, ci-après, illustre ces différents processus qui vont être décrits succinctement. Des éléments intégratifs et des plasmides ou des prophages peuvent former des éléments composites, en s'emboîtant les uns dans les autres (« matriochkas ») ou en s'intégrant en tandem au même site d'insertion. Ainsi, un élément peut acquérir de nouvelles fonctions ou gènes avantageux provenant d'un autre EGM, favorisant son transfert (Figure 32a). Une fois dans la cellule réceptrice chaque élément peut se dissocier diminuant le coût pour l'hôte si tous ne sont pas conservés (Figure 32b). Un élément intégratif dans un plasmide peut bénéficier de copies multiples grâce au système de réplication, qui augmente le dosage des produits de gènes avantageux pour l'hôte (Figure 32c). Une même cellule peut contenir de multiples plasmides entraînant des interactions multiples et complexes. Cela va de l'incompatibilité des machineries de réplication et du maintien, entraînant une épistasie (un seul sera maintenu chez l'hôte), à une combinaison coût/avantage sélectif favorable à la coexistence de différents plasmides comme le montre la prévalence de ces éléments dans les cellules (Figure 32d). Un élément conjugatif peut entraîner la mobilisation d'éléments porteurs d'un module de mobilisation (*mob*) ou d'une origine de transfert (*oriT*) qui bénéficie du MPF formé avec la cellule réceptrice (Figure 32e). Des plasmides peuvent interagir physiquement et former des plasmides mosaïques en fusionnant. Ainsi de nouveaux éléments sont générés avec de nouvelles propriétés qui pourront assurer leur succès évolutif (Figure 32f). La transduction phagique peut favoriser la dissémination de plasmides, d'éléments intégratifs ou des PICI (îlots génomiques inducibles par les phages) qui utilisent leur capsid (Figure 32g). Les associations de modules font que les phages-plasmides, épisomes réplicatifs codant une capsid, pouvant alterner entre un mode de maintien plasmidique ou phagique (Shan et al., 2023) ont une plasticité génomique importante (Figure 32h). A la reprise d'un cycle lytique, un prophage peut se répliquer et encapsider des séquences chromosomiques adjacentes (Figure 32i). Des antagonismes forts peuvent se mettre en place entre éléments. Des séquences satellites (épisomes parasites des phages) et les PICI, en plus d'entrer en compétition avec le génome viral lors de l'encapsidation, ont un avantage sélectif par rapport aux phages car ils ne vont pas tuer leur nouvel hôte après infection (Figure 32j). Certains EGM codent des systèmes de défense face à l'entrée d'ADN étranger dans les

cellules qui les hébergent (Isaev et al., 2021) : systèmes BREX (exclusion des bactériophages), systèmes de restriction/modification, systèmes CRISPR-Cas (« clustered regularly interspaced repeats and CRISPR-associated protein ») (Figure 32k), modification du niveau d'expression du récepteur phagique (Figure 32l), mort cellulaire induite par un système poison-antipoison bloquant la dissémination des EGM (Figure 32m), changement de capsule rendant la cellule réceptrice moins sensible aux phages et à la conjugaison (Figure 32n). Ces mécanismes vont participer à la compétition entre EGM. Il existe également des collaborations entre EGM, contre d'autres EGM : un PICI a été démontré comme possédant un système de défense contre les phages rivaux de son phage auxiliaire dont ce dernier tire partie (Figure 32o). L'impact d'un EGM sur un autre EGM peut aussi se mettre en place de façon intercellulaire avec un effet sur un troisième EGM. La présence d'un phage modifie la structure d'un biofilm mixte *Vibrio / Pseudomonas*, ce qui entraîne l'excision d'un IME qui est perdu. Cet IME étant intégré dans un ICE, il y a un effet direct sur l'ICE (Figure 32p).

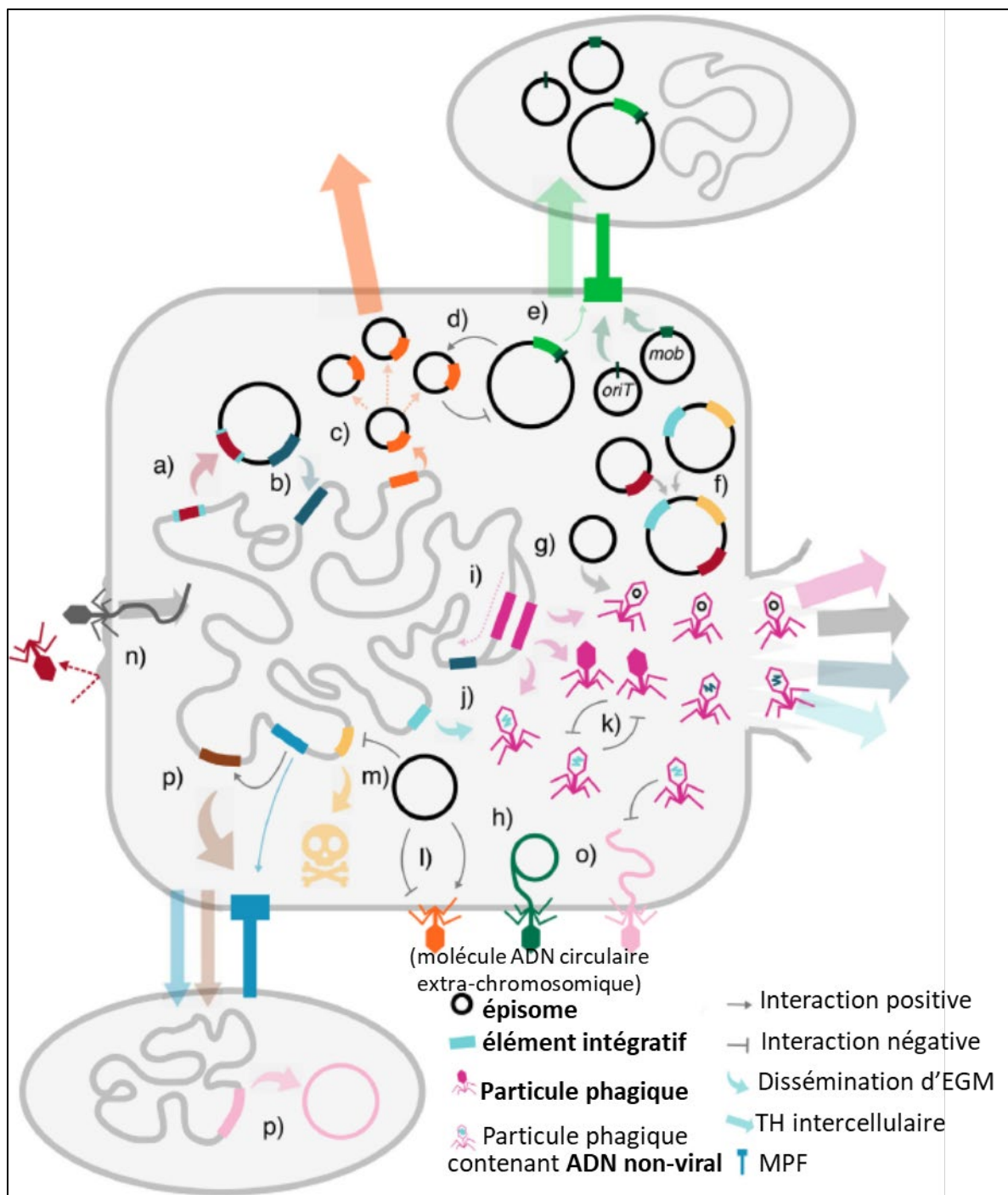


Figure 32 : Diversité des interactions entre EGM. D'après Horne et al., 2023. Voir texte précédent pour la description.

Les mécanismes de transfert horizontal et les interactions entre EGM ont un impact direct sur la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. Dans la suite de cette revue de la bibliographie un focus sera fait sur les éléments intégratifs qui sont transférés par conjugaison.

V. Éléments intégratifs transférables par conjugaison

i. Généralités sur les ICE et les IME

La conjugaison est un mécanisme de transfert d'ADN suite au contact direct entre une bactérie donatrice et une réceptrice (Lederberg & Tatum, 1946). Certains EGM sont capables de se transférer de façon horizontale par conjugaison et portent un module de recombinaison qui leur permet de s'insérer dans un réplicon bactérien. Cette intégration leur permet d'être transmis de façon verticale mais également de ne pas être dépendant de fonctions de ségrégation lors de la division cellulaire contrairement aux plasmides. Cet état intégré s'accompagne vraisemblablement d'une réduction du coût pour la cellule hôte et leur permet d'être conservé dans sa descendance (Botelho & Schulenburg, 2021). Ces éléments intégratifs ont été classés en ICE : Eléments Intégratifs Conjugatif (Bellanger et al., 2014) et IME : Eléments Intégratifs Mobilisables (Guédon et al., 2017) en fonction des modules qu'ils portent (Figure 33).

Les caractéristiques du transfert conjugal des ICE et des IME ont été brièvement présentées dans la sous-partie « conjugaison » de la partie IV (page 67) mais voir plus en détail leurs structures permet de mieux comprendre leurs caractéristiques. Les ICE et les IME sont présents sur le chromosome, délimités par des séquences d'attachement gauche et droite (*attL* et *attR*, respectivement) qui contiennent des séquences répétées directes ou inversées (Figure 33 partie inférieure). Ces séquences sont reconnues par des recombinases (intégrase à tyrosine, recombinase à sérine ou transposase à motif DDE). Ces enzymes sont codées par les ICE et les IME et composent le module « d'intégration/excision ». L'élément excisé va alors se circulariser suite à un événement de recombinaison spécifique des sites d'attachement (*att*) avec la formation d'un site *attI* sur la forme circulaire nouvellement formée. Au niveau du chromosome va alors se former un site *attB* témoignant de la disparition de l'élément comme représenté figure 33 (partie supérieure) (Bellanger et al., 2014). Parfois en plus de la recombinase, le module comprend également un RDF pour « recombination directionality factor », ce facteur va comme son nom l'indique favoriser l'excision de l'élément par la recombinase et est généralement associé à une recombinase à tyrosine (Johnson & Grossman, 2015, Guédon et al., 2017).

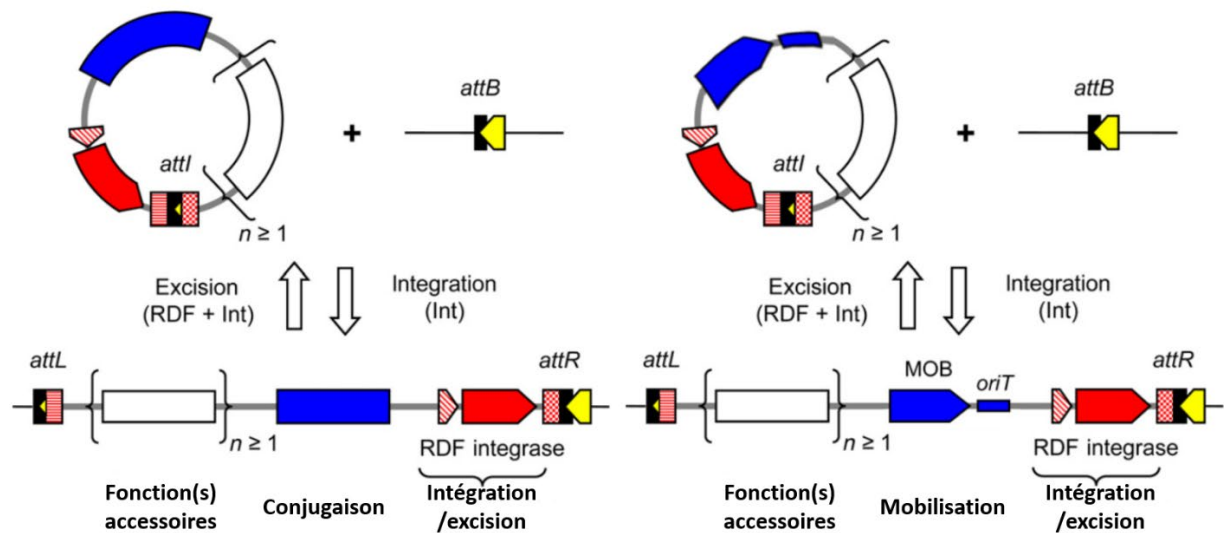


Figure 33 Excision/intégration d'un ICE (à gauche) et d'un IME (à droite). Les éléments sont délimités par des sites d'attachements gauche (*attL*) et droit (*attR*). Les traits fins représentent le génome de l'hôte, les traits plus épais l'élément et les traits verticaux très épais les séquences répétées flanquantes de l'élément. Le rectangle blanc correspond à une ou plusieurs fonctions accessoires (résistances aux antibiotiques, pathogénicité, maintien...), le rectangle bleu au module de conjugaison pour un ICE (MFP, relaxase, protéine de couplage *oriT*), le triangle bleu au module de mobilisation (pour un IME) et le rectangle rouge au module d'intégration/excision (intégrase à sérine, recombinase à tyrosine ou transposase à motif DDE et parfois un co-facteur :RDF). L'intégration et l'excision sont toutes deux catalysées par une intégrase le cofacteur, RDF (« Recombination Directionality Factor ») est impliqué fréquemment dans les réactions avec les intégrases à tyrosine et quelques fois avec les recombinases à sérine. Après excision, l'élément est sous forme circulaire et porte un site d'attachement (*attI*) et le chromosome de l'hôte un site vide d'attachement bactérien (*attB*) au niveau d'une séquence génomique conservée (triangle jaune). D'après Bellanger et al., 2014.

Le rôle des différents modules caractéristiques des ICE et des IME va être maintenant détaillé.

ii. Module de recombinaison

Le site d'intégration des ICE et IME est souvent situé à l'extrémité 3' des gènes codant des ARNt et aux extrémités 3' ou 5' de gènes codant pour des protéines dites « de ménage » (Bellanger et al., 2014). Pour les intégrases à tyrosine, l'extrémité du gène est quasiment toujours reconstituée suite à l'intégration de l'élément, ce qui n'entraîne pas de perte de fonction. En effet, il semble que la sélection naturelle a largement privilégié des sites d'insertion fortement conservés dans le génome bactérien. Toutefois, selon l'espèce hôte et la recombinase codée par le module d'intégration/excision, l'intégration est plus ou moins spécifique. Cette spécificité de site ne s'applique pas pour les éléments codant pour une transposase à motif DDE (Johnson & Grossman, 2015, Ambroset et al., 2016, Guédon et al., 2017).

Les transposases à DDE sont des enzymes capables de reconnaître un site spécifique sur un fragment d'ADN. Elles vont hydrolyser les liaisons phosphodiester des extrémités de l'EGM pour générer des groupes 3'-OH libres et lier ces groupes à une séquence d'ADN cible par une transestérification en une seule étape (Nesmelova & Hackett, 2010).

La plupart des intégrases appartiennent à l'une des deux superfamilles de recombinases, appelées recombinases à tyrosine et à sérine, selon que la catalyse est médiée par un résidu tyrosine ou sérine (Zhang et al., 2023).

Les recombinases à tyrosine anciennement appelé λ intégrase (Landy, 2015) sont divisées en deux catégories. L'une va nécessiter une protéine de liaisons à l'ADN capables de favoriser l'intégration de l'éléments comme par exemple une « RDF » (recombination directionality factors) (Figure 33 partie gauche). Cette première catégorie regroupe les complexes unidirectionnels (Zhang et al., 2023). L'autre catégorie regroupe les complexes bidirectionnels qui peuvent assurer l'intégration et l'excision de l'élément sans complexe protéique favorisant l'une des deux réactions (Zhang et al., 2023). Les tyrosine recombinases vont reconnaître les sites spécifiques *att* sur le génome bactérien. Le brin supérieur de chaque site *att* est clivé par une des deux paires d'intégrases induisant la formation d'un intermédiaire phosphotyrosine et les brins sont échangés créant une jonction d'ADN appelé jonction de Holliday, qui est ensuite transformée en produits recombinants par la paire restante d'intégrases qui clivent et échangent les brins inférieurs (Figure 34).

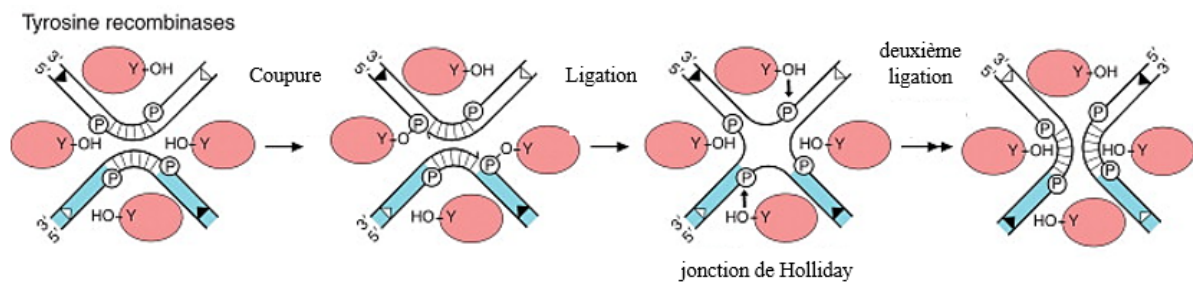


Figure 34 : Mécanisme d'échange de deux brins d'ADN avec une catalyse par une tyrosine recombinase. Formation d'une jonction de Holliday après reconnaissance des sites *att* et coupure de l'ADN bactérien par une des paires de recombinases. Les sites catalytiques au niveau des tyrosines sont les résidus indiqués par « Y-OH ». Les phosphotyrosines sont représentées par « P ». D'après (Prorocic & Stark, 2013).

Cas des recombinaisons à sérine

Les recombinaisons à sérine sont des enzymes capables de reconnaître un site spécifique sur un fragment d'ADN et de créer une cassure double brin au niveau de ce site (Stark, 2014), (Li et al., 2018). Un des brins possède deux-trois bases supplémentaires puisque la recombinaison coupe de façon décalée afin de créer des régions « overlap » (Stark, 2014). Ces extrémités nouvellement formées et possédant cet « overlap » sont polarisées afin d'être recombinaisonnées avec un fragment d'ADN dans un sens particulier, ce qui évite des mésappariements avec des séquences d'ADN non complémentaires.

Concrètement, les recombinaisons à sérine vont (1) reconnaître les sites spécifiques présents sur les séquences d'ADN double brin. Chaque site va ainsi être pris en charge par un dimère de la recombinaison. Lorsque deux sites vont se rapprocher, ils vont (2) former une synapse ou « complexe synaptique » et former un pont afin de pouvoir procéder au (3) clivage, (4) à l'échange et (5) à la recombinaison des brins d'ADN (Figure 35).

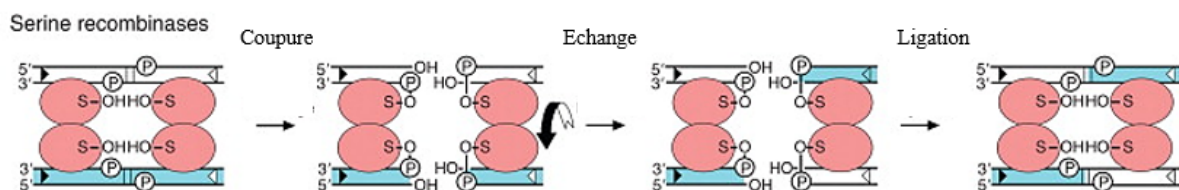


Figure 35 : Mécanisme d'échange de deux brins d'ADN catalysé- par une sérine recombinaison. Un complexe synaptique est formé après reconnaissance de deux sites de croisement pontés par un tétramère de recombinaison (ovales jaunes). Les sites catalytiques au niveau des sérines sont les résidus indiqués par « S-OH ». Les phosphodiesteres sont représentés par « P ». La séquence de chevauchement de 2-3 pb est indiquée par des lignes verticales. D'après (Prorocic & Stark, 2013).

L'une des particularités des recombinaisons à sérine est d'être régulées afin de commencer la réaction catalytique seulement lorsque le complexe synaptique est « correctement » formé, c'est-à-dire avec (1) la présence des deux matrices ADN ainsi que des sites « accessoires » dans des conformations topologiques particulières et (2) la présence des deux sous-unités protéiques de recombinaison afin de former une structure tétramérique (Stark, 2014, Li et al., 2018, Chen et al., 2018).

D'un point de vue structural, toutes les recombinaisons à sérine sont composées d'au moins 150 acides aminés (Smith & Thorpe, 2002, Stark, 2014, Rubio-Cosials et al., 2018). Certains résidus sont fortement conservés au sein de cette famille et contribuent pour la plupart

à la structure du site actif de l'enzyme. La région d'attachement est généralement située au niveau de la région C-terminale de l'enzyme alors que le site actif est généralement présent dans la partie N-terminale de l'enzyme (Smith & Thorpe, 2002, Stark, 2014, Rubio-Cosials et al., 2018, Chen et al., 2018).

Pour le cas des recombinaisons à sérine de plus grande taille, il ne semble pas y avoir de séquences d'ADN accessoires nécessaires pour la formation du complexe synaptique. Les dimères d'intégrases vont se fixer sur les sites d'attachements *attI* et *attB* généralement composés de plus ou moins 40 nucléotides et engendrer une coupure au niveau de 2 nucléotides au centre de cette région (Stark, 2014, Bellanger et al., 2014, Guédon et al., 2017). Cette séquence de deux nucléotides semble être le seul déterminant de la polarité des fragments et donc seule garante de la recombinaison des sites *attI* x *attB* en site *attL* x *attR*. Le « complexe synaptique » est donc une étape clé de cette recombinaison car il doit garantir l'association d'un site *attI* avec un site *attB* afin de former un « complexe synaptique » stable et donc fonctionnel (Stark, 2014).

Dans une même souche, plusieurs ICE ou IME peuvent avoir le même site d'insertion ce qui donne un phénomène d'accrétion qui génère une structure en tandem. De plus, certains sites d'insertion peuvent être présents dans des ICE ou des IME, ce qui génère des éléments composites. C'est le cas des gènes *SNF2* et *PPI* des ICE de la famille Tn5252 qui servent de site d'intégration pour certains IME (Libante et al., 2019). Ces structures complexifient l'identification et le bornage *in silico* des ICE et IME dans les génomes bactérien (Bi et al., 2012, Lao et al., 2022).

iii. Module de transfert

Une fois l'ADN circularisé, celui-ci est pris en charge par une enzyme codée par l'ICE appelée relaxase. Elle forme avec des protéines accessoires un complexe appelé le relaxosome (Johnson & Grossman, 2015, Guédon et al., 2017). Différentes familles de relaxases (appelées aussi MOB pour « mobilisation ») ont été décrites dans la littérature : MOB_F, MOB_H, MOB_Q, MOB_C, MOB_B, MOB_L, MOB_P, MOB_T et MOB_V (Figure 36). Il est également possible de trouver des MOB « hybrides », MOB_{FQ} ou de MOB_{PFH} ou encore, des modules de transfert sans MOB (Garcillán-Barcia et al., 2009, Guglielmini et al., 2013, Bellanger et al., 2014). Le relaxosome va se fixer au niveau d'un site appelé origine de transfert (*oriT*) de l'élément et

catalyser une coupure simple brin au niveau d'une séquence appelée « *nic* ». Ce clivage va entraîner une liaison covalente entre la relaxase et l'extrémité 5' du brin d'ADN. La relaxase fixée au niveau de l'*oriT* va ensuite guider le brin d'ADNsb vers une protéine de couplage qui, comme son nom l'indique, fait le lien avec le système de transport de l'ADN à travers la paroi bactérienne appelé MPF (« Mating pore formation ») (Johnson et al., 2015, Guédon et al., 2017). Deux types de CP ont été décrits : VirD4 et TcpA (Guglielmini et al., 2013).

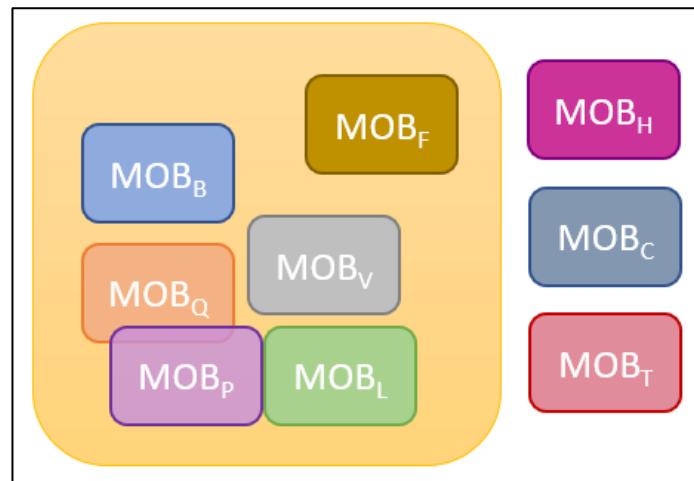


Figure 36 : Représentation des différentes familles de relaxases. Les familles canoniques possédant une signature HxH sont représentée dans un fond jaune pâle. La distance entre les blocs rend compte de la parentée entre les relaxases. D'après (Soler et al., 2019).

Différents MPF ont également été identifiés ; MPF_T, MPF_{FATA}, MPF_B, MPF_F, MPF_{FA}, MPF_I, MPF_G, MPF_{F'}, MPF_C (Bellanger et al., 2014, Grohmann et al., 2018, Costa et al., 2021). Le transfert du brin d'ADN dans la cellule receveuse va se faire au travers d'un pore de conjugaison formé de différentes protéines et localisé au niveau de la paroi cellulaire. Les mécanismes responsables de la formation de ce pore n'étant toujours pas élucidés, nous ne savons pas si ce système est préexistant ou si l'assemblage se fait suite à l'interaction relaxosome-CP. Cette structure est caractérisée chez les bactéries à Gram négative (double membrane et espace périplasmique) où elle a été observée en cryoélectromicroscopie (Figure 36) et doit être très différente chez les Gram-négatives (membrane simple et couche épaisse de PG). Le mécanisme de transfert de l'ADN est connu sous le nom de « tapis roulant ». Compte-tenu de sa taille, la relaxase est transportée à travers la membrane sous forme déconformée (Trokter & Waksman, 2018).

Une fois l'ADNsb transféré, il est converti en ADNdb, et intégré dans le chromosome hôte par recombinaison site-spécifique (Johnson & Grossman, 2015). Néanmoins, certains ICE peuvent être maintenus sous forme circulaire chez la souche receveuse pendant quelques générations avant d'être intégrés dans le chromosome au site *attB* (Johnson & Grossman, 2015, McKeithen-Mead & Grossman, 2023).

Les IME ne codent pas ce système de sécrétion (Figure 37) indispensable à leur transfert. Ils ne possèdent donc pas de module de transfert à proprement parler mais ils codent un module de mobilisation. Ils utilisent la machinerie de conjugaison codée par des éléments autonomes (ICE ou plasmide) (Guédon et al., 2017). L'utilisation du module de conjugaison d'un ICE permet la mobilisation de l'IME en *trans* (indépendamment de l'ICE) ou en *cis* dans le cas des IME intégré dans des ICE qui peuvent se transférer de façon concomitante avec l'ICE qui l'héberge (Guédon et al., 2017, Libante et al., 2020).

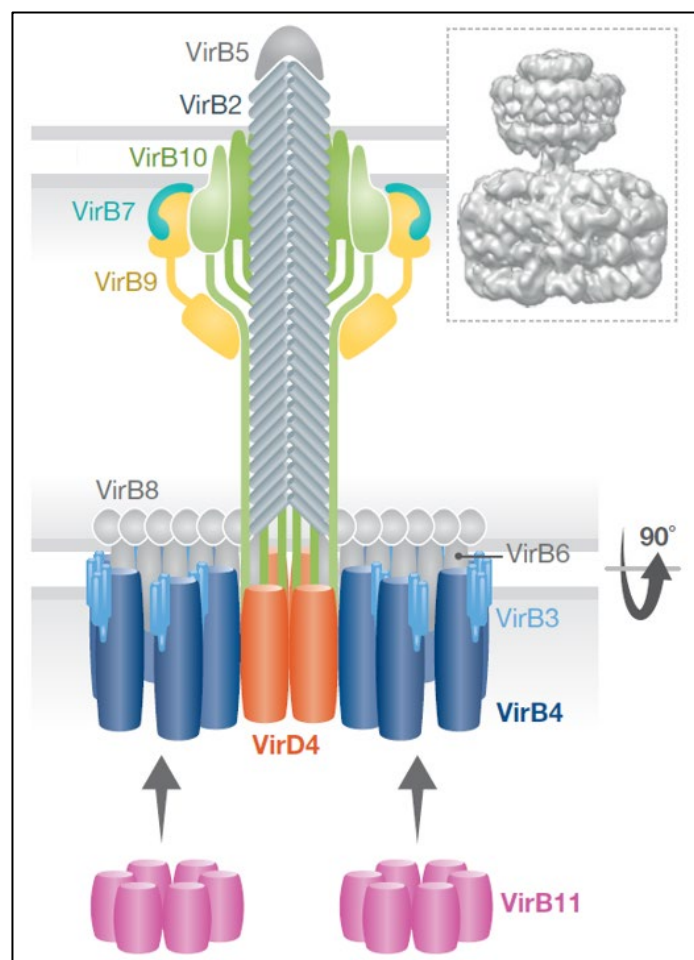


Figure 37 : Architecture d'un T4SS chez les bactéries Gram négatives. D'après Waksman, 2019.

Il est important de noter que le système de sécrétion de type IV (Figure 37) codé par l'ICE peut servir également pour transporter des facteurs de virulence et donc être considéré lui-même comme un facteur associé à la virulence. Cela a été mis en lumière en étudiant l'îlot de pathogénicité 89K (renommé ensuite SsPI-1) de souches épidémiques de sérotype 2 de *S. suis* responsables d'épidémies en Chine (Zhao et al., 2011). Il a été montré que la sécrétion du facteur de virulence SspA (qui est une protéase de type subtilisine) était dépendante du T4SS de l'ICE (Yin et al., 2016).

iv. Module de régulation

La régulation du transfert de certains ICE a été décrite dans la littérature (Bellanger et al., 2007, Carraro & Burrus, 2014, Bañuelos-Vazquez et al., 2017). La détection de signaux tels que la présence d'antibiotiques, de facteurs de stress déclenchant la réponse SOS ou de molécules de QS dans l'environnement par les facteurs codés par le module de régulation des éléments peut induire *in fine* un transfert de l'ICE (Carraro & Burrus, 2014, Bañuelos-Vazquez et al., 2017). L'existence d'un tel module a été décrit et étudié chez ICES_{t3} de *S. thermophilus*, en effet, la présence de mitomycine C dans le milieu, induit le clivage d'un répresseur (Arp1) apparenté au répresseur du phage lambda cI. La levée de répression induit l'excision spécifique de l'ICE (Bellanger et al., 2007). Chez *S. suis*, il a été montré que l'expression de la protéine VirD4 (protéine de couplage) de l'ICE 89K/SsPI-1 était induite *in vivo* (Gu et al., 2009).

v. Module de fonctions accessoires

Les ICE/IME codent également des fonctions accessoires telles que les gènes impliqués dans la virulence et/ou la résistance aux antibiotiques (Bellanger et al., 2014). On trouve également dans ces fonctions des gènes impliqués dans la production de bactériocines, la partition de réplicons et/ou des systèmes de contrôle de la réplication (Bellanger et al., 2014, Libante et al., 2019). L'îlot de pathogénicité 89K/SsPI-1, qui est un ICE de la famille Tn5252, porte en particulier le système SalK/SalR qui contribue à la virulence de souches épidémiques de sérotype 2 de *S. suis* responsables d'épidémies en Chine (M. Li et al., 2008, Zhao et al., 2019). La revue publiée en 2021 fait le point sur les différents gènes de résistances portés par des EGM et notamment des ICE et IME et a été actualisé partie III.

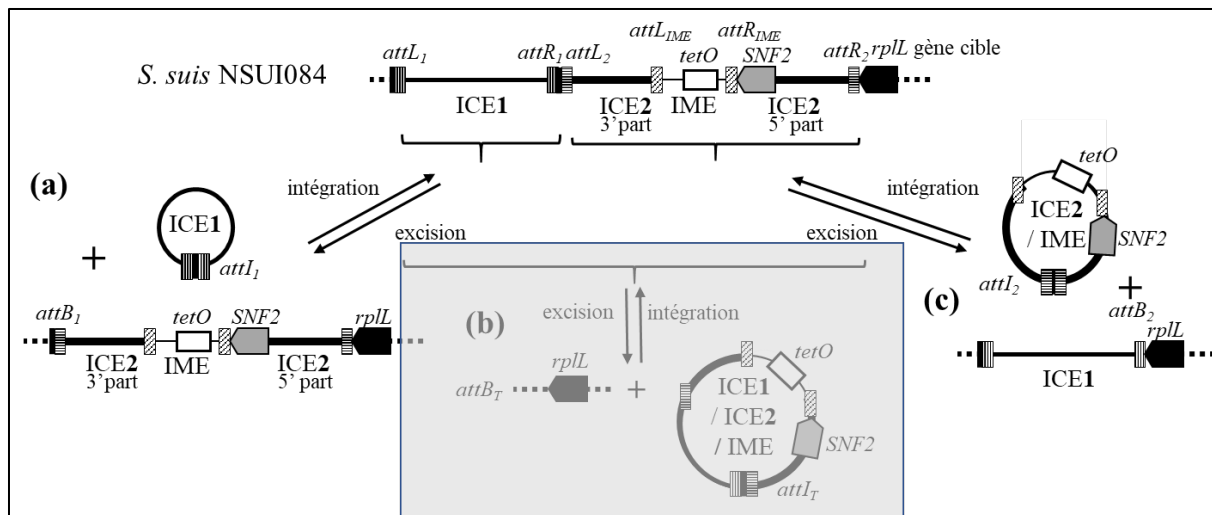


Figure 38 : Structure composite d'éléments intégratifs chez la souche *S. suis* NSUI84 et formes excisées possibles. ICE1 appartient à la famille Tn1549 et est en accréition avec ICE2 qui appartient à la famille Tn5252. Dans ce dernier est inséré (dans le gène SNF2) un IME qui porte le gène *tetO* (flèche grise). ICE2 est en deux parties 3' et 5' interrompue par l'IME. Cette structure composite est insérée à l'extrémité 3' du gène *rplL* (flèche noire). Les ICE sont délimités par des sites d'attachements numérotés en fonction de l'ICE qu'ils délimitent ou qui sont générés après son excision. Les différentes formes d'ICE excisées sont représentées dans la partie inférieure de la figure : (a) ICE1 seul, (b) le tandem ICE1-ICE2 et (c) ICE2 incluant l'IME. Les formes excisées de l'IME seul (non schématisé) et du tandem (en grisé) n'ont pas été détectés. D'après Libante et al 2019

vi. Eléments intégratifs conjugatifs/mobilisables décrits chez *S. suis* :

Chez *S. suis*, les éléments génétiques mobiles portant des gènes de résistance sont le plus souvent des ICE et des IME. Cinq familles d'ICE porteurs de gènes AMR ont été décrites chez *S. suis* : éléments des familles Tn5252, Tn1549, Tn916, TnGBS2 et les ICE intégrés dans le gène *lysS* de type ICEvanG. Ces familles ont été définies par la composition de leur module de conjugaison et nommées en fonction du premier élément caractérisé pour chaque familles (Ambroset et al., 2016). Ces éléments sont présentés dans la revue publiée lors de la 1ère année de thèse (Dechêne-Tempier et al., 2021).

Les ICE peuvent s'intégrer dans un site hébergeant déjà un élément génétique conduisant à la constitution d'un tandem. Deux types de tandems ont été décrits chez *S. suis* jusqu'à présent : des tandems ICE-ICE et des tandems ICE-prophage (Dechêne-Tempier et al., 2021). C'est le cas chez la souche NSUI84 qui possède un ICE de la famille Tn1549 à côté d'un ICE de la famille Tn5252 au site d'intégration *rplL* (Libante et al., 2019). Des tests d'excision montrent que ces deux ICE ne s'excisent pas en tandem (Figure 38b grisée) mais bien indépendamment l'un de l'autre (Figure 38a et c) (Libante et al., 2019).

Les ICE peuvent également héberger des IME (Libante et al., 2019, J. Wang et al., 2022). C'est le cas des IME intégrés dans les gènes *SNF2* des ICE de la famille Tn5252 porteurs des gènes *tet(O)*. L'IME présent chez la souche NSUI084 a été testé pour sa capacité d'excision et de transfert mais aucune excision n'a été détectée (Libante et al., 2019). C'est également le cas d'un ensemble d'IME porteurs des gènes *tet(O)* et qui sont intégrés dans les gènes *PPI* d'un ICE de la famille Tn5252 (J. Wang et al., 2022).

Bien que porteurs de très nombreux gène d'AbR, avec une prévalence élevée chez *S. suis*, peu de choses sont connues sur les éléments intégratifs capables de se transférer par conjugaison. L'utilisation d'outils de bioinformatique combinés à l'intelligence artificielle rend leur identification dans les génomes plus performante montrant à quel point ils y sont nombreux. Toutefois les interactions pouvant exister entre ces éléments, leur hôte et leur environnement posent beaucoup de questions (régulation, activation, antagonisme, synergie, transfert, spectre d'hôte, persistance dans les descendants et les populations...) qui méritent d'être étudiés tant les conséquences sont importantes pour la préservation de l'efficacité des antibiotiques dont nous disposons.

Chapitre 2 : Problématique et objectifs des travaux

La lutte contre l'antibiorésistance représente un enjeu sociétal et économique majeur. Il est essentiel d'évaluer le potentiel de dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques *via* des EGM afin de proposer des stratégies de contrôle.

S. suis est l'une des principales causes d'infection chez les porcs, entraînant des pertes économiques considérables. En outre, il peut également infecter la faune sauvage et être responsable d'infections graves chez l'Homme. Ce pathogène zoonotique a été décrit comme un réservoir important de gènes d'AbR et apparait donc comme un modèle d'étude intéressant. La plupart des gènes d'AbR décrits chez cette espèce bactérienne sont portés par des éléments génétiques mobiles et en particulier par des ICE et des IME. Des études ont été réalisées dans plusieurs pays, en particulier au Canada, aux Etats-Unis et en Chine mais aucune donnée n'était jusqu'alors disponible en France.

Notre projet visait, dans un premier temps, à déterminer les profils phénotypiques de résistance/sensibilité aux antibiotiques de souches de *S. suis* isolées chez l'Homme, le porc et le sanglier en France. Afin d'atteindre cet objectif, une collection de 200 souches de *S. suis*, représentative de la diversité des souches isolées sur le territoire français, a été constituée avant d'être analysées par antibiogrammes à l'Anses Ploufragan. Des analyses de « cut-off » ont été réalisées afin de catégoriser les souches en deux catégories : sensibles ou résistantes. Des analyses statistiques (tests de χ^2 , analyse de correspondances multiples et analyse factorielle multiple) ont été réalisées avec l'aide d'une biostatisticienne de l'Anses, laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, afin d'étudier le lien entre les phénotypes de résistance aux antibiotiques et les commémoratifs des souches (période d'isolement, origine géographique, sérotype, hôte et site d'isolement).

Le second objectif était de caractériser au niveau génomique les souches de *S. suis* résistantes aux antibiotiques identifiés lors de la première phase du travail. Ainsi la deuxième phase du travail a consisté à (1) étudier la diversité et la parenté phylogénétique des souches, (2) évaluer leur contenu en gènes associés à la virulence, (3) évaluer la fréquence et la diversité des gènes d'AbR portés par des EGM, en particulier des ICE et IME et (4) étudier la complétude du set de gènes nécessaires à la compétence. Pour ce faire, parmi les 200 souches de la collection, 102 souches ont été sélectionnées pour leur profil de résistance aux antibiotiques et

leur génome a été séquencé. Le séquençage et l'assemblage des génomes a été réalisé *via* la plateforme de séquençage de l'Anses. Les analyses génomiques ont ensuite été réalisées en partie à l'Anses (détermination des ST et des complexes clonaux) et en partie dans l'UMR DynAMic à l'Université de Lorraine (analyse des gènes de virulence, d'AbR, contenu en ICE et IME et gènes de compétence).

Enfin, le dernier objectif de ce projet était d'étudier expérimentalement chez *S. suis*, la mobilité des IME, EGM très peu étudiés jusqu'ici (partie du travail réalisé dans l'Unité DynAMic). Notre intérêt s'est porté plus particulièrement sur des IME intégrés dans le gène SNF2 des ICE de la famille Tn5252. Ces IME, porteurs de gènes d'AbR, sont très fréquemment retrouvés dans les génomes de *S. suis*. Peu d'informations sont disponibles sur leur capacité à s'exciser et se transférer. Ces IME sont dépendants du module de conjugaison d'un ICE (ICE « helper ») pour leur transfert et d'un ICE de la famille Tn5252 et de son gène SNF2 pour leur intégration. La fonctionnalité des IME a été analysée. Les éléments conjugatifs « helper » ont également été étudiés afin de mieux comprendre les interactions entre éléments mobilisables et éléments « helper » ainsi que la régulation de ces processus.

Chapitre 3 : Résultats

I. Profils de résistance aux antibiotiques de souches de *Streptococcus suis* isolées chez le porc, le sanglier ou l'Homme, entre 1994 et 2020, en France.

Article 1 : “Antimicrobial resistance profiles of *Streptococcus suis* isolated from pigs, wild boars and humans in France between 1994 and 2020”. Publié dans la revue *Journal of Clinical Microbiology* (doi 10.1128/jcm.00164-23)

L'objectif du travail rapporté ici était déterminer le niveau de résistance aux antibiotiques au sein d'une collection de souches de *S. suis* diversifiée. Notre approche a été tout d'abord de : (1) constituer une collection de 200 souches représentatives de celles présentes en France métropolitaine selon leur : sérotype, site d'isolement permettant de définir trois pathotypes (pathogène, non-clinique et respiratoire), période d'isolement (antérieure ou postérieure au premier plan EcoAntibio), hôte (porcs, Homme, sanglier) et région géographique d'isolement (la moitié en Bretagne, région de forte densité d'élevages, l'autre moitié en France métropolitaine) ; (2) réaliser les antibiogrammes des souches vis-à-vis de 22 antibiotiques appartenant à 12 familles et utilisés en médecine vétérinaire et/ou humaine. Ces antibiotiques ont été sélectionnés selon les recommandations du CLSI et après avoir fait une revue de la littérature sur les différents antibiotiques généralement testés sur ce pathogène dans le monde. L'arbre de décision utilisé pour le choix des différents antibiotiques est présenté figure 39.

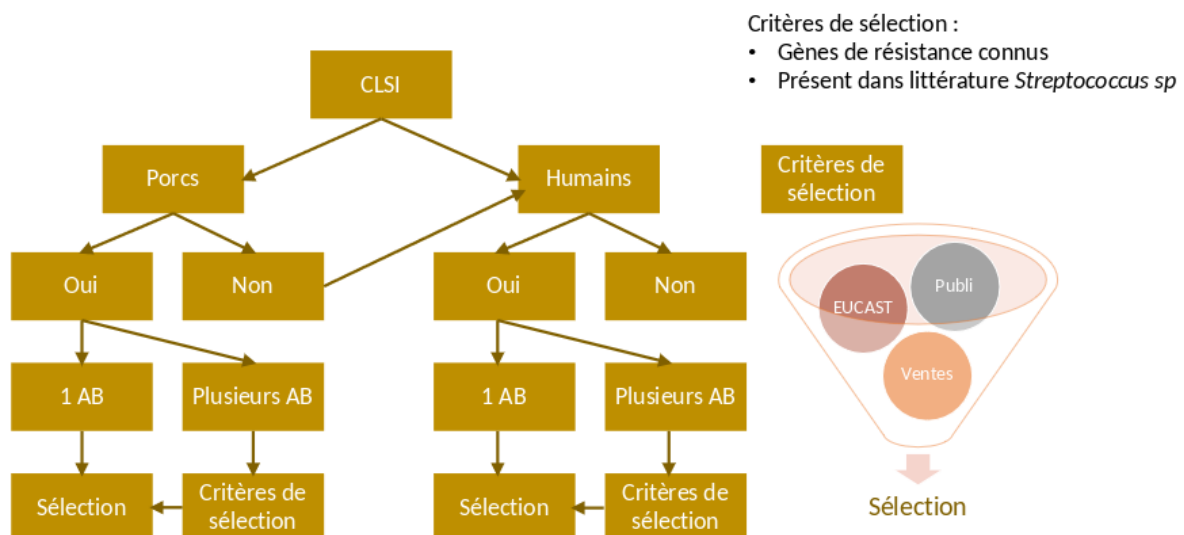


Figure 39 : Sélection des familles et antibiotiques utilisés. CLSI : Clinical & Laboratory Standards Institute, EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing AB : Antibiotiques.

Cette étude a montré que 86% des souches analysées étaient résistantes à au moins un antibiotique, avec un faible taux de résistance aux fluoroquinolones, aux pénicillines, à la pleuromutiline et aux diaminopyrimidine-sulfonamides et un taux de résistance plus élevé aux macrolides-lincosamides et à la tétracycline. Des profils de multirésistance ont été observés chez 138 souches (69%); trois d'entre elles étaient résistantes à six familles d'antibiotiques.

Les analyses statistiques ont mis en évidence une diminution de la résistance au triméthoprime-sulfaméthoxazole, dans notre collection, entre les deux périodes étudiées -avant 2010 et après 2015 ainsi qu'un impact de l'origine géographique avec un taux de résistance aux macrolides-lincosamides et à la pénicilline plus élevée en Bretagne que dans les autres régions françaises. En outre, les profils de résistance aux macrolides-lincosamides et à la tétracycline ont été plus trouvés dans les souches isolées chez le porc que dans celles isolées chez l'Homme et le sanglier. Une différence de résistance a également été observée entre les sérotypes. Les souches résistantes à la pénicilline sont de sérotypes 1, 5, 9, 11, 12, 15, 27 ou 29. Enfin, les résistances à la pénicilline et à la pleuromutiline ont surtout été trouvées dans des isolats "non cliniques".

Le traitement des infections humaines et porcines dues à *S. suis* en France peut donc encore être réalisé sereinement avec des antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines. Cependant, cette étude souligne la nécessité de surveiller la résistance aux antibiotiques chez ce pathogène zoonotique, notamment chez des isolats non cliniques.

Antimicrobial resistance profiles of *Streptococcus suis* isolated from pigs, wild boars, and humans in France between 1994 and 2020

Manon Dechêne-Tempier,^{1,2} Eric Jouy,¹ Marie-Hélène Bayon-Auboyer,³ Stéphanie Bougeard,⁴ Claire Chauvin,⁴ Virginie Libante,² Sophie Payot,² Corinne Marois-Créhan¹

AUTHOR AFFILIATIONS See affiliation list on p. 11.

ABSTRACT *Streptococcus suis*, an emerging zoonotic pathogen, causes invasive infections and substantial economic losses in the pig industry worldwide. Antimicrobial resistance against 22 antibiotics was studied for 200 *S. suis* strains collected in different geographical regions of France. Most of the strains (86%) showed resistance to at least one antibiotic with a low rate of resistance to fluoroquinolones, penicillins, pleuromutilin, and diaminopyrimidine-sulfonamides, and a higher rate to macrolides-lincosamides and tetracycline. Multi-resistance patterns were observed in 138 strains; three of them being resistant to six antibiotic families. Statistical analyses highlighted a decrease in the resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole, in our collection, between the two periods studied—before 2010 and after 2015—as well as an impact of the geographical origin with a higher rate of resistance to macrolides-lincosamides and penicillin in Brittany than in the other French regions. Furthermore, macrolides-lincosamides and tetracycline resistance patterns were more likely to be found in pig isolates than in human and wild boar isolates. A difference in resistance was also observed between serotypes. Most of the penicillin-resistant strains belong to serotypes 1, 5, 9, 11, 12, 15, 27, and 29. Finally, penicillin and pleuromutilin resistances were mostly found in “non-clinical” isolates. The empirical treatment of human and porcine infections due to *S. suis* in France can therefore still be carried out with beta-lactams. However, this study emphasizes the need to monitor antimicrobial resistance in this zoonotic pathogen.

KEYWORDS *Streptococcus suis*, pathogen, antimicrobial resistance, CLSI, disc diffusion method

Streptococcus suis is a zoonotic pathogen that causes pig infections and substantial economic losses. Even though serotype 2 is preponderant, other serotypes can be responsible for infections worldwide (1). In Europe, serotypes 9, 2, and 7 are dominant among clinical pig isolates (61%, 18%, and 7% of the isolates, respectively), whereas serotypes 1/2 and 3 are also frequently found in the rest of the world (2, 3). Together with serotypes, Weinert et al. proposed to group *S. suis* strains into three groups or pathotypes according to their isolation sites: (i) “non-clinical,” (ii) “respiratory,” or (iii) “systemic” (4). These groups correspond to the (i) commensal, (ii) possibly opportunistic, and (iii) pathogenic groups defined by Estrada et al. (5). These authors also suggested using the serotype to predict the pathotype, as they demonstrated a link between serotypes and pathotypes (5). Human cases of *S. suis* were mainly described in Asia, with three large outbreaks in China reported in 1998, 2005, and 2016 (6). Clinical manifestations of *S. suis* infection include meningitis, septicemia, endocarditis, and arthritis (7). In France, human infections are scarce; the eighth French case since 1995 was reported in 2016 (8) and the latest case corresponds to a woman hospitalized for meningitis after preparing wild boar meat, with *S. suis* identified as the causative agent of the disease (7).

Several families of antimicrobials are commonly used in veterinary medicine to treat bacterial infections. These include tetracyclines, beta-lactams, polymyxins, macrolides/lincosamides, aminoglycosides, sulfonamides, or trimethoprim-sulfonamides (TMPs) (9). The antibiotic families mostly prescribed for gastrointestinal pig infections worldwide are tetracyclines, lincosamides, pleuromutilins, and macrolides (10–13). Chlortetracycline, tetracycline, and amoxicillin are used for treating respiratory and infectious diseases (14, 15). In France, tetracycline, beta-lactams (penicillins), macrolides, and TMPs are generally used for respiratory infections; polypeptides and tetracycline for sepsis and gastrointestinal infections, respectively (12). Beta-lactams (penicillins) are indicated for treating *S. suis* meningitis, septicemia, and/or arthritis (12). In France, the regulation of antibiotics in veterinary medicine must meet French and European standards. The use of these molecules is subject to marketing authorizations and be indicated in the “summary of product characteristics” sheet. Checks are made on their distribution, prescription, and use in accordance with European laws. In 2010, the European Union initiated a common European program called “One Health” (16). This program is based on the premise that there is a direct link between human health, animal health, and, more generally, environmental health. In 2012, France implemented its first “EcoAntibio” plan in order to reduce the use of antibiotics nationwide by more than 25% in 5 years. This plan was a success, as the use of antibiotics dropped by 37% (9). Resapath (a French surveillance network for antimicrobial resistance in bacteria from diseased animals) is part of the antimicrobial resistance surveillance system for animals setup in France. The Resapath network collects and analyzes data from routine antimicrobial susceptibility tests (disc diffusion method) performed by diagnostic laboratories in the network and publishes an annual report. For *S. suis*, this report includes the proportions of susceptible isolates for 12 antibiotics (amoxicillin, oxacillin, erythromycin, tylosin, spiramycin, lincomycin, streptomycin, kanamycin, gentamicin, tetracycline, doxycycline, and trimethoprim-sulfonamides) (17). Except from Resapath, few data on the resistance of *S. suis* in France are available in the literature (18, 19). Therefore, the aim of this study was to investigate the resistance of a collection of *S. suis* strains isolated in France to a larger number of antimicrobials. This collection of strains was fully characterized regarding serotype, and included strains isolated from humans and wild boars. The statistical associations between resistance/susceptibility and the isolation period, the strain’s geographical origin, serotype, host, and pathotype were analyzed.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

Two hundred isolates of *S. suis* were selected from the ANSES strain collection ($n = 1,619$), resulting from different research programs, in order to get a set of strains representative of the diversity of serotypes, geographical origins, and hosts available. All strains isolated from human cases or wild boars were selected. This set included 21 strains of serotype 1, 20 of

Editor Vanessa R. Barrs, Jockey Club College of Veterinary Medicine, Hong Kong

Address correspondence to Corinne Marois-Créhan, Corinne.MAROIS@anses.fr.

The authors declare no conflict of interest.

See the funding table on p. 11.

Received 7 February 2023

Accepted 2 July 2023

Published 1 September 2023

Copyright © 2023 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Full-Length Text

serotype 1/2, 32 of serotype 2, 30 of serotype 3, 30 of serotype 7, 33 of serotype 9, and 34 strains of other serotypes (six strains of serotype 4 and one or two strains of each of the following serotypes: 5, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 21, 24, 27, 28, 29, and 31) (Table S1). In France, more than 50% of national swine production is based in Brittany, so we chose to include 130 strains collected in Brittany and 70 from other regions of France. Most of the strains were isolated from pigs ($n = 178$); the remaining 22 were isolated from humans ($n = 13$) or wild boars ($n = 9$). Strains were allocated to two groups according to the isolation period (88 strains for the “before 2010” group and 112 for the “after 2015” group) to examine the potential impact of the French EcoAntibio plan. Finally, strains were classified into three pathotypes. The “systemic” group contained 127 strains isolated from samples of the nervous system, blood, or joint when the causes of death were attributed to an infection by this pathogen. The “respiratory” group hosted 31 strains isolated from pulmonary samples obtained either from sick or clinically healthy animals on farms that had had outbreaks of *S. suis* infections. The strains in the “non-clinical” group ($n = 36$) were from the upper respiratory tract with no sign of *S. suis* infection in animals, and six strains were not classified due to a lack of information. More details can be found in the supplementary data (Table S1). All the strains used were confirmed by serotyping using the PCR method described by Okura et al. (20).

Culture conditions and antimicrobial susceptibility testing

All the strains were stored at -80°C in a buffered peptone water solution with glycerol (20%). Each strain was subcultured on Columbia agar with 5% sheep blood (BIO-RAD, Marne la Coquette, France) and incubated overnight at 37°C under 5% CO_2 . Antimicrobial susceptibility was tested using the disc (agar) diffusion method, according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) standards (VET01-A and VET01-S) (21, 22). Briefly, an inoculum of 1×10^8 CFU/mL was prepared for each strain and used to inoculate a Mueller-Hinton plate containing 5% of sheep blood (120 mm square plates; BIO-RAD) before the application of antimicrobial discs (BIO-RAD, Marne-La-Coquette, France, or Mast Diagnostics, Amiens, France). The plates were incubated for $22 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ at 35°C , and, after bacterial growth, inhibition zone diameters were measured with a sliding calliper. The reference strain *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 was used as a quality control according to CLSI recommendations.

As *S. suis* is a zoonotic bacterium, the antimicrobials studied belong to either the veterinary or human medicine list, or to both. For strains found resistant to penicillins and fluoroquinolones by disc diffusion method, the minimal inhibitory concentration (MIC) was determined using Micronaut-S microplates (from Merlin, Bruker). These microplates were used according to the manufacturer’s instructions.

Strain categorization

Antimicrobial susceptibility test results were used to differentiate between strains without or with acquired resistance mechanisms [wild type (WT) or non-wild type (NWT), respectively] using cut-off values (COWT). The normalized resistance interpretation (NRI) method was applied for each antibiotic to determine these COWT values (23, 24). The NRI method applied to the disc diffusion antimicrobial susceptibility testing was precisely described by Kronvall and Smith (23) and the related excel program is freely accessible at the following website link: <http://www.bioscand.se/nri/>. The clinical interpretative criteria specified in CLSI (22) were also used when available. When the COWT calculation was not possible, the strain was categorized using the threshold diameters described in the literature and observations of the measured diffusion diameters (22, 25–27). In this study, the WT term will be expressed as susceptible to the antibiotic tested, and the NWT will be expressed as resistant to the antibiotic tested.

Statistical analyses

The strains were classified according to different resistance profiles (Table S1) in proportion to their resistance/susceptibility to the antibiotics tested. In total, 24 resistance profiles were identified following the analyses carried out. The first (univariate) step entailed using

Full-Length Text

a Chi-squared test and Fisher correction (required for limited expected counts) to explore for each antibiotic possible links with other antimicrobial resistance rates together with links between each antimicrobial resistance profile and the isolation period, serotype, geographical origin, host, and/or pathotype. The second (multivariate) step considered all the antimicrobial resistances. First, a multiple correspondence analysis (MCA) was performed to illustrate whether the antimicrobial resistance rates for the different antibiotics or the antimicrobial resistance profiles depend on the isolation period, serotype, geographical origin, host, and/or pathotype (the latter variables being considered supplementary in the analysis). Then, a multiple factor analysis (MFA) was used to determine whether there is a correlation between the antimicrobial resistance observed for the antibiotics of the same family and antibiotics of different families. For this purpose, each family was considered a block of variables. In order to ensure the robustness of the various tests and analyses, statistical analyses were performed only on groups with at least five representative strains. All the analyses were performed using the R software with the FactoMineR package (28). Only results with a *P*-value equal to or lower than 0.05 were considered significant and subsequently interpreted.

RESULTS

Determination of cut-off values using the NRI method

The NRI method applied to the distributions of inhibition zone diameters can be used to define two groups corresponding to the two observed populations divided by the COWT (Table 1). Only one population was observed for gentamicin, chloramphenicol, florfenicol, linezolid, quinupristin/dalfopristin, and vancomycin. Two were observed for ampicillin, penicillin, cefotaxime, ceftiofur, imipenem, clindamycin, lincomycin, erythromycin, tilmicosin, tylosin, enrofloxacin, levofloxacin, norfloxacin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. Finally, a complex pattern was observed for tiamulin and tetracycline. In the absence of CLSI clinical interpretative criteria, the COWT value was therefore determined manually for tiamulin. The human CLSI's interpretive criteria for *Streptococcus* spp. were used for tetracycline. For trimethoprim-sulfamethoxazole, the human CLSI's interpretive criteria for *S. pneumoniae* was used since no criteria was available for *Streptococcus* spp.

Antibiotic susceptibility of the strains

No resistance was observed for the following antibiotics: gentamicin (aminoglycosides) (to high concentration levels), linezolid (oxazolidinones), quinupristin/dalfopristin (streptogramins), and vancomycin (glycopeptides) (Table 1). For phenicols (chloramphenicol and florfenicol), the NRI COWT and the breakpoints proposed by the CLSI differed by only 2 mm and 1 mm, respectively, which could lead to different interpretations for 18 strains. It was decided to use the cut-off calculated by the NRI method and to classify all the strains as susceptible to this family of antibiotics. Indeed, no strain differed from the wild-type population for these two antimicrobials.

The resistance rates observed are reported in Fig. 1. Less than 1% of the strains tested were resistant to fluoroquinolones (this single strain was resistant to enrofloxacin, levofloxacin, and norfloxacin). Five percent of the strains tested showed beta-lactam resistance with 10 strains resistant to penicillin G. Of these, three were also resistant to ampicillin. These results were confirmed by MIC determination of penicillin G: 2 µg/mL for three strains, 1 µg/mL for four strains, 0.5 µg/mL for one strain, and 0.25 µg/mL for two strains. For ampicillin, MIC was 1 µg/mL for three strains. The breakpoints used were >0.12 µg/mL for penicillin G and >0.25 µg/mL for ampicillin (CLSI M100) (28). No strain was resistant to cefotaxime, ceftiofur, or imipenem. For pleuromutilin (tiamulin) and diaminopyrimidine-sulfonamides (TMPS), the proportions of resistant strains were 8% (*n* = 16) and 16% (*n* = 32), respectively. One of the highest resistance percentages observed was for macrolides-lincosamides, with more than 71% of the strains tested having resistance profiles [to erythromycin, 69% (*n* = 137); tilmicosin, 69% (*n* = 137); tylosin, 69% (*n* = 138); clindamycin, 71% (*n* = 142); and lincomycin, 71% (*n* = 142)]. Finally, 81% of the tested strains were resistant to tetracycline (*n* = 162).

In total, 86% of the strains tested were resistant to at least one antibiotic ($n = 171$). Among these isolates, 138 can be classified as multiresistant as they are resistant to three families of antibiotics. Thirty-five, eight, and three strains were resistant to, respectively, four, five, or six families of antibiotics. The resistance patterns are included in the supplementary data (Table S2). The most common multi-resistance patterns observed in this study are for macrolides (erythromycin, tilmicosin, and tylosin) associated with lincosamides (clindamycin and lincomycin), and tetracycline (97 strains, profile P11),

TABLE 1 Normalized resistance interpretation cut-off value obtained with the disc diffusion method for 200 *S. suis* strains

| Class | Antimicrobial agent | Disc load (µg) | Distribution pattern | NRI cut-off value (mm) ^a | CLSI (mm) ^b | Wild-type population (mm) | Non-wild-type population (mm) ^c |
|---------------------------------|-------------------------------|----------------|----------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|--|
| Aminoglycosides | Gentamicin | 500 | Unimodal | 23 | | 23–39 | NA ² |
| Beta-lactams | Ampicillin | 2 | Multi-modal | 23 | | 24–38 | 13–22 |
| | Penicillin G | 1 | Multi-modal | 19 | | 19–32 | 6–17 |
| | Cefotaxime | 30 | Multi-modal | 24 | | 24–38 | NA ² |
| | Ceftiofur | 30 | Multi-modal | 24 | ≥21 (S) <i>S. suis</i> | 24–36 | NA ² |
| | Imipenem | 10 | Multi-modal | 30 | | 32–44 | NA ² |
| Phenicol | Chloramphenicol | 30 | Unimodal | 19 | ≥21 (H) <i>Streptococcus</i> spp. | 19–30 | NA ² |
| | Florfenicol | 30 | Unimodal | 21 | ≥22 (S) <i>S. suis</i> | 21–34 | NA ² |
| Lincosamides | Clindamycin | 2 | Multi-modal | 20 | ≥19 (H) <i>Streptococci</i> | 20–29 | 6–19 |
| | Lincomycin | 15 | Multi-modal | 22 | | 22–32 | 6–21 |
| Macrolides | Erythromycin | 15 | Multi-modal | 22 | ≥21 (H) <i>Streptococci</i> | 32–24 | 6–17 |
| | Tilimicosin | 15 | Multi-modal | 10 | | 10–21 | 6 |
| Fluoroquinolones | Tylosin | 30 | Multi-modal | 18 | | 18–27 | 6–16 |
| | Enrofloxacin | 5 | Multi-modal | 18 | | 20–34 | 14 |
| | Levofloxacin | 5 | Multi-modal | 18 | | 18–32 | 14 |
| | Norfloxacin | 10 | Multi-modal | 13 | | 16–29 | 6–10 |
| Pleuromutilins | Tiamulin | 30 | Multi-modal | NA ¹ | | 14–29 | 6–13 |
| Oxazolidinones | Linezolid | 30 | Unimodal | 22 | | 24–37 | NA ² |
| Streptogramins | Quinupristin/dalfopristin | 15 | Unimodal | 15 | | 15–27 | NA ² |
| Tetracycline | Tetracycline | 30 | Multi-modal | NA ¹ | ≥23 (H) <i>Streptococcus</i> spp. | 23–33 | 6–22 |
| Diaminopyrimidines-sulfonamides | Trimethoprim-sulfamethoxazole | 25 | Multi-modal | NA ¹ | ≥19 (H) <i>S. pneumoniae</i> | 19–39 | 6–18 |
| Glycopeptides | Vancomycin | 30 | Unimodal | 18 | ≥17 (H) <i>Streptococcus</i> spp. | 20–32 | NA ² |

^aNRI cut-off calculated for 22 antibiotics. NA¹, no diameter cut-off available.

^bInterpretive criteria provided by the CLSI (22) for swine (S) or human (H).

^cNA², no values for the non-wild-type clusters.

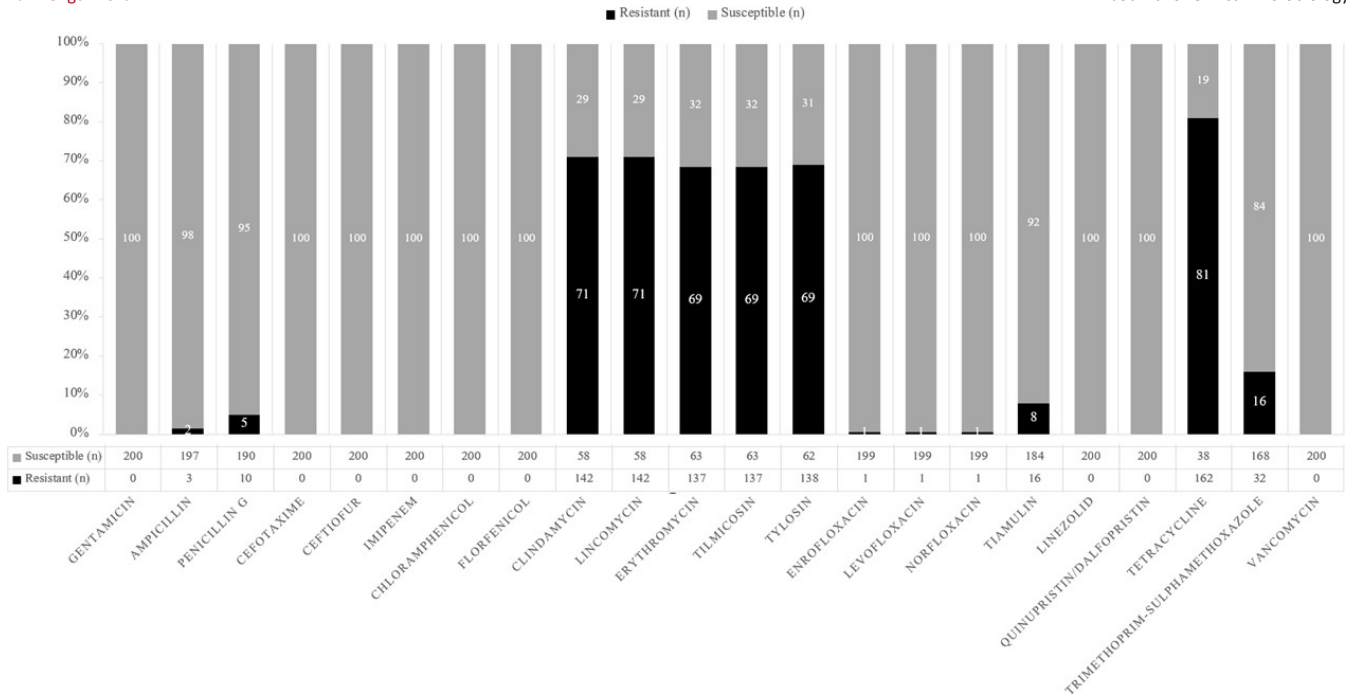


FIG 1 Resistance rates observed for 200 *S. suis* strains. The percentage of strains without or with resistance mechanisms (in light gray or black, respectively) was represented for each antibiotic tested. The antibiotics are classified according to the antimicrobial family to which they belong.

followed by macrolides-lincosamides, tetracycline, and trimethoprim-sulfamethoxazole (20 strains, profile P15).

Prevalence of antimicrobial resistance according to the isolation period, serotype, geographical origin, host, and pathotype

A significant decrease in resistance to TMPS occurred between the two periods with a proportion of resistant strains dropping from 23.5% (20/85) before 2010 to 10.4% (12/115) after 2015 ($P < 0.035$).

Serotype 2 was over-represented among lincomycin-susceptible strains with 20 strains out of 61, i.e., 33% ($P = 0.001$). Interestingly, penicillin resistance was associated ($P < 0.001$) with less common serotypes (two strains of serotypes 11 and 12, and one strain of serotypes 1, 5, 9, 15, 27, and 29). A similar result was observed for tiamulin-resistant strains, there being an over-representation of the serotypes classified under “others,” with seven strains out of 16 from serotype 1 or 9 (three and four strains, respectively) compared with nine strains from serotypes 5, 12, 15, 16, 27, 29, and 31 (1, 2, 1, 1, 1, 1, and 2 strains, respectively) ($P < 0.001$). Strains with these serotypes are less frequent and thus less studied than the others. Finally, among the 32 TMPS-resistant strains, there was an over-representation ($P \leq 0.01$) of serotypes “1/2” (nine strains), “others” (seven strains), and serotype 3 (six strains).

The resistance profiles of the strains can also be correlated with their geographical origin. An over-representation of resistance to the macrolide and lincosamide families and penicillin was observed in strains collected in Brittany (erythromycin, $P = 0.017$; tilmicosin, $P = 0.017$; tylosin, $P = 0.012$; clindamycin, $P = 0.019$; lincomycin, $P = 0.019$; and penicillin, $P = 0.016$).

Furthermore, strains isolated from humans or wild boars appear to have fewer acquired resistance mechanisms to macrolides (erythromycin, $P < 0.001$; tilmicosin, $P < 0.001$; tylosin, $P < 0.001$), lincosamides (clindamycin, $P = 0.002$; lincomycin, $P = 0.001$), and tetracycline ($P = 0.003$) than strains isolated from pigs. However, these results must be taken with caution since, in the collection, the number of strains isolated from humans or wild boar ($n = 22$) is much lower than the number of strains isolated from pigs ($n = 178$).

Finally, regarding the correlations between resistance profiles and pathotypes, penicillin and TMPS resistances are more frequently found in “non-clinical” or “respiratory” isolates ($P < 0.001$, $P = 0.011$, respectively) than in systemic isolates.

The MFA, confirmed by Chi-squared test, revealed an association between antimicrobial resistances to tetracycline, macrolides (tylosin, erythromycin, and tilmicosin), and lincosamides (lincomycin and clindamycin) ($P < 0.001$) and between resistances to penicillin and tiamulin ($P < 0.001$) (Fig. 2A). An association between TMPS resistance and lincosamides (lincomycin and clindamycin) resistance was also observed, but to a lesser extent ($P = 0.042$).

The MCA (Fig. 2B) and Chi-squared test revealed a statistically significant link between a systemic pathotype and an antimicrobial resistance to macrolides and/or lincosamides and/or tetracyclines. A significant link was also found between the serotype “others,” the geographical origin “Brittany,” the pathotypes “non-clinical” or “respiratory,” and resistance to beta-lactams and pleuromutilin. The Chi-squared test also showed the influence of serotypes and pathotypes on the resistance profiles observed in this study ($P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively).

DISCUSSION

In this study, the NRI method was applied to calculate COWT values in order to distinguish the *S. suis* strains with or without acquired resistance to 22 antibiotics (non-wild type: NWT or wild type: WT, respectively). When the COWT calculation was not possible, the strain was categorized using the threshold diameters described in the literature (22, 25–27) and observations of the measured diffusion diameters. Five antibiotics are documented with MICs for *S. suis* in the CLSI’s VET01S (22) (penicillin G, ceftiofur, enrofloxacin, florfenicol, and tetracycline), but interpretation diameters are given for only two of them (ceftiofur and florfenicol). The COWT values obtained with the NRI method for ceftiofur and florfenicol in this work do not differ more than 2 mm from the interpretation diameters indicated in the CLSI’s VET01S for *S. suis* (22). Likewise,

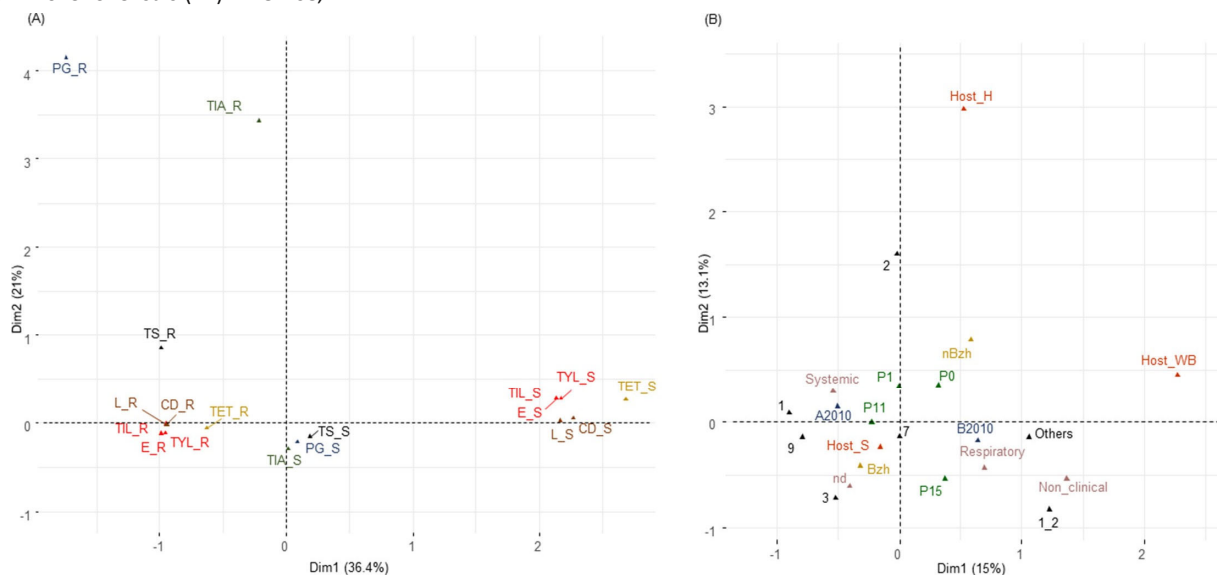


FIG 2 Comparative analysis of the resistance profiles of 200 strains of *S. suis* isolated in France against antibiotics belonging to different families. (A) Multiple factor analysis of antibiotic resistances: the different antibiotics belonging to the same family are represented using the same color code. Yellow was attributed to tetracycline, brown to lincosamides, red to macrolides, and blue, gray, and black to penicillin, tiamulin, and trimethoprim-sulfamethoxazole, respectively. Resistances are noted as “_R” and susceptibilities as “_S”. TET, tetracycline; L, lincomycin; CD, clindamycin; E, erythromycin; TIL, tilmicosin; TYL, tylosin; PG, penicillin G; TIA, tiamulin; TS, trimethoprim-sulfamethoxazole. (B) Multiple correspondence analysis of all variables; in blue, black, yellow, red, and pink are active variables (which were used to build the MCA): isolation periods before 2010 (B2010) and after 2015 (A2010), serotypes (1, 1/2, 2, 3, 7, 9, Others), geographical origins (Brittany: Bzh, other regions of France: nBzh), hosts (swine, S; wild boars, WB; humans, H), and pathotypes (systemic, respiratory, and non-clinical), respectively; in green are additional variables (resistance profiles) (the correspondence table of the resistance profiles is available as additional data, Table S2).

the interpretation diameters indicated for *Streptococcus* spp. only differ by 2 mm at most from the COWT values obtained with the NRI method for chloramphenicol and vancomycin.

No strain appeared resistant to linezolid (oxazolidinone), quinupristin-dalfopristin (streptogramins A + B), vancomycin (glycopeptides), and gentamicin (to a high concentration level). Oxazolidinone (linezolid) appears to be very efficient against most Gram-positive bacteria, including pathogens of importance for human health (29). To our knowledge, *S. suis* resistance to linezolid and more broadly to the oxazolidinone family has only been

reported in Asia in recent years (30–34). Two genes conferring two types of resistance mechanisms are known in the literature, the *cfr* gene (coding an rRNA methyltransferase) and the *optrA* gene (coding an ABC transporter) (35). The absence of resistance to linezolid in our collection of strains confirms that this resistance is not present or very rare in *S. suis* in France. Streptogramins are used against numerous highly resistant pathogens and are therefore classified as antibiotics for last-resort human therapy (36, 37). Streptogramin A resistance in *S. suis* conferred by the *cfr* gene and *lsa(E)* gene (coding an ABC transporter) has only been described in a few genomics studies (29, 30, 34, 38, 39). These genes are combined with an *erm(B)* gene in order to provide resistance to the quinupristin-dalfopristin combination tested in our work. Vancomycin is among the last-resort antimicrobial agents for the treatment of multidrug-resistant Gram-positive bacterial infections (40). Resistance to vancomycin has been reported in China but not yet in Europe, and more specifically in France, to our knowledge (32, 40). This can be explained by the difference in use specific to each country and the nature of this resistance, as resistance is due to the presence of the VanG-type resistance operon (40). *S. suis* has a naturally low level of resistance to aminoglycosides. This family of antibiotics is currently used in combination with beta-lactams in veterinary practice and is among the critically important antimicrobials (37). High-level resistance to aminoglycosides is due to several genes encoding three types of target modification enzymes leading to their inactivation, and are encoded by the *aac*, *aph*, and *ant* genes (35). The Resapath network indicated the presence, in France, of a low rate (<2%) of high-level resistance in *S. suis* isolated from diseased pigs in 2019 (2% for streptomycin, 4% for kanamycin, and 0% for gentamicin) (17). Our results are therefore in accordance with Resapath findings.

Using the NRI cut-off, none of the *S. suis* strains appeared resistant to the two phenicols tested (chloramphenicol and florfenicol). The resistance mechanisms to phenicols are mediated by the *cfr* and *optrA* genes discussed above, which confer resistance to linezolid. Another resistance mechanism is chloramphenicol acetyl-transferase mediated by the *cat* gene (35). In Europe, phenicol resistance in *S. suis* is less common than in Asia (35). Thus, the absence of resistance observed in this study is consistent with the observations reported in the literature (18, 26).

Only one strain resistant to fluoroquinolones was identified in our collection. The resistance was confirmed by MIC determination. This serotype-5 strain, isolated in 2009, has a multiresistance profile as it is also resistant to macrolides-lincosamides, tetracycline, pleuromutilin, diaminopyrimidine-sulfonamide, and penicillins. In Asia, the reported resistance rate to enrofloxacin is higher (21–32.8% before 2010 and 28.8% after 2010) than in both Europe (2% before 2010 and 1–5.3% after 2010) and North America (1.4% between 2006 and 2016) (25, 27, 41–43). The resistance rate measured in our work is consistent with the rate measured in Europe. Fluoroquinolone usage represents 2.4% of the total use of antibiotics in global pig production (12). Two types of resistance mechanisms have been described in the literature as follows: mutations in the targets of fluoroquinolones (DNA gyrase and topoisomerase IV) and efflux by an ABC transporter [*sat(A)* and *sat(B)* genes] (35).

Among the 200 strains tested, 5% was resistant to at least one antibiotic of the beta-lactam family. In France, the Resapath network registered a resistance rate to beta-lactams lower than 5% in 2019 (17). In Asia, the resistance rate to ampicillin (0.6–23% before 2010) is higher than both North America (2.3–3% before 2010 and 0.6% after 2010) and South America (0.5%) (25, 27, 44). Resistance to ampicillin was reported to be lower than resistance to penicillin or ceftiofur (35). This is the case in our study for penicillin with three strains resistant to ampicillin and 10 strains resistant to penicillin G. A decrease in penicillin G resistance has been observed in North America (14–14.5% before 2010 dropping to 6.9% after 2010), whereas the resistance rate remains stable in Asia and Europe (respectively 0.9–27% and 13.5% in Asia, and 0–13% and 2.6–5% in Europe before and after 2010) (25, 43). In this study, no difference between the two time periods was observed, in accordance with the literature. Overall, the resistance rate measured in this study is similar to the rate reported in Europe (Denmark, England, and Sweden) but lower than the rate measured in North America and Asia (25–27, 41, 43). Penicillins—and especially amoxicillin—are the molecules used for first-line treatment of *S. suis* infections. Thus, investigations were pursued on the 10 *S. suis* strains resistant to beta-lactams. The determination of the MIC indicated that 10 strains were resistant to penicillin. All the strains resistant to penicillin were

Full-Length Text

isolated from pigs in Brittany, and were categorized as “non-clinical” for five strains, “respiratory” for one strain, and “systemic” for one strain, while the pathotype of three other strains was unknown. The resistant strains belong to various serotypes and were isolated at different periods of time: serotypes 1 (one strain), 5 (one strain), 9 (one strain), 11 (two strains), 12 (two strains), 27 (two strains), and 29 (one strain). In this study, none of the strains tested were resistant to cephalosporins. This is in accordance with the much lower level of resistance to cephalosporin described in Europe (0.7% before 2010 and 0% after 2010) than in Asia and North America (0.6–23% before 2010 and 0.9% after 2010 for Asia and 1–23.1% before 2010 and 9.3% after 2010 for North America) (25). Resistance to beta-lactams is due to modifications within the signal peptide region of certain penicillin-binding proteins (*mraY* gene) (39).

Some of the strains tested showed acquired resistance mechanisms against pleuromutilins (8% of the strains are resistant to tiamulin). No data are available from Resapath for comparison. Resistance of *S. suis* to pleuromutilins has been observed worldwide (1.9% in Brazil and >10% in North America and Denmark) (27, 41, 44). In our study, the serotype seems to influence the pleuromutilins resistance profiles observed with three strains of serotype 1, four strains of serotype 9, and nine strains of serotype “others” (one strain of serotype 5, two strains of serotype 12, one each of serotypes 15, 16, 27, and 29, and two strains of serotype 31). Tiamulin is the third most used drug in pig production (12, 41), being prescribed for swine dysentery, colitis or ileitis, and pneumonia (45). Resistance mechanisms are encoded by two genes, the *cfp* gene and the ABC-transporter *Isa(E)* (33). Trimethoprim-sulfamethoxazole resistance was encountered in 16% of the studied strains (13% registered by the Resapath network) (17). Before 2010, North America had a low resistance rate (1–1.2%), while in Asia and Europe, resistance rates were variable (0–59.1% and 0–51.5%, respectively) (25). After 2010, the resistance rate in North America (2%) was still low (27). In Europe, the resistance rate appears to be around 10% (8.6% in Denmark and 12% in England), i.e., in the same range as observed in our strain collection (26, 41). Trimethoprim-sulfamethoxazole is an old antibiotic combination used in pig production (12). In our study, the resistance rate to these antibiotics differs according to the isolation period with a significant reduction in resistance between the two time periods. One third of the resistant strains were of serotype 1/2. Finally, among the 30 strains classified as “respiratory,” 11 were TMPS resistant.

A high proportion of strains resistant to macrolides-lincosamides was observed (71%). In France, the Resapath annual report indicated in 2019 a figure of 60% for resistance to macrolides and lincosamides (54% for erythromycin, 65% for tylosin, 58% for spiramycin, and 61% for lincomycin) (17). The resistance rate measured in this study is thus above that reported by Resapath but in the range described in Europe (up to 75% for erythromycin and 8%–87.4% for clindamycin) (25). The erythromycin resistance rate increased in Asia after 2010 (96.8% in China) (43) but appears to have decreased in some European countries (48% in Denmark and 46% in England) (26, 41). Variations in the rate of resistance to macrolides-lincosamides are observed worldwide, possibly explained by the usage of macrolides in pig production (12). In our study, differences in resistance were observed according to the geographical origin of the strains and the host, with a significant concentration of resistance in porcine isolates from Brittany.

A high proportion of resistance was also observed for tetracycline (81%) in accordance with the data from the Resapath network (17), which reported a resistance rate of 79% to tetracycline for *S. suis* isolated from pigs in 2019. In North America and Asia, resistance rates measured for tetracycline (87–100% and 86.9–96%, respectively) were higher for strains isolated before 2010. In Europe, the resistance rate before 2010 was relatively heterogeneous, ranging from 48% in the Netherlands to 95.4% in Spain (25). After 2010, tetracycline resistance rates in Asia (97.8% in China) and Europe (75% in Denmark and 91% in England) were still high (26, 41, 43). In North America, resistance to oxytetracycline was also high (95.4%) (27). These observations are explained by the worldwide use of tetracyclines in all pig production stages (first class of antibiotics used) (12). In our study, no change was observed in the rate of tetracycline resistance between the two time periods studied. As for macrolides-lincosamides, resistance to tetracyclines was higher in pigs than in humans or wild boars. The mechanisms of tetracycline resistance have been well studied.

Full-Length Text

They include efflux pumps and ribosome protection proteins (35). The existence of numerous resistance genes may explain the diversity of the inhibition diameters observed.

In our study, 138 strains were classified as multi-resistant. Among them, the most common resistance pattern observed was the macrolides-lincosamides-tetracycline pattern (97 strains). This agrees with the association between resistance to tetracycline and macrolides-lincosamides detected by MFA. This resistance pattern is the most frequently described in the literature and generally results from a co-localisation of a tetracycline resistance gene with an *erm(B)* gene on mobile genetic elements (25–27, 35, 41, 42, 44, 46, 47). Macrolides and tetracyclines are among the most frequently used antibiotics in pig production worldwide (12). The World Health Organization has also defined them, among others, as critically (macrolides) or highly (lincosamides and tetracyclines) important antimicrobials for human medicine (36). In our study, antibiotics used exclusively in veterinary or human medicine as well as antibiotics used in both spheres were tested against strains isolated from swine, wild boars, and humans. There do not appear to be differences in the resistance profiles of these strains in terms of the type of medical field in which these antibiotics are used. The strain collection used for our study includes a small number of human ($n = 13$) and wild boar ($n = 9$) isolates, and it would be beneficial to test more strains in order to confirm these results. However, this shows the presence of these resistance genes as well as their persistence given the lack of selection pressure for some molecules. Among all the strains tested (200), three showed resistance to six antimicrobial families: beta-lactams, macrolides, lincosamides, pleuromutilins, tetracyclines, and trimethoprim-sulfamethoxazole. These strains belong to the least represented serotypes (5, 27, and 29) in our collection and were of non-determined pathotype “not determined,” “non-clinical,” and “respiratory” isolates, respectively.

In order to observe the potential impact of the French EcoAntibio plan intended to reduce the prescription, sale, and consumption of antibiotics, we analyzed strains isolated before 2010 and strains isolated after 2015. A significant change ($P = 0.035$) in the TMPS resistance rate was observed (63% of resistant strains before 2010 and 38% after 2010) in our collection. Between 2011 and 2019, the exposure of pigs to this antimicrobial fell by 60.6% in France (17), which could have a positive impact on the reduction of TMPS resistance in *S. suis*. In France, more than half of the national pig production is concentrated in Brittany. Overall, strains from this region appear significantly more resistant than those from other French regions. In the literature, the impact of the close proximity of pigs on the spread of resistance has already been studied at the scale of a few herds (48) or in a country, and the link between the intensity of animal production and the spread of resistance has been proven (27, 39, 41).

Some resistances were associated with particular serotypes. This is the case for penicillin resistance found in infrequent serotypes. Further studies are needed to explain these associations. It has been suggested that the serotype could predict the pathotype of *S. suis* strains (5). The significant link observed in our study between “non-clinical” or “respiratory” and serotypes other than serotypes 1, 2, 7, and 9 (serotypes called “other”) supports this hypothesis. In addition, Hadjirin et al. pointed out a higher MIC in non-clinical isolates (39). In our study, a statistically significant link was observed between the pathotypes “non-clinical” or “respiratory” and resistance to penicillin and pleuromutilins. This agrees with a previous report on resistance to beta-lactams mainly found in commensal strains (1). It would therefore be beneficial to study these strains, which could serve as a reservoir of resistance genes. Weinert et al. suggested that the respiratory tract is more ecologically diverse than systemic locations (4). This environment could facilitate the appearance of resistance mutations and the horizontal gene transfer of mobile genetic elements. Since most resistance genes are carried by mobile genetic elements in *S. suis* (49), this would lead to an enrichment of “non-clinical” strains in resistance genes. To effectively combat antibiotic resistance, it appears vital to improve understanding of antimicrobial resistance in all serotypes, but especially those not frequently studied, but which can act as a reservoir of resistance genes for other bacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

Full-Length Text

The automatic and manual excel programs used for the cut-off values were made available through the courtesy of P. Smith, W. Finnegan, and G. Kronvall.

AUTHOR AFFILIATIONS

¹ANSES, Mycoplasma, Bacteriology and Antimicrobial Resistance Unit, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Ploufragan, France

²Université de Lorraine, INRAE, DynAMic, Nancy, France

³LABOCEA, Zoopôle CS 30054, Ploufragan, France

⁴ANSES, Epidemiology, Health and Welfare Unit, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Ploufragan, France

AUTHOR ORCID*s*

Corinne Marois-Créhan  <http://orcid.org/0000-0002-7370-9382>

FUNDING

This research received no external funding, M.D-T. was supported by ANSES and INRAE.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Manon Dechêne-Tempier, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Validation, Writing – original draft, Writing – review and editing | Eric Jouy, Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Validation, Writing – review and editing | Marie-Hélène Bayon-Auboyer, Validation, Writing – review and editing | Stéphanie Bougeard, Data curation, Investigation, Validation, Writing – review and editing | Claire Chauvin, Investigation, Validation, Writing – review and editing | Virginie Libante, Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Validation, Writing – review and editing | Sophie Payot, Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Validation, Writing – review and editing | Corinne Marois-Créhan, Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Supervision, Validation, Writing – review and editing

DIRECT CONTRIBUTION

M.D-T., E.J., C.M-C., V.L., and S.P. contributed to funding acquisition, study design, and conceptualization. M.D-T., C.M-C., V.L., S.P., and M-H-B-A. contributed to strains selections and supply. M.D-T., E.J., C.M-C., V.L., S.P., and S.B. contributed to investigation and data curation. S.B., C.C., and M.D-T. contributed to statistical analyses. M.D-T. contributed to formal analysis and writing the original draft. C.M-C., V.L., S.P., E.J., S.B., C.C., and M-H-B-A. contributed to validation. M.D-T., C.M-C., V.L., S.P., E.J., S.B., C.C., and M-H-B-A. contributed to writing, reviewing, and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

ADDITIONAL FILES

The following material is available [online](#).

Supplemental Material

Table S1 (JCM00164-23-S0001.xlsx). Antibiotic susceptibility of *S. suis* strains (n = 200) collected in France.

Table S2 (JCM00164-23-S0002.xlsx). Antibiotic susceptibility/resistance profiles of *S. suis* strains (n = 200) collected in France.

REFERENCES

- Segura M. 2020. *Streptococcus suis* research: progress and challenges. Pathogens 9:707. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090707>
- Goyette-Desjardins G, Auger JP, Xu J, Segura M, Gottschalk M. 2014. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. Emerg Microbes Infect 3:e45. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.45>
- Lacouture S, Olivera YR, Mariela S, Gottschalk M. 2022. Distribution and characterization of *Streptococcus suis* serotypes isolated from January 2015 to June 2020 from diseased pigs in Québec, Canada. Can J Vet Res 86:78–82.
- Weinert LA, Chaudhuri RR, Wang J, Peters SE, Corander J, Jombart T, Baig A, Howell KJ, Vehkala M, Välimäki N, Harris D, Chieu TTB, Chau NVV,

- Campbell J, Schults C, Parkhill J, Bentley SD, Langford PR, Rycroft AN, Wren BW, Farrar J, Baker S, Hoa NT, Holden MTG, Tucker AW, Maskell DJ, BraDP1T Consortium. 2015. BraDP1T consortium. Genomic signatures of human and animal disease in the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. Nat Commun 6:7272. <https://doi.org/10.1038/ncomms8272>
5. Estrada AA, Gottschalk M, Rossow S, Rendahl A, Gebhart C, Marthaler DG. 2019. Serotype and genotype (multilocus sequence type) of *Streptococcus suis* isolates from the United States serve as predictors of pathotype. J Clin Microbiol 57:1–16. <https://doi.org/10.1128/JCM.00377-19>
 6. Dong X, Chao Y, Zhou Y, Zhou R, Zhang W, Fischetti VA, Wang X, Feng Y, Li J. 2021. The global emergence of a novel *Streptococcus suis* clade associated with human infections. EMBO Mol Med 13:e13810. <https://doi.org/10.15252/emmm.202013810>
 7. Salaneuve K, Meunier A, Aubry K. 2020. Bilateral total deafness after preparation of wild boar meat. Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis 137:419–421. <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2020.03.006>
 8. Malézieux-Picard A, De Monte A, Degand N, Grech C, Raffaelli C, Dellamonica J, Danin P-E, Dauwalder O, Cua E, Risso K. 2016. *Streptococcus suis* meningitis in a French cooker. J Infect Dis 6:136–139. <https://doi.org/10.5799/jmid.328990>
 9. Anses. 2021. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2020. Rapport annuel. Anses-ANMV, France. Available from: https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-RaAntibiotiques2020_0.pdf
 10. Jensen VF, Jorsal SEL, Toft N. 2017. A cross-sectional study of oral antibacterial treatment patterns in relation to specific diarrhoeal pathogens in weaner pigs. Vet Microbiol 203:18–27. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.01.038>
 11. Hémonic A, Chauvin C, Delzescaux D, Verliat F, Corrégié I, French Working Group ‘antimicrobials in the swine industry. 2018. Reliable estimation of antimicrobial use and its evolution between 2010 and 2013 in French swine farms. Porcine Health Manag 4:8. <https://doi.org/10.1186/s40813-018-0084-7>
 12. Lekagul A, Tangcharoensathien V, Yeung S. 2019. Patterns of antibiotic use in global pig production: a systematic review. Vet Anim Sci 7:100058. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100058>
 13. Poissonnet A, Corrégié I, Chauvin C, Hémonic A. 2022. Panel INAPORC, suivi des usages d’antibiotiques en élevage de porcs en France entre 2010, 2016 et 2019. Journées Recherche Porcine 54:369–370.
 14. Apley MD, Bush EJ, Morrison RB, Singer RS, Snelson H. 2012. Use estimates of in-feed antimicrobials in swine production in the United States. Foodborne Pathog Dis 9:272–279. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0983>
 15. van Rennings L, von Münchhausen C, Otilie H, Hartmann M, Merle R, Honscha W, Käsbohrer A, Kreienbrock L. 2015. Cross-sectional study on antibiotic usage in pigs in Germany. PLoS One 10:e0119114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119114>
 16. World Health Organization. 2022. One Health. Available from: <https://www.who.int/europe/initiatives/one-health>. Retrieved 2 Dec 2022.
 17. Anses. 2021. Resapath - French surveillance network for antimicrobial resistance in bacteria from diseased animals, annual report on 2019 data, Lyon et ploufragan-plouzane-niort, France. Available from: https://resapath.anses.fr/resapath_uploadfiles/files/Documents/Rapport%20annuel/2019_Resapath_Annual%20report_GB.pdf
 18. Hendriksen RS, Mevius DJ, Schroeter A, Teale C, Jouy E, Butaye P, Franco A, Utinane A, Amado A, Moreno M, Greko C, Stärk KDC, Berghold C, Myllyniemi AL, Hozowski A, Sunde M, Aarestrup FM. 2008. Occurrence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and indicator bacteria in pigs in different European countries from year 2002 - 2004: The ARBAO-II study. Acta Vet Scand 50:19. <https://doi.org/10.1186/17510147-50-19>
 19. Marie J, Morvan H, Berthelot-Hérault F, Sanders P, Kempf I, Gautier-Bouchardon AV, Jouy E, Kobisch M. 2002. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from swine in France and from humans in different countries between 1996 and 2000. J Antimicrob Chemother 50:201–209. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf099>
 20. Okura M, Lachance C, Osaki M, Sekizaki T, Maruyama F, Nozawa T, Nakagawa I, Hamada S, Rossignol C, Gottschalk M, Takamatsu D. 2014. Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. J Clin Microbiol 52:1714–1719. <https://doi.org/10.1128/JCM.03411-13>
 21. CLSI. 2018. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria from animals. 5th ed. CLSI standard VET01. Wayne, PA Clinical and Laboratory Standards Institute
 22. CLSI. 2020. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria from animals. 5th ed. CLSI supplement VET01S. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 23. Kronvall G, Smith P. 2016. Normalized resistance interpretation, the NRI method: review of NRI disc test applications and guide to calculations. APMIS 124:1023–1030. <https://doi.org/10.1111/apm.12624>
 24. Baron S, Granier SA, Larvor E, Jouy E, Cineux M, Wilhelm A, Gassilloud B, Le Bouquin S, Kempf I, Chauvin C. 2017. Aeromonas diversity and antimicrobial susceptibility in freshwater-an attempt to set generic epidemiological cut-off values. Front Microbiol 8:503. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00503>
 25. Varela NP, Gadbois P, Thibault C, Gottschalk M, Dick P, Wilson J. 2013. Antimicrobial resistance and prudent drug use for *Streptococcus suis*. Anim Health Res Rev 14:68–77. <https://doi.org/10.1017/S1466252313000029>
 26. Hernandez-Garcia J, Wang J, Restif O, Holmes MA, Mather AE, Weinert LA, Wileman TM, Thomson JR, Langford PR, Wren BW, Rycroft A, Maskell DJ, Tucker AW. 2017. Patterns of antimicrobial resistance in *Streptococcus suis* isolates from pigs with or without Streptococcal disease in England between 2009 and 2014. Veterinary Microbiology 207:117–124. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.06.002>
 27. Hayer SS, Rovira A, Olsen K, Johnson TJ, Vannucci F, Rendahl A, Perez A, Alvarez J. 2020. Prevalence and time trend analysis of antimicrobial resistance in respiratory bacterial pathogens collected from diseased pigs in USA between 2006–2016. Res Vet Sci 128:135–144. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.11.010>
 28. Lê S, Josse J, Rennes A, Husson F. 2008. Factominer: an R package for multivariate analysis. J Stat Softw 25:1–18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
 29. Shen J, Wang Y, Schwarz S. 2013. Presence and dissemination of the multiresistance gene CFR in gram-positive and gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother 68:1697–1706. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt092>
 30. Wang Y, Li D, Song L, Liu Y, He T, Liu H, Wu C, Schwarz S, Shen J. 2013. First report of the multiresistance gene CFR in *Streptococcus suis*. Antimicrob Agents Chemother 57:4061–4063. <https://doi.org/10.1128/AAC.00713-13>
 31. Huang J, Chen L, Wu Z, Wang L. 2017. Retrospective analysis of genome sequences revealed the wide dissemination of *optrA* in gram-positive bacteria. J Antimicrob Chemother 72:614–616. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw488>
 32. Du F, Lv X, Duan D, Wang L, Huang J. 2019. Characterization of a Linezolid- and vancomycin-resistant *Streptococcus suis* isolate that harbors *optrA* and VanG Operons. Front Microbiol 10:2026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02026>
 33. Huang J, Sun J, Wu Y, Chen L, Duan D, Lv X, Wang L. 2019. Identification and pathogenicity of an XDR *Streptococcus Suis* isolate that harbours the phenicol-oxazolidinone resistance genes *optrA* and CFR, and the Bacitracin resistance locus bcrABDR. Int J Antimicrob Agents 54:43–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.04.003>
 34. Yang M, Li XS, Li D, Shang Y, Yu R, Schwarz S, Huang Z, Du XD. 2020. Two novel *Isa(E)*-Carrying mobile genetic elements in *Streptococcus suis*. J Antimicrob Chemother 75:2689–2691. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa199>
 35. Dechêne-Tempier M, Marois-Créhan C, Libante V, Jouy E, LeblondBourget N, Payot S. 2021. Update on the mechanisms of antibiotic resistance and the mobile resistome in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis* Microorganisms 9:1765. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081765>
 36. Mast Y, Wöhlleben W. 2014. Streptogramins - two are better than one Int J Med Microbiol 304:44–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.08.008>
 37. WHO. 2017. Advisory group on integrated surveillance of antimicrobial resistance. critically important antimicrobials for human medicine: ranking

- of antimicrobial agents for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255027>. Retrieved 02 Dec 2022.
38. Bojarska A, Molska E, Janas K, Skoczyńska A, Stefaniuk E, Hryniewicz W, Sadowy E. 2016. *Streptococcus suis* in invasive human infections in Poland: clonality and determinants of virulence and antimicrobial resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35:917–925. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2616-x>
 39. Hadjirin NF, Miller EL, Murray GGR, Yen PLK, Phuc HD, Wileman TM, Hernandez-Garcia J, Williamson SM, Parkhill J, Maskell DJ, Zhou R, Fittipaldi N, Gottschalk M, Tucker AWD, Hoa NT, Welch JJ, Weinert LA. 2021. Large-scale genomic analysis of antimicrobial resistance in the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *BMC Biol* 19:191. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01094-1>
 40. Huang J, Chen L, Li D, Wang M, Du F, Gao Y, Wu Z, Wang L. 2018. Emergence of a vanG-carrying and multidrug resistant ICE in zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* 222:109–113. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.07.008>
 41. Holmer I, Salomonsen CM, Jorsal SE, Astrup LB, Jensen VF, Høg BB, Pedersen K. 2019. Antibiotic resistance in porcine pathogenic bacteria and relation to antibiotic usage. *BMC Vet Res* 15:449. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2162-8>
 42. Werinder A, Aspán A, Backhans A, Sjölund M, Guss B, Jacobson M. 2020. *Streptococcus suis* in Swedish grower pigs: occurrence, serotypes, and antimicrobial susceptibility. *Acta Vet Scand* 62:36. <https://doi.org/10.1186/s13028-020-00533-3>
 43. Zhang C, Zhang P, Wang Y, Fu L, Liu L, Xu D, Hou Y, Li Y, Fu M, Wang X, Wang S, Ding S, Shen Z. 2020. Capsular serotypes, antimicrobial susceptibility, and the presence of transferable oxazolidinone resistance genes in *Streptococcus suis* isolated from healthy pigs in China. *Vet Microbiol* 247:108750. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108750>
 44. Matajira CEC, Moreno LZ, Poor AP, Gomes VTM, Dalmutt AC, Parra BM, Oliveira CH de, Barbosa MRF, Sato MIZ, Calderaro FF, Moreno AM. 2019. *Streptococcus suis* in Brazil: genotypic, virulence, and resistance profiling of strains isolated from pigs between 2001 and 2016. *Pathogens* 9:31. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010031>
 45. van Duijkeren E, Greko C, Pringle M, Baptiste KE, Catry B, Jukes H, Moreno MA, Pomba MCMF, Pyörälä S, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Torren-Edo J, Törneke K. 2014. Pleuromutilins: use in food-producing animals in the European union, development of resistance and impact on human and animal health. *J Antimicrob Chemother* 69:2022–2031. <https://doi.org/10.1093/jac/dku123>
 46. van Hout J, Heuvelink A, Gonggrijp M. 2016. Monitoring of antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* in the Netherlands, 2013–2015. *Vet Microbiol* 194:5–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.03.014>
 47. Zhang C, Zhang Z, Song L, Fan X, Wen F, Xu S, Ning Y. 2015. Antimicrobial resistance profile and genotypic characteristics of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolated from clinical carrier sows and diseased pigs in China. *Biomed Res Int* 2015:284303. <https://doi.org/10.1155/2015/284303>
 48. Niemann L, Müller P, Brauns J, Nathaus R, Schäkel F, Kipschull K, Höltig D, Wendt M, Schwarz S, Kadlec K. 2018. Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of respiratory tract pathogens in weaner pigs over a 12-month period. *Vet Microbiol* 219:165–170. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.030>
 49. Libante V, Nombre Y, Coluzzi C, Staub J, Guédon G, Gottschalk M, Teatero S, Fittipaldi N, Leblond-Bourget N, Payot S. 2019. Chromosomal conjugative and mobilizable elements in *Streptococcus suis*: major actors in the spreading of antimicrobial resistance and bacteriocin synthesis genes. *Pathogens* 9:22. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010022>

II. Caractérisation des gènes de virulence, de résistance aux antimicrobiens portés par des éléments génétiques mobiles et de compétence chez des souches de *Streptococcus suis* isolées en France.

Article 2 : " Characterization of virulence traits, antimicrobial resistance genes carried by mobile genetic elements and competence in *Streptococcus suis* strains isolated in France"

Cet article sera soumis très prochainement à la revue Microbial Genomics.

Une collection de 102 souches de *S. suis* isolées chez l'Homme, le porc et le sanglier en France a été soumise à un séquençage de génome afin de (1) réaliser un typage moléculaire des souches (détermination des ST et CC), (2) définir leur contenu en gènes associés à la virulence, (3) décrypter les mécanismes responsables de leur résistance antimicrobienne et leur association avec des éléments génétiques mobiles (EGM) et (4) évaluer leur capacité à acquérir de l'ADN extracellulaire par transformation naturelle. L'analyse hiérarchique des composantes principales a mis en évidence quelques facteurs associés à la virulence qui distinguent les souches invasives CC1 des autres souches. Une pléthore de gènes d'AbR a été trouvée dans les génomes. Outre les gènes *erm(B)* et *tet(O)* fréquemment signalés, des gènes d'AbR plus récemment décrits ont été identifiés (*vga(F)/sprA* et *vat(D)*). La majorité des souches possèdent l'ensemble des gènes nécessaires à la compétence. Le risque de dissémination de ces gènes d'AbR ne doit donc pas être négligé. Les ST principalement retrouvés dans notre collection de souches sont : ST1(n=29), suivi par la ST16 (n=14) et la ST28 (n=11). Le typage MLST a aussi mis en évidence la présence de 31 nouveaux ST, qui ont toutes été ajoutées à la base de données pubMLST (<https://pubmlst.org/>).

Des analyses statistiques (classification hiérarchique sur composantes principales et tests de chi2) ont révélé une association de gènes de virulence particuliers chez les souches appartenant aux CC1, CC16 et CC28, majoritairement retrouvés chez les cas cliniques. Ces analyses ont également montré une corrélation entre la distribution des phérotypes et les CC. Le phérotypage I est associé aux CC1 et CC16 et le phérotypage II au CC28. L'identification des gènes d'AbR dans les génomes souligne une diminution de leur fréquence chez les souches isolées post-Plan EcoAntibio et un nombre statistiquement plus élevé de gènes d'AbR chez les souches non-cliniques. De plus, l'identification des gènes d'AbR a confirmé leur localisation prépondérante sur des ICE/IME (85%). Près de la moitié des souches porte un IME ou un résidu d'IME, contenant des gènes de résistance à la tétracycline et aux macrolides-lincosamides,

inséré dans un ICE de la famille *Tn5252*. Ces analyses mettent en évidence l'existence chez ces souches d'un potentiel élevé de propagation des gènes d'AbR.

1 **Characterization of virulence traits, antimicrobial** 2 **resistance genes carried by mobile genetic elements and** 3 **competence in *Streptococcus suis* strains isolated in** 4 **France**

5 **1.1 Author names**

6 Manon Dechêne-Tempier^{1,2}, Corinne Marois-Créhan¹ [<https://orcid.org/0000-0002-7370-9382>], Claire
7 de Boisséson¹, Pierrick Lucas³ [<https://orcid.org/0000-0002-2844-6157>], Stéphanie Bougeard³
8 <https://orcid.org/0009-0002-4729-5355>, Virginie Libante² [<https://orcid.org/0000-0001-9728-8343>]
9 and Sophie Payot^{2*} [<https://orcid.org/0000-0001-7266-3071>]

11 **1.2 Affiliation(s)**

12 ¹ Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Mycoplasmologie, Bactériologie et
13 Antibiorésistance, BP53 22440 Ploufragan, France.

14 ² Université de Lorraine, INRAE, DynAMic, F-54000 Nancy, France.

15 ³ Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Génétique Virale et Biosécurité, BP53 22440
16 Ploufragan, France.

17 ⁴ Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Épidémiologie, santé et bien-être, BP53
18 22440 Ploufragan, France.

20 **1.3 Corresponding author and email address**

21 Sophie Payot

22 E-mail: sophie.payot-lacroix@inrae.fr

24 **1.4 Keywords**

25 *Streptococcus suis*, resistance genes, virulence, Integrative Conjugative Elements, Mobilizable
26 elements, competence

28 **1.5 Repositories:**

29 Whole Genome Shotgun projects have been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession
30 numbers JAUTEI000000000-JAUTIF000000000, associated with BioProject PRJNA999611
31 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA999611>) (supplementary file S1).

32 2. Abstract

33 *Streptococcus suis* is a leading cause of infection in pigs, causing extensive economic losses. In
34 addition, it can also infect wild fauna and be responsible for severe infections in humans. Increasing
35 antimicrobial resistance (AMR) has been described in *S. suis* worldwide and most of the AMR genes
36 are carried by mobile genetic elements. This contributes to their dissemination by horizontal gene
37 transfer. A collection of 102 strains isolated from humans, pigs and wild-boars in France was subjected
38 to whole genome sequencing in order to: (i) study their genetic diversity, (ii) evaluate their content in
39 virulence-associated genes, (iii) decipher the mechanisms responsible for their antimicrobial
40 resistance and their association with mobile genetic elements (MGEs) and (iv) their ability to acquire
41 extracellular DNA by natural transformation. Hierarchical Clustering on Principal Components analysis
42 pointed out a few virulence-associated factors that distinguish invasive CC1 strains from the other
43 strains. A plethora of AMR genes was found in the genomes. Apart from the frequently reported
44 *erm(B)* and *tet(O)* genes, more recently described AMR genes were identified (*vga(F)/sprA*, *vat(D)*).
45 New AMR-MGE associations were detected. The majority of the strains have the full set of genes
46 required for competence. Hence the risk of dissemination of these AMR genes should not be
47 neglected.

48 3. Impact statement

49 The zoonotic pathogen *Streptococcus suis* is the causative agent of systemic diseases in pigs and
50 human, thus poses public health concerns. Increasing AMR and carriage of the AMR determinants by
51 MGEs have been reported for this bacterial species in many countries but data are scarce for strains
52 isolated in France. Using WGS, we analyzed 102 strains of different serotypes isolated in France (91, 8
53 and 3 strains isolated from pigs, humans and wild-boars respectively). We found that strains isolated
54 from upper or lower respiratory tract can carry up to 64 virulence-associated genes. A huge and high
55 amount of AMR genes were identified, most of them being carried by MGEs (in particular IMEs and
56 ICEs). New AMR genes-MGEs associations were identified. Having in mind the risk of dissemination of
57 AMR to other bacterial species, this study highlights the need for reinforcing surveillance of AMR in
58 *S. suis* not only for invasive strains but also for carriage strains.

59 4. Data summary

60 **The authors confirm all supporting data, code and protocols have been provided within the article**
61 **or through supplementary data files.**

62

63 5. Introduction

64 *Streptococcus suis* is an emerging zoonotic pathogen, causing invasive infections and substantial
65 economic losses in the pig industry worldwide. *S. suis* is classified in 29 serotypes on the basis of the
66 antigenicity of capsular polysaccharides (CPS) (1). In Europe, serotypes 2, 7 and 9 are dominant among
67 clinical pig isolates whereas, in humans, most clinical cases are associated with serotype 2 strains (2).
68 The nontypeable isolates that have been described harbor new variants of the *cps* locus (3–5).
69 Studying the population structure and the genetic diversity of *S. suis* is helpful to understand its
70 epidemiology. MLST is a popular molecular typing method applied to study genetic diversity in *S. suis*
71 (6). It helps defining sequence types (STs) and clonal complexes (CC) (7). There are currently 2337

72 MLST profiles defined for *S. suis* (<https://pubmlst.org/>, last update 2023-06-29) that can be grouped
73 in many CCs. The most important CCs causing infections in human and pigs are CC1, CC16, CC20, CC25,
74 CC28, CC94, CC104, CC233/379, and CC221/234 (6).

75 Several *S. suis* virulence factors have been characterized but it remains difficult to predict
76 pathotypes based on the presence or absence of those factors because strains from different
77 geographical areas seem to have different virulence profiles (8). Several studies have been published
78 on the virulence factors involved in the pathogenesis of American, Asian and some European strains
79 (8–13) but data are missing for strains isolated in France.

80 In *S. suis*, antimicrobial resistance (AMR) is mainly conferred by acquired genes located on mobile
81 genetic elements (MGEs), which are responsible for the dissemination between bacteria sharing the
82 same environment (14–16). Whole-genome sequencing (WGS) combined with comparative genomic
83 analyses was used to study AMR genes and their location on MGEs in *S. suis* strains isolated from
84 various countries (12,15,17,18). These studies showed that two categories of MGEs called Integrative
85 Conjugative Elements (ICEs) and Integrative Mobilizable Elements (IMEs) play an essential role in AMR
86 dissemination in *S. suis*. ICEs encode their own excision, transfer by conjugation and integration. In
87 addition to the genes involved or controlling their mobility, all ICEs carry cargo genes which can
88 provide properties (adaptation, virulence, antibiotic resistance) advantageous for their bacterial host
89 (19,20). IMEs also encode their own excision and integration in the bacterial chromosome but rely on
90 the conjugative apparatus of conjugative elements to transfer by conjugation. These mobile elements
91 have been less studied than ICEs because they are more difficult to identify in bacterial genomes,
92 particularly in streptococci since they are frequently found as composite elements (accretion with
93 other elements in tandem or integrated inside other genetic elements) (21,22).

94 Moreover, *S. suis*, like several other streptococci (*Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus*
95 *pneumoniae*, *Streptococcus mutans*), is naturally competent i.e. can capture extracellular DNA and
96 integrate this DNA in its chromosome (23). This other mechanism of gene transfer can participate to
97 the acquisition of AMR genes (located on MGEs or not) from the surrounding bacterial environment.
98 As described by Zaccaria et al (24), *S. suis* needs several systems in order to incorporate extracellular
99 DNA in its chromosome: components to produce (ComS), process (hypothesis of Eep protease
100 involvement), import (Opp peptide transport system) and detect pheromone (thanks to the
101 transcriptional regulator ComR), an alternative sigma factor (ComX), a DNA-binding pilus, a DNA
102 transport system and a recombination synapse enabling integration of DNA in the chromosome. Three
103 different phenotypes, associated with different clonal complexes, have been described in *S. suis* (25).

104 We recently described the antimicrobial susceptibilities of a collection of 200 *S. suis* strains isolated
105 from 1995 to 2020 in different regions of France from different hosts (human, pigs and wild boars)
106 (26). WGS was done on half of these strains (93 resistant strains and 9 strains susceptible to all
107 antibiotics) representative of the diversity of serotypes observed in the collection in order to
108 characterize (i) their genetic diversity, (ii) their virulence gene pattern, (iii) the genes conferring AMR
109 in these isolates and the genetic environment of those genes i.e. their location on MGEs as well as (iv)
110 their putative competence and phenotype.

111

112 6. Methods

113 6.1 Strains and growth culture

114 The collection of strains that was subjected to WGS include not only strains of the main serotypes
115 found in clinical human or animal infections but also less frequent serotypes (serotypes 5, 10, 11, 12,
116 14, 16, 18, 27, 29) (supplementary file S1).

117 Bacterial strains (n=102), stored at -80°C in buffered peptone water solution with glycerol (20%),
118 were sub-cultured on Columbia Agar with 5% Sheep Blood (BIO-RAD®) and incubated overnight at
119 37°C under 5% CO₂.

120 6.2 DNA extraction and Whole Genome Sequencing

121 DNA extraction was performed with the NucleoMag® Tissue kit from MACHEREY-NAGEL and the
122 DNA quality was checked with the Qubit™ ds DNA HS Assay kit from Invitrogen.

123 WGS sequencing was performed by the ANSES genomics platform with an Illumina Mi-Seq
124 equipment. The quality of the reads was checked using FastQC developed by S. Andrews (version
125 0.11.9, available at <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). De novo
126 assemblies were carried out using the Shovill pipeline developed by T. Seemann (available at
127 <https://github.com/tseemann/shovill>), with contigs of size higher than 200 nt and coverage higher
128 than 2. The quality of the assemblies was analyzed using Quast (Quality Assessment Tool for Genome
129 Assemblies) (27) and CheckM (28).

130 6.3 Genomic analyses

131 MLST typing was done using the pipeline developed by Athey et al. (29). MLST groups were
132 attributed with the scheme developed by King et al (30) using pubMLST (7) (<https://pubmlst.org/>).
133 New allele sequences and STs were uploaded to PubMLST to obtain the allele profiles and define the
134 genotypes. On the basis of their respective allele profiles, the *S. suis* isolates were clustered by using
135 the eBURST program (available as a plugin for the BIGSdb database software at <https://pubmlst.org/>).
136 When 6 of 7 alleles among the *S. suis* isolates were identical, these isolates were grouped in the same
137 cluster. Using this stringent group definition (6/7 shared alleles), isolates in a group defined by eBURST
138 are considered to belong to the same clonal complex (31,32). The isolates that did not belong to any
139 cluster were indicated as singletons.

140 A total of 70 genetic markers that can be associated with virulence (see list modified from Wileman
141 et al (33) in supplementary data file S2) was searched by local customBlast with the BlastX program
142 (E-value cut off e⁻²⁰) using the Geneious prime software (version 2023, Biomatters). A hit was retained
143 only if it shows more than 70% of amino acid identity with the query with at least 80% coverage.

144 Pseudocontigs were generated by aligning each set of contigs to 21 reference complete genomes
145 (see list in supplementary data file S3) using the MeDuSa draft genome scaffolder (34). Remaining
146 contigs were concatenated to the pseudocontig using Geneious prime software (version 2023,
147 Biomatters). Pseudocontigs were annotated with Prokka (35) using the reference strain BM407
148 (RefSeq accession number: GCF_000026745.1) and used as inputs for the recently described ICEScreen
149 pipeline (36) (version 0.4, <https://icescreen.migale.inrae.fr/>) in order to identify MGEs present in the
150 genomes. Elements combining the four signature proteins of ICEs (integrase, coupling protein,
151 relaxase and VirB4) were counted as putative ICEs and those with at least one pseudogene as defective

152 ICEs. Likewise, elements were considered as putative IMEs if they encode at least an integrase and a
153 relaxase and as defective IMEs if one of these genes is a pseudogene.

154 Annotated genomes were used as inputs for analysis by the Roary program (37) to extract and
155 make alignment of core genes (using the BlastP 95% default identity threshold, the “don’t split
156 paralogs” option and the more accurate codon aware alignment program). The distance matrix
157 obtained after this multi-FASTA alignment was then used to generate a phylogenetic tree of the strains
158 using the FastTree program (38). Genomic relatedness of the strains was also analyzed using dRep
159 (determination of Average Nucleotide Identity or ANI without primary clustering) (39).

160 The search for AMR genes was done by local customBlast with the BlastN program (E-value cut
161 off e^{-20}) using the Geneious prime software (version 2023, Biomatters), against the imported ResFinder
162 database developed by Zankari et al (40,41) (version 4.1., available at:
163 <http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) and the CARD database developed by Alcock et al (42)
164 (version 3.0.3, available at <https://card.mcmaster.ca/>). Other AMR variants previously described in
165 *S. suis* (43–45) were searched (see supplementary file S4). A hit was retained only if it shows more
166 than 70% nucleic acid of identity with the query with at least 80% coverage. The genetic environment
167 of the AMR genes was analyzed using the Geneious prime software (version 2023, Biomatters). We
168 used the output annotated files generated by ICEScreen to see if the AMR genes were located on
169 MGEs.

170 Competence was analyzed by searching 38 genes (corresponding to the required components
171 described above, with three different variants for ComR and ten different variants for ComS, see list
172 in supplementary file S5 derived from (24,25)) in the genomes by local customBlast interrogation of a
173 home-built database using the BlastX program (E-value cut off e^{-20}). Variants with less than 70% of
174 amino acid identity were manually checked and analyzed for conserved domains and residues. A
175 pherotype was attributed to the strains with a complete set of competence genes.

176 **6.4 Statistical analyses and data visualization**

177 Chi-squared tests, Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Clustering on Principal
178 Components (HCPC) analysis were done using the FactoMineR (version 2.8) package of R (using the
179 catdes, PCA and HCPC tools respectively). Only results with a p-value equal to or lower than 0.05 (i.e.
180 95% of level of confidence) were considered significant.

181 The integration and visualization of the genomic and statistical data were done using the ggplot2
182 3.4.2 (46), UpsetR 1.4.0 (47) and ComplexHeatmap 2.16.0 (48) packages of R.

183 **7. Results and discussion**

184 The 102 genomes passed the various steps of quality control (see ‘Methods’ and supplementary
185 file S6 for quality data for each genome). This set comprises the genome of 91, 8 and 3 strains isolated
186 from pigs, humans and wild-boars respectively (supplementary file S1).

187

188 **7.1 Genome diversity of 102 French isolates of *S. suis* isolated from pigs, humans and wild- 189 boars**

190 MLST typing of the 102 strains led to the identification of 31 new STs (1505 to 1509, 1514 to 1523
191 and 1854 to 1869) in our collection. The most prevalent STs were ST1 (n=29), followed by ST16 (n=14),

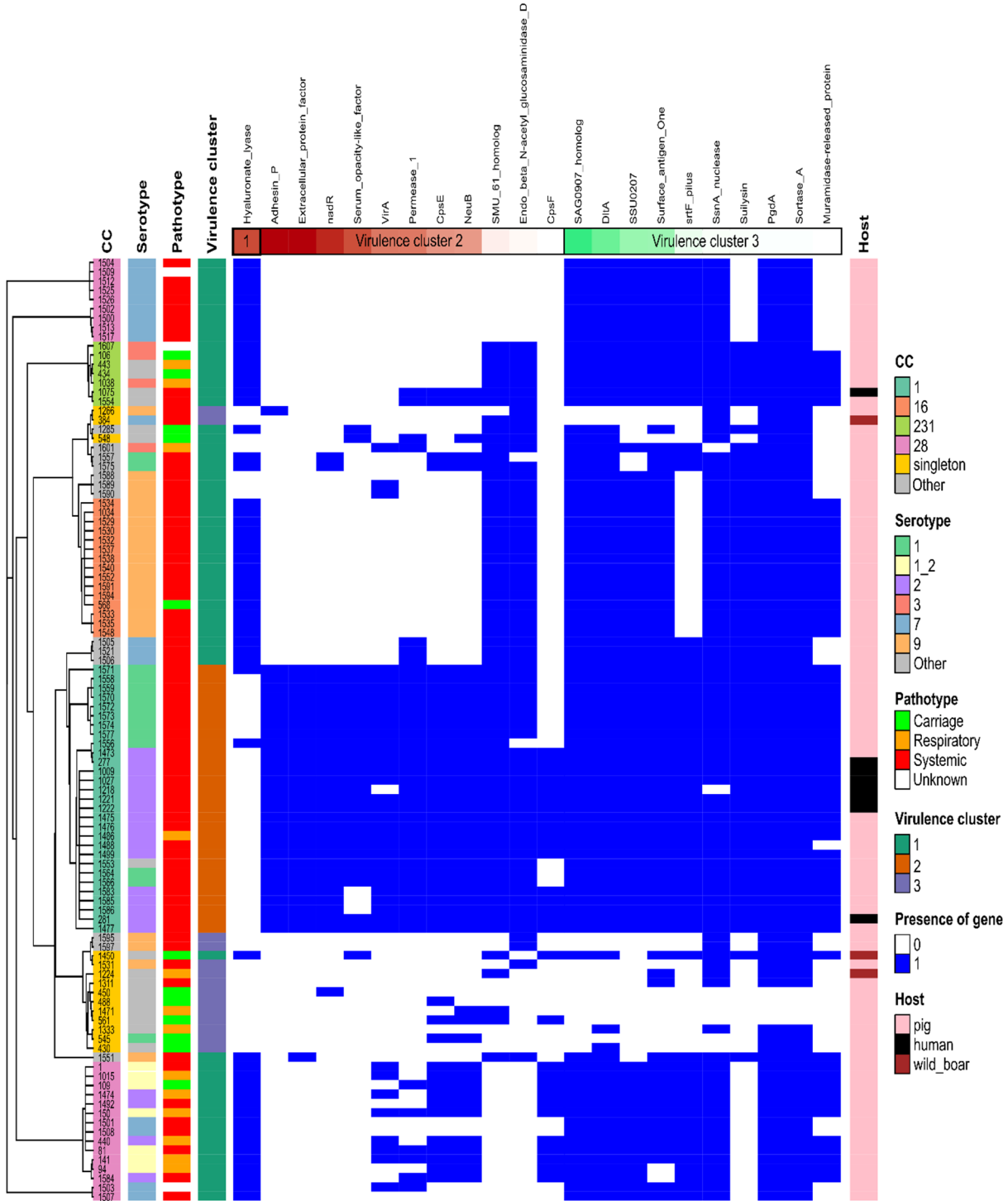
192 ST28 (n=11), ST29 (n=11), ST231 (n=6), ST1505 (n=3), 1508 (n=3), ST13 (n=2) and ST94, ST1515,
193 ST1516, ST1518, ST1519, ST1521, ST1522, ST1854, to ST1869 (n=1 for each ST group). Most of the
194 strains (n=88) could be clustered in clonal complexes (CC) on the basis of their MLST alleles. Eleven CC
195 were identified, the most frequent being CC1 (n=29), CC28 (n=24) and CC16 (n=15) (Figure 1,
196 supplementary file S1).

197 Comparison of genomes using Roary identified 1144 genes shared by more than 95% of the strains
198 (“core genes” and “soft core genes”). This is close to the theoretical 980 core genes calculated by Chen
199 et al (49). Alignment of these core genes provided a distance matrix that was used to build the
200 phylogenetic tree shown on figure 1. Clusters obtained by this method are in accordance with the
201 clonal complexes defined by MLST typing. The only exception is CC28, which is divided in several
202 clades: three homogeneous ones with a systemic pathotype and belonging to serotype 7 and one
203 heterogeneous mixing serotypes (1-2, 2 and 7) and different pathotypes defined according to the host
204 isolation site of the strains (26) (Figure 1, supplementary file S1).

205 The genomic relatedness of the strains was also evaluated by calculating the average nucleotide
206 identity between strains. Four strains (450, 488, 561 and 1471) appear very distant from the other
207 strains. Three of them are carriage strains from pigs (one nasal carriage and two isolated from tonsil)
208 isolated before 2010 and the fourth was isolated from lungs of a pig after 2020 (supplementary file
209 S1). These strains were attributed new ST (1854, 1857, 1858 and 1861). These divergent strains exhibit
210 89-90% ANI with the other genomes compared to the standard 95% ANI species level (50)). Such
211 diversity inside the *S. suis* species has already been described (51,52).

212 Most of the strains of serotype 2 belong to ST1 (17 ST1 and 4 ST28) as reported in other European
213 countries (2). Interestingly, strains of different serotypes share the same ST: serotypes 1, 2 and 14
214 with ST1; and serotypes 3 and 14 with ST231 (Figure 1, supplementary file S1). Since the serotype of
215 the strains was confirmed using reference antisera (26), this indicates capsular switching in these
216 strains. Intraspecies horizontal transfer of serotype-specific *cps* genes has already been suggested
217 (53). Switching from serotype 2 to serotype 14 was reported to have no effect on virulence for the ST1
218 strain P1/7 (54). As far as we know, the impact of switching from serotype 3 to serotype 14 for ST231
219 strains has not been documented yet.

Virulence-associated genes



220

Figure 1: Heatmaps of (i) clonal complex (CC), (ii) serotype, (iii) pathotype, (iv) virulence-gene pattern and (v) host for the 102 genomes of French isolates of *Streptococcus suis*. Genomes have been grouped according to their phylogenetic distance determined by alignment of their core genes (see 'Method') (as indicated by a phylogenetic tree at the left). The legends for the heatmaps are indicated on the right of the figure. The names of the strains are indicated in the CC heatmap. Hierarchical clustering (HCPC) enabled the classification of the genomes in three clusters according to their pattern of putative virulence genes. The presence of a putative virulence gene is indicated in blue. Putative virulence genes have been ordered according to their association with one of the three clusters of virulence genes (numbered 1 to 3) obtained by HCPC. Inside each cluster, only genes that are discriminant (n=22) are indicated and ordered according to their discriminating power (decreasing value of v.test obtained through HCPC indicated by a decrease of color intensity, a positive association i.e. v.test positive is indicated in brown and a negative association i.e. v.test negative in green).

221 7.2 Distribution of putative virulence genes among 102 isolates of *S. suis*

222 The set of 102 genomes was screened for the presence of 70 virulence-associated markers
223 described in *S. suis* (see 'Methods'). Two markers (Lpp lipoprotein and RevS) were absent from the
224 genomes and two were found in only three genomes (SaK and SaR). Thirty-nine markers were found
225 in all or almost all the genomes. The other markers are found in 13 to 99 genomes (median=54 with
226 interquartile range i.e range 25%-75% of the values =52-62) (Figure 2 and supplementary file S1).

227 Hierarchical Clustering on Principal Components (HCPC) enabled the clustering of genomes in three
228 clusters according to the presence/absence of the 22 most discriminant genetic markers (Figure 1).
229 The most discriminating marker of cluster_1 is hyaluronate lyase, whereas 11 markers (the most
230 discriminating ones being adhesin P, extracellular protein factor and NadR) are positively associated
231 with cluster_2 (Figure 1). Cluster_3 is characterized by the absence of some virulence associated
232 factors (the four most discriminating being SAG0907 homolog, DltA, SSU0207 and surface antigen
233 one). Statistical analysis (chi-squared tests, see 'Methods') indicated a significant link (at a 95%
234 confidence level i.e a p.value<0.05) between these clusters and (i) clonal complexes (p.value=5.77e-
235 32), (ii) the number of putative virulence associated factors (p.value=1.11e_28) but also (iii) with
236 pathotypes (p.value=3.13e-03). More precisely, strains of clonal complexes CC1, CC16 and CC28 are
237 associated with specific patterns of virulence associated factors. CC1 strains are associated with
238 cluster_2 (p.value=4.11e-26) whereas CC16 and CC28 are associated with cluster_1 (p.value=1.14e-04
239 and 1.58e-07 respectively). Cluster_2 is characterized by a higher number of putative
240 colonization/virulence factors (group 'superior to Q3' defined by more than 62 putative genes,
241 p.value=9.99e-14) and is associated with pathotype 'systemic' (p.value=2.52e-04). By contrast,
242 cluster_3 is characterized by less colonization/virulence factors (group 'inferior of Q1' defined by less
243 than 52 putative colonization/virulence, p.value=1.14e-14). These associations appear clearly on
244 figure 1. The association between CC1 and a higher number of colonization/virulence factors (chi-
245 squared test, p.value=9.99e-14) is also clearly visible on figure 2.

246 Through HCPC analysis, hyaluronate lyase was identified as a marker that distinguishes strains of
247 CC1 from the other strains. Indeed, all but two strains of this clonal complex (27/29) are devoid of this
248 factor. This is in accordance with previous studies indicating that many virulent strains of *S. suis* lack
249 hyaluronate lyase activity (55). This suggests that hyaluronate lyase is not an important virulence
250 factor of *S. suis*.

251 The extracellular protein factor (EPF), which is one of the discriminating markers of cluster 2
252 obtained by the HCPC analysis, is one of three virulence-associated factors, with the muramidase-
253 released protein (MRP) and the suilysin (SLY), that have been extensively used to predict the virulence
254 potential of *S. suis* strains mostly for strains of serotype 2 (8,56). In the strain collection examined in
255 this work, all the strains of CC1 (n=29), whatever their serotype (1, 2 or 14), harbor the genes encoding
256 these three factors (except one that is *mrp*⁻) (Figure 1, supplementary file S1). This is not true for
257 strains of these serotypes (1, 2 and 14) that belong to other CCs (which are all *epf*⁻). The *epf*⁺ *mrp*⁺ *sly*⁺
258 phenotype appears predictive of ST1 since all strains with this genotype (except one ST1521 strain)
259 are ST1 strains. Scherrer et al (13) previously reported a link between the presence of these three
260 virulence-associated factors and ST rather than with *cps* types. All the strains of CC1 with serotype 2,
261 even the human isolates, encode the reference P1/7 EPF (called the "110 kDa variant"). By contrast to
262 strains of CC1, strains of CC16 (n=15, all of serotype 9) are all *epf*⁻. This is in accordance with the
263 observations of Wisselink et al. made on *S. suis* strains isolated from diseased pigs in seven European
264 countries including France (56). All the strains of CC16 are *epf*⁻ but *mrp*⁺ *sly*⁺. Only four of these strains

265 encode a variant of MRP with a higher molecular weight (>136 kDa). This is in contrast with the
 266 observation of Wisselink et al (56) who reported a majority of high-molecular weight MRP in strains
 267 of serotype 9. In addition, half of strains of CC28 are *epfmrp'sly* (strains of serotype 7) while the other
 268 half is *mrp*⁺ (strains of serotypes 1-2 and 2). This is in accordance with a previous study made on French
 269 isolates of *S. suis* (57).

270 Two other invasive disease-associated markers (SSU0207 and SSU1589/VirA) were proposed by
 271 Wileman et al (33). These two factors are among the markers that enabled clustering of the strains
 272 through our HCPC analysis. As previously described by Scherrer et al (13), *VirA* is present in all the
 273 strains (except one) of CC1 (virulence cluster_2) but is absent in carriage strains. Other *virA*⁺ strains
 274 belong to CC14 (serotype 9) (n=2), CC28 (serotypes 1-2, 2 or 7) (n=8) and CC94 (serotype 3). The
 275 absence of SSU0207 is characteristic of strains of cluster_3. This factor is present in most of the strains
 276 of cluster_1 (53/59) but not only in invasive strains since it was found in 4 carriage strains. We analyzed
 277 the SSU0207 sequence of strains of CC28 to see if the encoded protein is full-length or with partial
 278 deletions as described by Scherrer et al (13). No deletion was found in the sequences analyzed.

279 Thirty-six virulence-associated factors were found in the four divergent strains (supplementary file
 280 S1), 23 of them were previously described in the divergent strains analyzed by Baig et al (51). Most of
 281 them are metabolism-related. Most (17/22) of the discriminating virulence-associated factors found
 282 by HCPC analysis are absent in these divergent strains (Figure 1 and supplementary file S1).

283 It should be pointed out that one strain of CC1 (strain 1486) was isolated from lungs (pathotype
 284 “respiratory” and not “systemic”) but harbors the highest number of virulence-associated factors
 285 found in the genomes examined (64 markers in total) (Figures 1 and 2, supplementary file S1).
 286 Likewise, one strain of CC16 (strain 568), which is among the three strains of this CC that harbor the
 287 highest number of virulence-associated factors (54 markers in total), was isolated from the nasal cavity
 288 (pathotype “respiratory” and not “systemic”). This suggests that these strains could have an high
 289 invasive potential even if they were isolated from upper and lower respiratory tract.

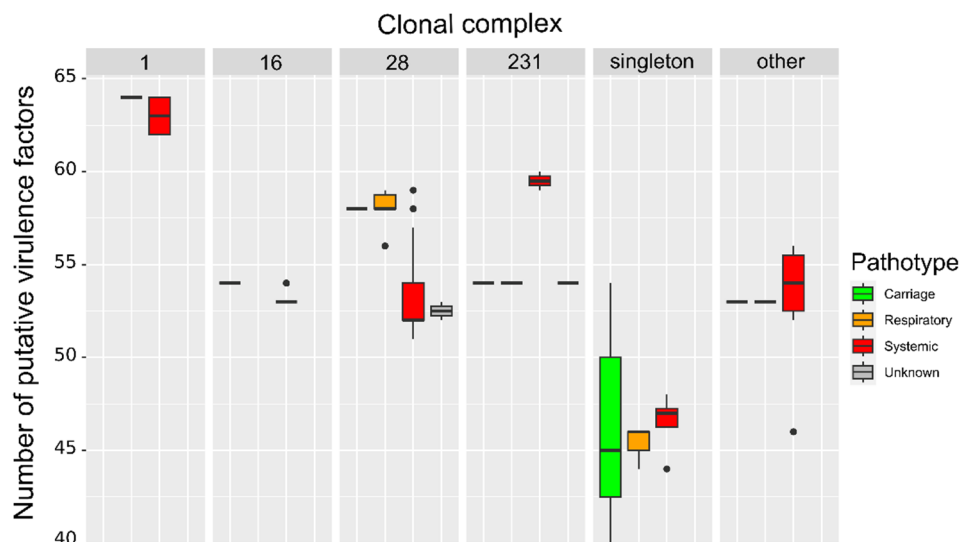
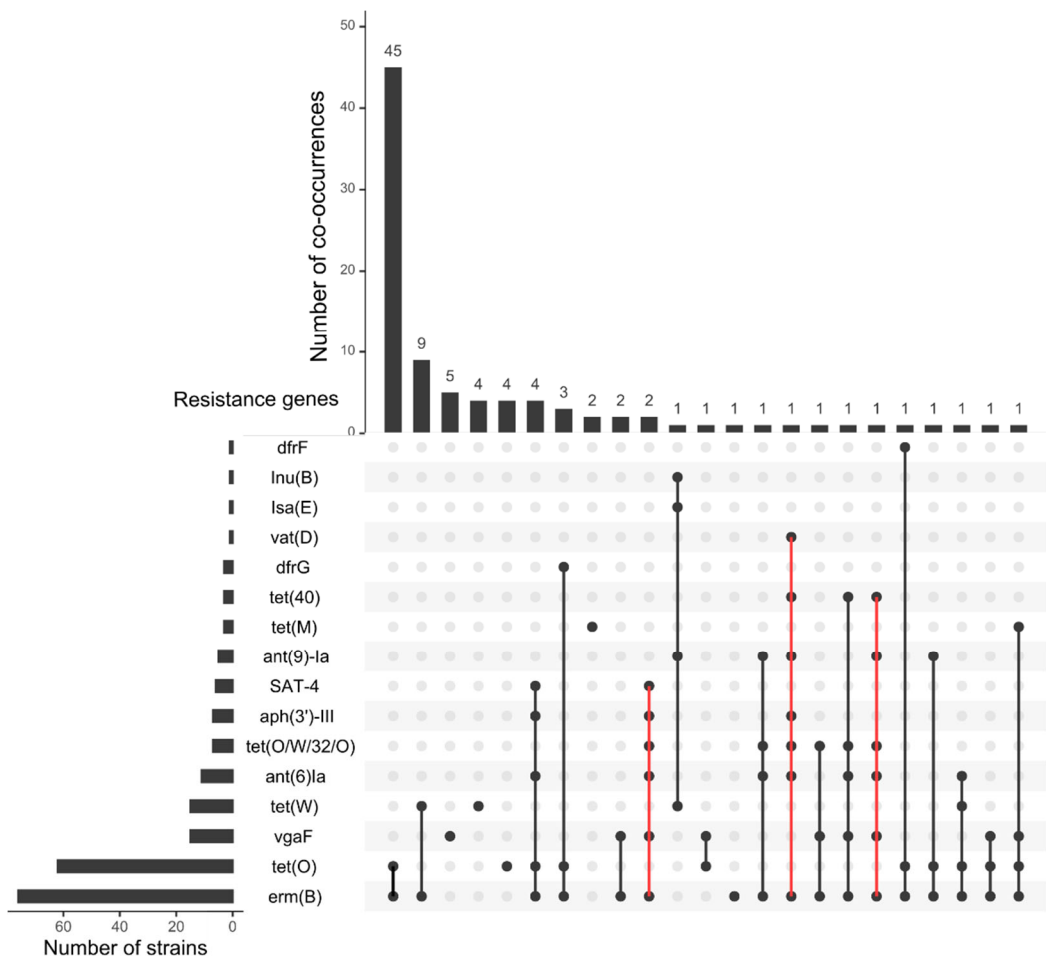


Figure 2: Number of putative virulence genes according to the clonal complex and the pathotype of the strains. Boxplots indicate the median value and the interquartile range (Q1-Q3 i.e. [25-75%] of the values). CC with less than five strains were grouped in the category “other”.

290 **7.3 Prevalence and diversity of Antimicrobial resistance (AMR) genes**

291 We confirmed that the nine susceptible strains were devoid of AMR genes (supplementary files S1
 292 and S7). Among the 93 other strains, 217 putative AMR determinants were identified, corresponding
 293 to 16 different antimicrobial resistance genes. As expected, the most prevalent genes are genes
 294 conferring resistance to macrolides and/or lincosamides and/or streptogramins (*erm(B)*, n=76; *Inu(B)*,
 295 n=1; *Isa(E)*, n=1, *vat(D)*, n=1) or tetracyclines (*tet(O)*, n=62). The two most frequent associations of
 296 AMR genes are *erm(B)-tet(O)* (n=57) and *erm(B)-tet(W)* (n=10). Four other tetracycline resistance
 297 genes were identified (*tet(W)*, n=15; *tet(O/W/32/O)*, n=7; *tet(M)*, n=3; and *tet(40)*, n=3). Genes that
 298 were previously associated with resistance or reduced susceptibility to four other families of
 299 antibiotics were also detected: (i) aminoglycosides: *ant(6)-Ia* (n=11), *aph(3')-III* (n=7) and *ant(9)-Ia*
 300 (n=5); (ii) streptothricin: SAT-4 (n=6); (iii) trimethoprim: *dfrG* (n=3) and *dfrF* (n=1); and (iv)
 301 pleuromutilin: *vga(F)* (n= 15). Some strains harbor 6 or even 7 AMR determinants (that can confer
 302 resistance to four to five different families of antibiotics) (Figure 3 and supplementary file S1).
 303



304 **Figure 3:** Prevalence and co-occurrence of antimicrobial resistance genes in the 102 genomes of French isolates of *Streptococcus suis* (associations of more than 6 AMR genes are indicated in red).

307 All the strains that are resistant to macrolides (erythromycin, tylosin and tilmicosin) carry an *erm(B)*
 308 resistance gene (n=76). Only one strain resistant to lincosamides (lincomycin/clindamycin) but
 309 susceptible to macrolides carry *Inu(B)* and *Isa(E)* resistance genes. The four other strains resistant to

310 lincosamides carry a gene with 86-88% identity with *vga(F)* described by Hadjirin et al (43). Further
 311 analysis of these genes indicated that they encode an ABC-F protein with 84 to 86% of identity with
 312 the recently described ribosome protection protein SrpA (58). This determinant was shown to confer
 313 not only resistance to pleuromutilin but also to lincosamides. All but one of the strains resistant to
 314 tiamulin (n=11) carry this *srpA* gene homolog. Thus, this resistance determinant appears widespread
 315 in pig isolates of *S. suis* in France and likely confers resistance to several families of antibiotics.
 316 Interestingly, it was also detected in two wild-boar isolates. However, we did not detect any IS
 317 sequence upstream and downstream of the resistance gene that could enable formation of a circular
 318 form as described by Zhang et al (58). However, interestingly, in one strain (strain 1551) the *srpA* gene
 319 is interrupted by a genetic element that encodes a MobQ relaxase (with a PF03389 domain). There is
 320 no evidence that this element is mobile since it does not carry any integrase gene. Among the 90
 321 strains that are resistant to tetracycline, five (including three of serotype 9) do not carry any detectable
 322 tetracycline resistance gene. In addition, only four genes conferring resistance to trimethoprim (3 *dfpG*
 323 and 1 *dfpF*) have been detected. We did not identify candidate genes in the 18 other strains with this
 324 phenotype of resistance (supplementary file S1).

325 Statistical analysis (chi-squared tests) indicated that the pathotype 'systemic' is significantly (at a
 326 95% confidence level) associated with the group with the lowest content of AMR genes ('<Q1 group'
 327 i.e. less than 2 AMR genes, p.value= 1.31e-03) and the 'carriage' pathotype with the group with the
 328 highest content of AMR genes (>Q3 i.e. >2 AMR genes, p.value= 1.86e-04) (Figure 4). This is consistent
 329 with higher opportunities for gene exchanges in carriage strains than in invasive strains. In addition,
 330 strains isolated before 2010 show a higher content of AMR genes than those isolated after 2015
 331 (p.value=2.79e-04, supplementary file S1). This suggests that the French Ecoantibio plan had an impact
 332 on the prevalence of AMR genes in *S. suis*.

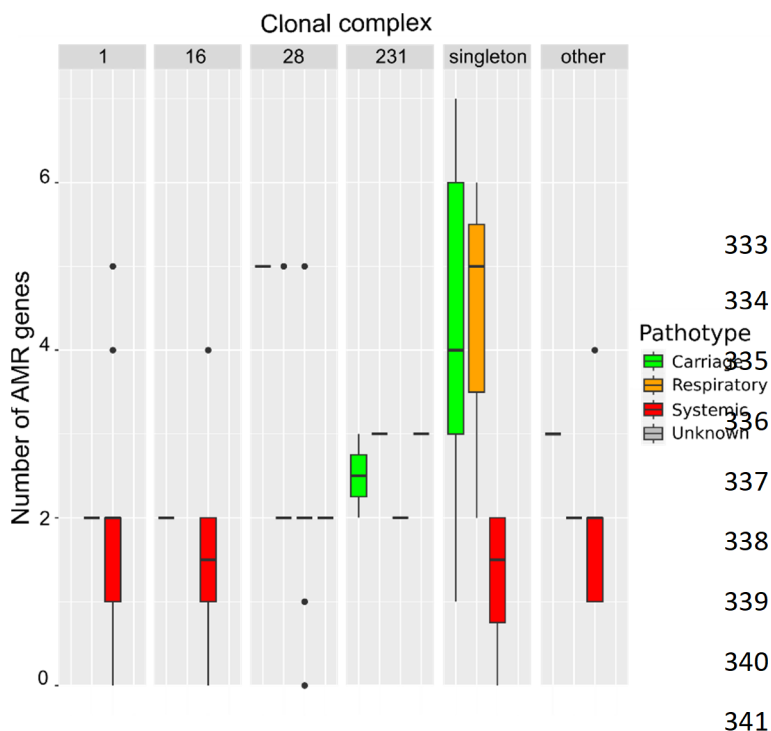


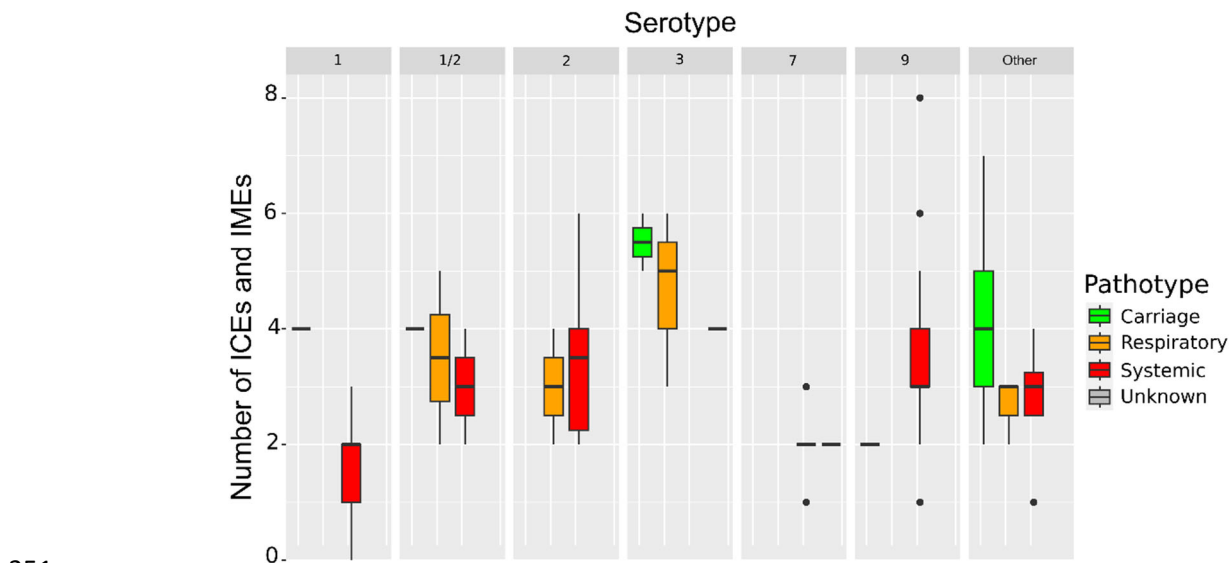
Figure 4: Number of AMR genes according to the clonal complex and the pathotype of the strains. Boxplots indicate the median value and the interquartile range (Q1-Q3 i.e. [25-75%] of the values).

342 **7.4 Prevalence of Integrative Conjugative Elements (ICEs) and Integrative Mobilizable**
343 **Elements (IMEs) in the set of 102 genomes of French isolates of *S. suis***

344 **7.4.1 Distribution of ICEs and IMEs in the analyzed genomes**

345 Among the 102 genomes studied, 129 (+ 21 defective) ICEs and 167 (+ 55 defective) IMEs were
346 detected (supplementary file S1). Strains host up to eight ICEs/IMEs and only one strain (strain 1556)
347 is devoid of ICEs and IMEs. Half of the strains host three to five integrative elements.

348 If we consider the distribution of ICEs and IMEs according to the serotype of the strains, it can be
349 noticed that strains of serotype 1 and serotype 7 harbor less elements than the other serotypes (chi-
350 squared tests, p.value=7.63e-05 and 2.27e-04 respectively) (Figure 5).



351

Figure 5: Number of ICEs and IMEs according to the serotype and the pathotype of the strains. Boxplots indicate the median value and the interquartile range (Q1-Q3 i.e. [25-75%] of the values).

352 **7.4.2 Diversity of ICEs and IMEs in the genomes**

353 ICEs found in the 102 genomes belong to six families according to their conjugation module (as
354 described in other streptococci (59)): Tn5252 (n=94), Tn1549 (n=18), Tn916 (n=3), ICE_vanG (n=7),
355 ICESt3 (n=2) and TnGBS2 (n=5) families (Figure 6). Some strains host up to 3 different ICEs of the
356 Tn5252 family (supplementary file S1).

357 IMEs can be classified according to the family of their relaxase (22). The most prevalent family of
358 IMEs detected in the genomes harbors a relaxase with a PF02486 domain (MobT family, n=72) (Figure
359 6). Most of them are integrated in a tRNA^{Leu} gene (n=68) (supplementary file S1). This was also one
360 of the most prevalent categories of IMEs in a previous study conducted on Canadian isolates of *S. suis*
361 (15). Most of the defective IMEs (n=50) are integrated inside a gene of an ICE of the Tn5252 family. In

362 most cases, their integrase gene is interrupted by the insertion of a genetic element carrying an *erm(B)*
 363 gene.

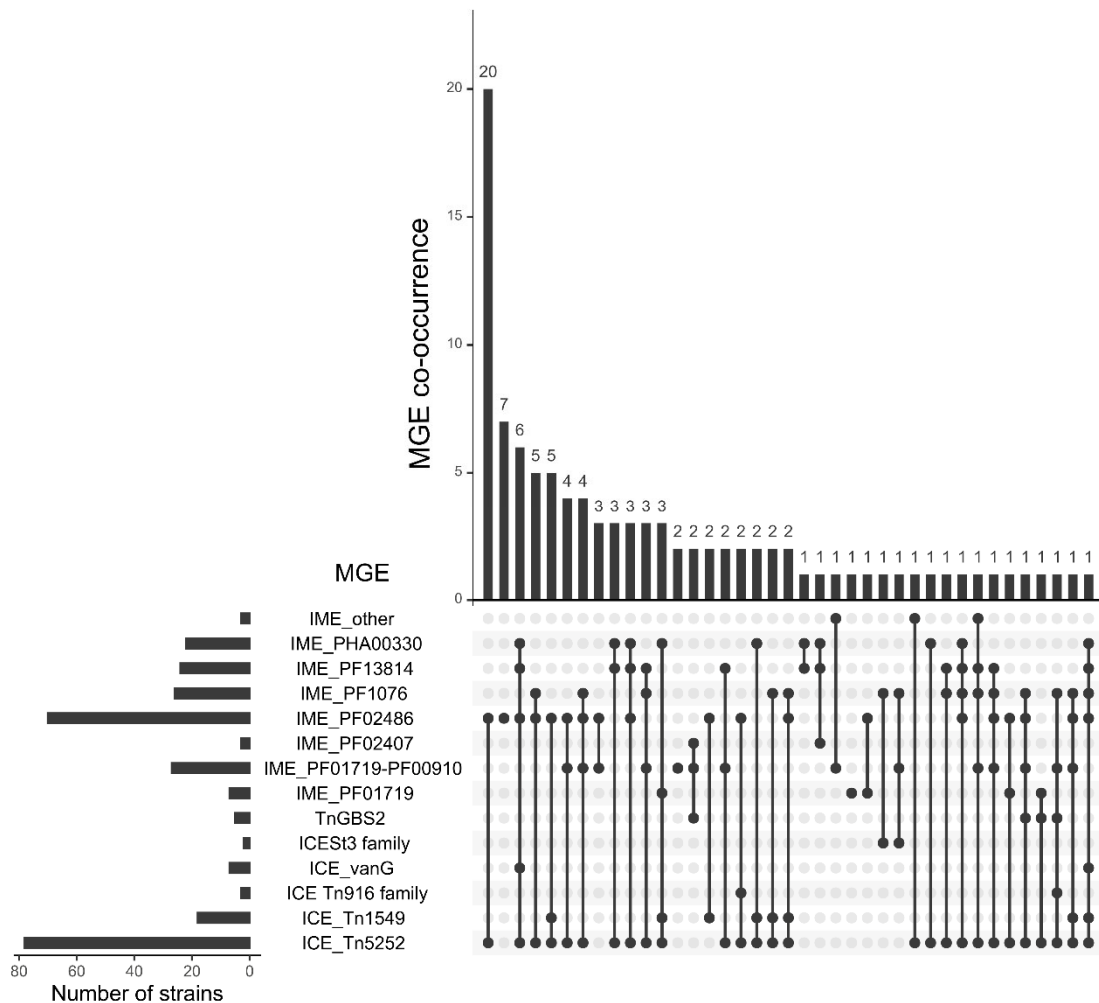
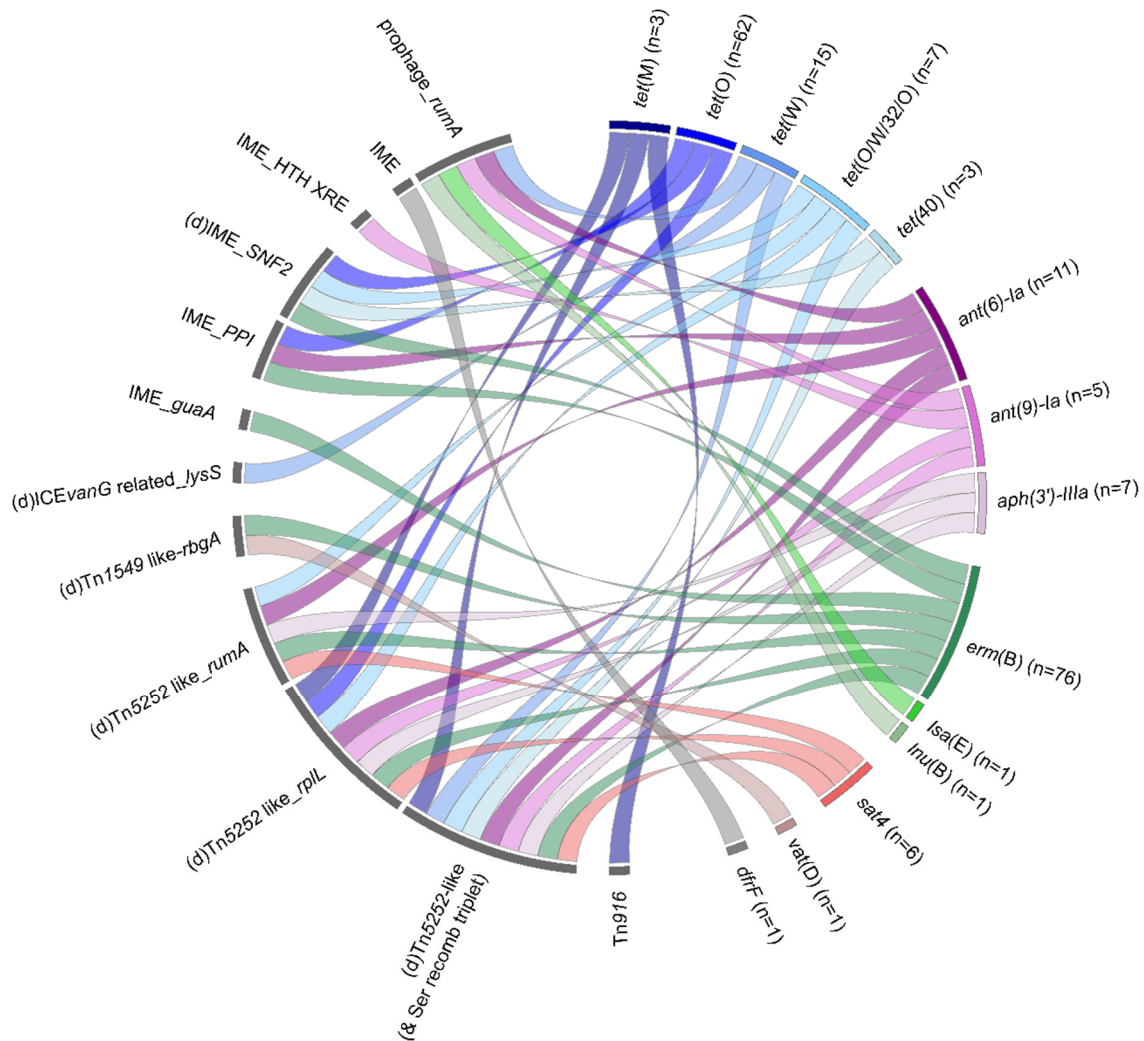


Figure 6: Prevalence and co-occurrence of ICEs and IMEs in the 102 genomes of *S. suis*.

364 **7.4.3 ICEs and IMEs carrying AMR genes.**

365 Among the 217 AMR genes identified, 186 were found to be located on an MGE (Figure 7 and
 366 supplementary file S1). Information is lacking for 13 AMR genes due to their location on short contigs.
 367 AMR genes are mostly localized on IMEs (n=18) or defective IMEs (n=91). To our knowledge, several
 368 IME-AMR gene combinations have not been reported until now: IME_*SNF2-tet(O/W/32/O)*, IME_*PPI-*
 369 *ant(6)-Ia*, IME_*HTH-XRE-ant(9)-Ia*, IME_*guaA-erm(B)* and an IME with a MobT relaxase carrying a *dfrF*
 370 gene. All of these IMEs carrying an AMR gene, except two (IME integrated in a *guaA* gene and IME
 371 integrated in a gene encoding an HTH-XRE regulator), are themselves located on an MGE (106 on an
 372 ICE or defective ICE and one on a prophage). In all the cases, the ICE that hosts an IME/dIME belongs
 373 to the Tn5252 family and the integration occurs into a *SNF2* gene or into a *PPI* gene. The most
 374 commonly found combination of AMR genes was *erm(B)-tet(O)* carried by an IME/dIME inserted in
 375 *SNF2* of an ICE of the Tn5252 family (n=41). This high frequency of *erm(B)-tet(O)* association has been
 376 extensively reported in *S. suis* (12,16,17,43). In addition to these AMR genes found on nested
 377 elements, 72 additional AMR genes were located on ICEs (seven of the *vanG* family, three of the Tn916

378 family and one of the Tn1549 family). This is the first report of a *vat(D)* on an ICE of the Tn1549 family.
 379 Until now, this gene has been described only on plasmids (in *Enterococcus faecium*) (60) and on a
 380 phage in *S. suis* (12). Finally, five AMR genes (1 *ant(6)-Ia*, 1 *ant(9)-Ia*, 1 *tet(W)*, 1 *Inu(B)* and 1 *Isa(E)*
 381 gene) were located on a prophage (Figure 7 and supplementary file S1).



382

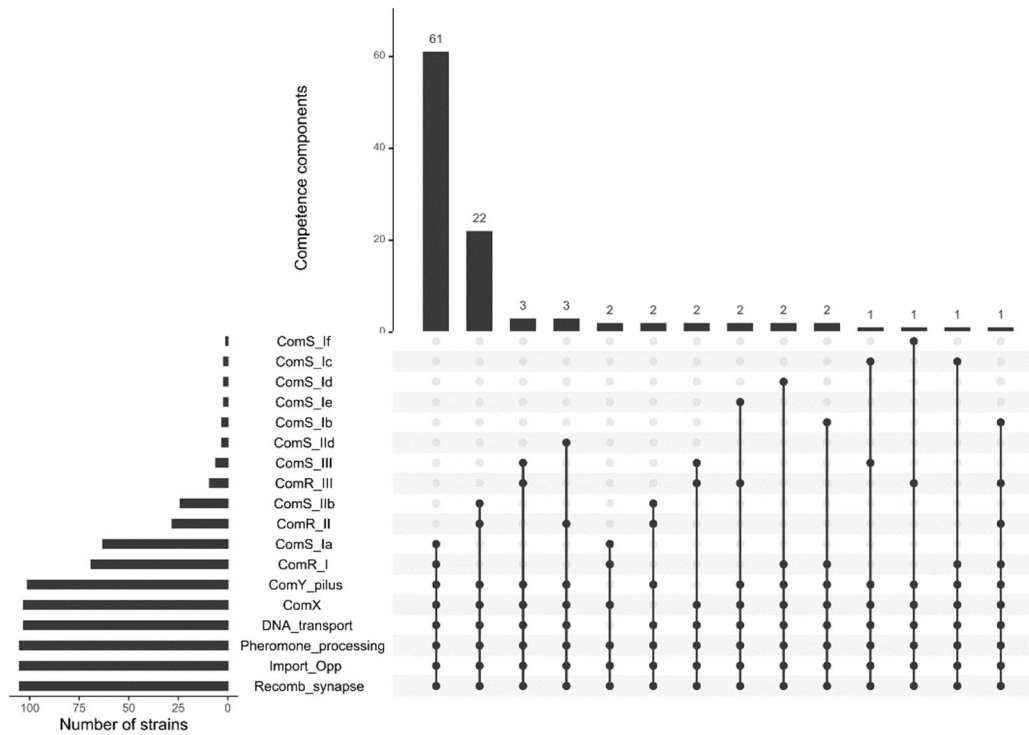
383 7.5 Competence genes

Figure 7: Mobile genetic elements carrying AMR genes in the 102 genomes of *S. suis*. Ribbons indicate the association between resistance genes (appearing in the right panel) and mobile genetic elements (on the left panel). Genes conferring resistance to the same families of antibiotics are grouped and indicated in the same color (blue for tetracycline resistance, purple/pink for aminoglycosides, green for macrolides/lincosamides, red for streptothricin, brown for streptogramin A and grey for trimethoprim). The total number of AMR genes detected in the genomes is indicated after the name of each gene (this number includes all the genes, including those whose location was not determined due to gaps in the draft genomes).

384 We evaluated if the strains harbor the whole set of genes required for acquisition of extracellular
 385 DNA by competence. Most of the strains (n=95) harbor the whole set of genes (supplementary file
 386 S1). This is interesting since recent studies have uncovered a link between competence and the
 387 production of bacteriocins in streptococci. Exploitation of bacteriocin-mediated killing during
 388 competence provides adaptive gain to the bacteria (61).

389 Several strains (n=6) harbored two copies of *comX* gene. Truncations were observed in: *comR* gene
 390 (n=1), *comX* (n=2), *comYA* (encoding a minor pilin, n=2), *comYA-comYG* (minor and major pilin, n=2)
 391 (Figure 8).

392 Most of the strains (n=67) harbor *comS-I-comR-I* genes thus likely exhibiting phenotype-I.
 393 Phenotype-II is found in 24 strains and phenotype III in only four strains (Figure 8). One strain (strain
 394 450) has a *comS* gene encoding a new variant of pheromone (MNFKAFTTFGTGWDWWWKG
 395 sequence) that we called *comS-I_f*. Interestingly, one genome contains two *comS* genes (one *comS-I_c*
 396 and one *comS-III*) and another one three *comR* genes (one *comR-I*, one *comR-II* and one *comR-III*). It
 397 would be interesting to test if these strains can produce the two peptides or sense three different
 398 pheromones respectively.



399

Figure 8: Distribution of the *comRS* variants/phenotypes in the 102 genomes of *S. suis*.

4U1

402 As described by Okura et al (25), we found that the phenotype distribution is correlated to the
 403 clonal complexes. Phenotype I is associated with CC1 (chi-squared test, p.value= 3.24e-07) and CC16
 404 (chi-squared test, p.value=9.91e-04) and phenotype II with CC28 (chi-squared test, p.value=6.08e-18).

405 Variants were detected for the ComFC component of the DNA transport system (with less than
 406 65% of amino acid identity with the ComFC protein of strain P1-7 of *S. suis*) in five strains (strains 450,
 407 488, 561, 1452 and 1471) and for the ComYG pilin in 22 strains (i.e. a large insertion in the middle of
 408 the protein which increases the length of the protein to 168 to 176 aminoacids instead of 136 for
 409 strain P1-7 of *S. suis*).

410

411 8. Conclusion

412 A large set of strains of *S. suis* isolated from humans, pigs and wild-boars (n=102) in France was
 413 subjected to WGS. MLST data extracted from these genomes indicated that the most frequent CCs

414 were CC1, CC28 and CC16. Through HCPC analysis, we identified a few virulence-associated factors
415 that distinguish invasive CC1 strains from the other strains. This could be useful for epidemiology
416 surveillance studies of this zoonotic pathogen. A plethora of AMR genes was found in the genomes,
417 with several strains carrying up to seven AMR genes. Carriage strains were found to carry more AMR
418 genes than invasive strains. The recently described *srpA* gene (58) which confers resistance to
419 streptogramins A, lincosamides and to the pleuromutilin tiamulin was found in 15 strains including
420 two strains isolated from wild-boars. Most of the identified AMR genes are carried by IMEs and new
421 AMR genes-MGEs associations were identified. In addition, the large majority of the strains have the
422 full set of genes required for acquisition of DNA by natural transformation. This increases the risk of
423 AMR dissemination. Reinforcing surveillance of AMR in *S. suis*, not only for invasive strains but also for
424 carriage strains, would be useful since this bacterium is now recognized as a reservoir of AMR genes
425 for other pathogens.

426 9. Author statements

427 9.1 Author contributions

428 Manon Dechêne-Tempier, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation,
429 Methodology, Writing – review & editing | Corinne Marois-Créhan, Conceptualization, Data curation,
430 Funding acquisition, Investigation, Methodology, Supervision, Validation, Writing – review & editing |
431 Claire de Boisséson, Funding acquisition, Validation, Writing – review & editing | Pierrick Lucas, Data
432 curation, Investigation, Methodology, Writing – review & editing | Stéphanie Bougeard, Formal
433 analysis, Investigation, Validation, Writing – review & editing | Virginie Libante, Conceptualization,
434 Data curation, Investigation, Methodology, Supervision, Validation, Writing – review & editing |
435 Sophie Payot, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation,
436 Methodology, Methodology, Supervision, Validation, Visualization, Writing – Original Draft.

437 9.2 Conflicts of interest

438 The author(s) declare that there are no conflicts of interest.

439 9.3 Funding information

440 M.D-T. was supported by ANSES and INRAE.

441 9.4 Acknowledgements

442 We are grateful to the INRAE MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRAE, 2020. Migale
443 bioinformatics Facility, doi: 10.15454/1.5572390655343293E12) for providing help, computing and
444 storage resources for this work.

445 10. References

- 446 1. Okura M, Osaki M, Nomoto R, Arai S, Osawa R, Sekizaki T, *et al.* Current Taxonomical Situation of
447 *Streptococcus suis*. *Pathogens* 2016;5:45. DOI: 10.3390/pathogens5030045
- 448 2. Goyette-Desjardins G, Auger JP, Xu J, Segura M, Gottschalk M. *Streptococcus suis*, an important pig
449 pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on
450 serotyping and sequence typing. *Emerg Microbes Infect* 2014;3:1-20. DOI: 10.1038/emi.2014.45
- 451 3. Huang J, Liu X, Chen H, Chen L, Gao X, Pan Z, *et al.* Identification of six novel capsular polysaccharide
452 loci (NCL) from *Streptococcus suis* multidrug resistant non-typeable strains and the pathogenic

- 453 characteristic of strains carrying new NCL s. *Transbound Emerg Dis* 2019;66:995-1003. DOI:
454 10.1111/tbed.13123
- 455 4. Pan Z, Ma J, Dong W, Song W, Wang K, Lu C, *et al.* Novel Variant Serotype of *Streptococcus suis*
456 Isolated from Piglets with Meningitis. *Appl Environ Microbiol* 2015;81:976-85. DOI :
457 10.1128/AEM.02962-14
- 458 5. Zheng H, Qiu X, Roy D, Segura M, Du P, Xu J, *et al.* Genotyping and investigating capsular
459 polysaccharide synthesis gene loci of non-serotypeable *Streptococcus suis* isolated from diseased
460 pigs in Canada. *Vet Res* 2017;48:10. DOI: 10.1186/s13567-017-0417-6
- 461 6. Hatrongjit R, Fittipaldi N, Gottschalk M, Kerdsin A. Tools for Molecular Epidemiology of
462 *Streptococcus suis*. *Pathogens* 2020;9:81. DOI: 10.3390/pathogens9020081
- 463 7. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the
464 PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res* 2018;3:124. DOI:
465 10.12688/wellcomeopenres.14826.1
- 466 8. Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M. Virulence factors involved in the pathogenesis of
467 the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol*
468 2012;7:259-79. DOI: 10.2217/fmb.11.149
- 469 9. Segura M, Calzas C, Grenier D, Gottschalk M. Initial steps of the pathogenesis of the infection
470 caused by *Streptococcus suis* : fighting against nonspecific defenses. *FEBS Lett* 2016;590:3772-99.
471 DOI: 10.1002/1873-3468.12364
- 472 10. Segura M, Fittipaldi N, Calzas C, Gottschalk M. Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors:
473 Are They All Really Critical? *Trends Microbiol* 2017;25:585-99. DOI: 10.1016/j.tim.2017.02.005
- 474 11. Bleuzé M, Gottschalk M, Segura M. Neutrophils in *Streptococcus suis* Infection: From Host
475 Defense to Pathology. *Microorganisms*. 2021;9:2392. DOI: 10.3390/microorganisms9112392
- 476 12. Nicholson TL, Bayles DO. Comparative virulence and antimicrobial resistance distribution of
477 *Streptococcus suis* isolates obtained from the United States. *Front Microbiol*. 2022;13:1043529.
478 DOI: 10.3389/fmicb.2022.1043529
- 479 13. Scherrer S, Rosato G, Spoerry Serrano N, Stevens MJA, Rademacher F, Schrenzel J, *et al.*
480 Population structure, genetic diversity and pathotypes of *Streptococcus suis* isolated during the last
481 13 years from diseased pigs in Switzerland. *Vet Res* 2020;51(1):85. 10.1186/s13567-020-00813-w
- 482 14. Lekagul A, Tangcharoensathien V, Yeung S. Patterns of antibiotic use in global pig production:
483 A systematic review. *Vet Anim Sci* 2019;7:100058. DOI : 10.1016/j.vas.2019.100058
- 484 15. Libante V, Nombre Y, Coluzzi C, Staub J, Guédon G, Gottschalk M, *et al.* Chromosomal
485 Conjugative and Mobilizable Elements in *Streptococcus suis*: Major Actors in the Spreading of
486 Antimicrobial Resistance and Bacteriocin Synthesis Genes. *Pathogens* 2019;9(1):22.
487 10.3390/pathogens9010022
- 488 16. Dechêne-Tempier M, Marois-Créhan C, Libante V, Jouy E, Leblond-Bourget N, Payot S. Update
489 on the Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Mobile Resistome in the Emerging Zoonotic
490 Pathogen *Streptococcus suis*. *Microorganisms* 2021;9:1765. DOI: 10.3390/microorganisms9081765

- 491 17. Wang CZ, Wang MG, Chu YF, Sun RY, Li JG, Li XA, *et al.* Antibiotic Resistance Patterns and
492 Molecular Characterization of *Streptococcus suis* Isolates from Swine and Humans in China.
493 *Microbiol Spectr* 2023;e00309-23. DOI: 10.1128/spectrum.00309-23
- 494 18. Huang J, Ma J, Shang K, Hu X, Liang Y, Li D, *et al.* Evolution and Diversity of the Antimicrobial
495 Resistance Associated Mobilome in *Streptococcus suis*: A Probable Mobile Genetic Elements
496 Reservoir for Other Streptococci. *Front Cell Infect Microbiol* 2016;6:118. DOI:
497 10.3389/fcimb.2016.00118
- 498 19. Bellanger X, Payot S, Leblond-Bourget N, Guédon G. Conjugative and mobilizable genomic
499 islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiol Rev* 2014;38:720-60. DOI:
500 10.1111/1574-6976.12058
- 501 20. Wozniak RAF, Waldor MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic
502 elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:552-63. DOI:
503 10.1038/nrmicro2382
- 504 21. Coluzzi C, Guédon G, Devignes MD, Ambroset C, Loux V, Lacroix T, *et al.* A Glimpse into the
505 World of Integrative and Mobilizable Elements in Streptococci Reveals an Unexpected Diversity and
506 Novel Families of Mobilization Proteins. *Front Microbiol* 2017;8:443. DOI:
507 10.3389/fmicb.2017.00443
- 508 22. Guédon G, Libante V, Coluzzi C, Payot S, Leblond-Bourget N. The Obscure World of Integrative
509 and Mobilizable Elements, Highly Widespread Elements that Pirate Bacterial Conjugative Systems.
510 *Genes* 2017;8:337. DOI: 10.3390/genes8110337
- 511 23. Martin B, Quentin Y, Fichant G, Claverys JP. Independent evolution of competence regulatory
512 cascades in streptococci? *Trends Microbiol* 2006;14:339-45. DOI: 10.1016/j.tim.2006.06.007
- 513 24. Zaccaria E, Wels M, van Baarlen P, Wells JM. Temporal Regulation of the Transformosome and
514 Competence Development in *Streptococcus suis*. *Front Microbiol* 2016;7:1922. DOI :
515 10.3389/fmicb.2016.01922
- 516 25. Okura M, Nozawa T, Watanabe T, Murase K, Nakagawa I, Takamatsu D, *et al.* A Locus Encoding
517 Variable Defense Systems against Invading DNA Identified in *Streptococcus suis*. *Genome Biol Evol*
518 2017;9:1000-12. DOI: 10.1093/gbe/evx062
- 519 26. Dechêne-Tempier M, Jouy E, Bayon-Auboyer MH, Bougeard S, Chauvin C, Libante V, *et al.*
520 Antimicrobial resistance profiles of *Streptococcus suis* isolated from pigs, wild boars, and humans
521 in France between 1994 and 2020. *J Clin Microbiol* 2023;e00164-23. DOI: 10.1128/jcm.00164-23
- 522 27. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QCAST: quality assessment tool for genome
523 assemblies. *Bioinformatics* 2013;29:1072-5. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt086
- 524 28. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality
525 of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res*
526 2015;25:1043-55. DOI: 10.1101/gr.186072.114
- 527 29. Athey TBT, Teatero S, Lacouture S, Takamatsu D, Gottschalk M, Fittipaldi N. Determining
528 *Streptococcus suis* serotype from short-read whole-genome sequencing data. *BMC Microbiol.*
529 2016;16:162. DOI: 10.1186/s12866-016-0782-8

- 530 30. King SJ, Leigh JA, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, Dowson CG, *et al.* Development of a Multilocus
531 Sequence Typing Scheme for the Pig Pathogen *Streptococcus suis* : Identification of Virulent Clones
532 and Potential Capsular Serotype Exchange. *J Clin Microbiol* 2002;40:3671-80. DOI:
533 10.1128/JCM.40.10.3671-3680.2002
- 534 31. Spratt BG, Hanage WP, Li B, Aanensen DM, Feil EJ. Displaying the relatedness among isolates
535 of bacterial species – the eBURST approach. *FEMS Microbiol Lett* 2004;241:129-34. DOI:
536 10.1016/j.femsle.2004.11.015
- 537 32. Wu CF, Chen SH, Chou CC, Wang CM, Huang SW, Kuo HC. Serotype and multilocus sequence
538 typing of *Streptococcus suis* from diseased pigs in Taiwan. *Sci Rep* 2023;13:8263. DOI:
539 10.1038/s41598-023-33778-9.
- 540 33. Wileman TM, Weinert LA, Howell KJ, Wang J, Peters SE, Williamson SM, *et al.* Pathotyping the
541 Zoonotic Pathogen *Streptococcus suis*: Novel Genetic Markers To Differentiate Invasive Disease-
542 Associated Isolates from Non-Disease-Associated Isolates from England and Wales. *J Clin Microbiol*
543 2019;57:e01712-18. DOI: 10.1128/JCM.01712-18
- 544 34. Bosi E, Donati B, Galardini M, Brunetti S, Sagot MF, Lió P, *et al.* MeDuSa: a multi-draft based
545 scaffolder. *Bioinformatics* 2015;31:2443-51. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv171
- 546 35. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014;30:2068-9.
547 DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153
- 548 36. Lao J, Lacroix T, Guédon G, Coluzzi C, Payot S, Leblond-Bourget N, *et al.* ICEScreen: a tool to
549 detect Firmicute ICEs and IMEs, isolated or enclosed in composite structures. *NAR Genom*
550 *Bioinform* 2022;4:lqac079. DOI: 10.1093/nargab/lqac079
- 551 37. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, *et al.* Roary: rapid large-scale
552 prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 2015;31:3691-3. DOI:
553 10.1093/bioinformatics/btv421
- 554 38. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree: Computing Large Minimum Evolution Trees with
555 Profiles instead of a Distance Matrix. *Mol Biol Evol* 2009;26:1641-50. DOI: 10.1093/molbev/msp077
- 556 39. Olm MR, Brown CT, Brooks B, Banfield JF. dRep: a tool for fast and accurate genomic
557 comparisons that enables improved genome recovery from metagenomes through de-replication.
558 *ISME J* 2017;11:2864-8. DOI: 10.1038/ismej.2017.126
- 559 40. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, *et al.* Identification
560 of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2640-4. DOI:
561 10.1093/jac/dks261
- 562 41. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, *et al.* CARD 2020:
563 antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic*
564 *Acids Res* 2020;48:D517-D525. DOI: 10.1093/nar/gkz935
- 565 42. Hadjirin NF, Miller EL, Murray GGR, Yen PLK, Phuc HD, Wileman TM, *et al.* Large-scale genomic
566 analysis of antimicrobial resistance in the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *BMC Biol*
567 2021;19:191. DOI : 10.1186/s12915-021-01094-1

- 568 43. Yu R, Zhang Y, Xu Y, Schwarz S, Li XS, Shang YH, *et al.* Emergence of a *tet(M)* Variant Conferring
569 Resistance to Tigecycline in *Streptococcus suis*. *Front Vet Sci* 2021;8:709327. DOI :
570 10.3389/fvets.2021.709327
- 571 44. Huang J, Sun J, Wu Y, Chen L, Duan D, Lv X, *et al.* Identification and pathogenicity of an XDR
572 *Streptococcus suis* isolate that harbours the phenicol-oxazolidinone resistance genes *optrA* and *cfr*,
573 and the bacitracin resistance locus *bcrABDR*. *Int J Antimicrob Agents* 2019;54:43-8. DOI:
574 10.1016/j.ijantimicag.2019.04.003
- 575 45. Wickham H. Data Analysis. In: *ggplot2* Springer International Publishing; 2016; p. 189-201.
- 576 46. Conway JR, Lex A, Gehlenborg N. UpSetR: an R package for the visualization of intersecting
577 sets and their properties. *Bioinformatics* 2017;33:2938-40. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx364
- 578 47. Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in
579 multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 2016;32:2847-9. DOI:
580 10.1093/bioinformatics/btw313
- 581 48. Chen C, Zhang W, Zheng H, Lan R, Wang H, Du P, *et al.* Minimum Core Genome Sequence
582 Typing of Bacterial Pathogens: a Unified Approach for Clinical and Public Health Microbiology. *J Clin*
583 *Microbiol* 2013;51:2582-91. DOI: 10.1128/JCM.00535-13
- 584 49. Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species
585 definition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:19126-31. DOI: 10.1073/pnas.0906412106
- 586 50. Baig A, Weinert LA, Peters SE, Howell KJ, Chaudhuri RR, Wang J, *et al.* Whole genome
587 investigation of a divergent clade of the pathogen *Streptococcus suis*. *Front Microbiol* 2015;6:1191.
588 DOI: 10.3389/fmicb.2015.01191
- 589 51. Stevens MJA, Spoerry Serrano N, Cernela N, Schmitt S, Schrenzel J, Stephan R. Massive
590 Diversity in Whole-Genome Sequences of *Streptococcus suis* Strains from Infected Pigs in
591 Switzerland. *Microbiol Resour Announc* 2019;8:e01656-18. DOI: 10.1128/MRA.01656-18
- 592 52. Okura M, Takamatsu D, Maruyama F, Nozawa T, Nakagawa I, Osaki M, *et al.* Genetic Analysis
593 of Capsular Polysaccharide Synthesis Gene Clusters from All Serotypes of *Streptococcus suis*:
594 Potential Mechanisms for Generation of Capsular Variation. *Appl Environ Microbiol*
595 2013;79:2796-806. DOI : 10.1128/AEM.03742-12
- 596 53. Okura M, Auger JP, Shibahara T, Goyette-Desjardins G, Van Calsteren MR, Maruyama F, *et al.*
597 Capsular polysaccharide switching in *Streptococcus suis* modulates host cell interactions and
598 virulence. *Sci Rep* 2021;11:6513. DOI: 10.1038/s41598-021-85882-3
- 599 54. King SJ, Allen AG, Maskell DJ, Dowson CG, Whatmore AM. Distribution, Genetic Diversity, and
600 Variable Expression of the Gene Encoding Hyaluronate Lyase within the *Streptococcus suis*
601 Population. *J Bacteriol* 2004;186:4740-7. DOI: 10.1128/JB.186.14.4740-4747.2004
- 602 55. Wisselink H. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein
603 (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven
604 European countries. *Vet Microbiol* 2000;74:237-48. DOI: 10.1016/S0378-1135(00)00188-7
- 605 56. Berthelot-Hérault F, Morvan H, Kéribin AM, Gottschalk M, Kobisch M. Production of
606 Muraminidase-Released Protein (MRP), Extracellular Factor (EF) and Sulilysin by field isolates of

- 607 *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. *Vet Res*
608 2000;31:473-9. DOI: 10.1051/vetres:2000133
- 609 57. Florensa AF, Kaas RS, Clausen PTLC, Aytan-Aktug D, Aarestrup FM. ResFinder – an open online
610 resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data
611 and prediction of phenotypes from genotypes. *Microb Genom* 2022;8:000748. DOI:
612 10.1099/mgen.0.000748
- 613 58. Zhang C, Liu L, Zhang P, Cui J, Qin X, Ma L, *et al.* Characterization of a Novel Gene, *srpA*,
614 Conferring Resistance to Streptogramin A, Pleuromutilins, and Lincosamides in *Streptococcus suis*.
615 *Engineering* 2022;9:85-94. DOI : 10.1016/j.eng.2020.12.015
- 616 59. Ambroset C, Coluzzi C, Guédon G, Devignes MD, Loux V, Lacroix T, *et al.* New Insights into the
617 Classification and Integration Specificity of *Streptococcus* Integrative Conjugative Elements through
618 Extensive Genome Exploration. *Front Microbiol* 2016;6:1483. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01483
- 619 60. Schwarz S, Shen J, Kadlec K, Wang Y, Brenner Michael G, Feßler AT, *et al.* Lincosamides,
620 Streptogramins, Phenicols, and Pleuromutilins: Mode of Action and Mechanisms of Resistance.
621 *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016;6:a027037. DOI: 10.1101/cshperspect.a027037
- 622 61. Wang CY, Dawid S. Mobilization of Bacteriocins during Competence in Streptococci. *Trends*
623 *Microbiol* 2018;26:389-91. DOI : 10.1016/j.tim.2018.03.002

III. Etude expérimentale de l'excision et du transfert d'ICE et d'IME portant des gènes de résistance aux antibiotiques chez *S. suis*.

L'objectif du travail rapporté ici était d'évaluer la mobilité des gènes de résistance portés par des ICE et IME, identifiés dans les souches de *S. suis*, isolées en France, dont le génome a été séquencé par nos soins et d'estimer ainsi le risque de dissémination.

L'excision constitue la première étape du transfert d'un ICE d'une cellule bactérienne à une autre. Bien que la présence de plusieurs familles d'ICE ait été précédemment identifiée chez *S. suis* (Li et al., 2011; Iannelli et al., 2014; Huang et al., 2016; Libante et al., 2019; J. Wang et al., 2022), leur capacité d'excision n'avait pas encore été examinée de façon extensive. Dans ce travail, la capacité d'excision de six familles d'ICE (Tn916, ICESt3, TnGBS2, ICE_vanG, Tn1549 et Tn5252) a été étudiée. Une étude antérieure réalisée sur des souches canadiennes de *S. suis* avait identifié la prépondérance de gènes d'AbR localisés sur des IME chez ce pathogène (Libante et al., 2019). Suite au séquençage des génomes de souches isolées sur le territoire français, plusieurs IME porteurs de gènes AbR ont été sélectionnés afin d'analyser leur excision : des IME intégrés dans des ICE (IME_SNF2 et IME_PPI) et des IME intégrés dans des loci chromosomiques (IME_guaA et IME_HTH_XRE). Les résultats de cette étude ont révélé pour la première fois chez *S. suis* la capacité de transfert inter-espèces d'un ICE de la famille vanG, qui porte le gène de résistance à la tétracycline tet(W). De plus, l'étude a montré l'excision et la mobilisation d'IME_NSUI088_PPI. Enfin, IME_1492_PPI, porteur du gène tet(O), a été identifié comme capable de s'exciser. Cette étude met en lumière la capacité d'excision des ICE et de mobilisation des IME dans *S. suis*, soulignant les implications potentielles en matière de dissémination de la résistance aux antibiotiques.

i. Introduction

Une grande diversité d'ICE et IME portant des gènes d'AbR ont été identifiés chez *S. suis*, par exemple les ICE de la famille Tn5252, Tn916, TnGBS2 ou encore les ICE_vanG_lysS (Libante et al., 2019, J. Wang et al., 2022). Actuellement, chez *S. suis*, seuls des ICE des familles Tn1549 et Tn5252 ont été testés pour leur capacité d'excision et de transfert (Huang et al., 2016, Libante et al., 2019, J. Wang et al., 2022, C.-Z. Wang et al., 2023). La première étape de la conjugaison d'un élément intégratif (ICE et IME) nécessite son excision pour adopter une forme extra-chromosomique circulaire. Un module de recombinaison

composé d'une recombinaison à sérine, tyrosine ou d'une DDE transposase est activé. La deuxième étape de la conjugaison est le transfert. Celui-ci est dépendant d'un module de conjugaison avec une séquence origine de transfert (*oriT*) et codant une relaxase et un système de conjugaison (Bellanger et al., 2014). Le transfert des IME, indépendamment des ICE qui les portent, appelé « mobilisation en *trans* » n'a, à ma connaissance, jamais été démontrée chez *S. suis*. En revanche elle a déjà été décrite chez d'autres streptocoques. C'est le cas d'IME_*Ssall25_oriT* présent chez *Streptococcus salivarius* (Libante et al., 2020). Cette mobilisation en *trans* s'oppose à la mobilisation en *cis* qui consiste en un transfert d'un IME concomitant à celui de l'ICE qui le porte et qui a déjà été démontré (Libante et al., 2019, Wang et al., 2022).

Suite au séquençage, à l'assemblage et à l'annotation de 102 génomes de *S. suis*, différents ICE et IME portant des gènes d'AbR ont été identifiés (liste complète des éléments disponible dans le Tableau S1 de l'article 2 en annexe). Les ICE et IME ont été identifiés grâce au logiciel ICEscreen développé par l'Unité DynAMic en collaboration avec l'unité MAiAGE (INRAE, Jouy-en-Josas). Cet outil recherche des associations de différents gènes codant des protéines dites « étiquettes » caractéristiques des différentes familles d'éléments. Les protéines recherchées sont les intégrases (témoignant de la présence du module d'excision), les relaxases (Mob), les protéines de couplage (CP : supposées faire l'interface entre le complexe relaxase-ADN et le pore de conjugaison) et les protéines VirB4 (ATPases impliquées dans la formation du pore de conjugaison) (Lao et al., 2022).

La mobilisation en *trans* pourrait faire appel au concept « clé serrure » qui propose une notion de complémentarité entre la relaxase de l'IME et la CP de l'ICE ou entre la CP de l'IME et le MPF d'un élément conjugatif. Afin de tester cette hypothèse, différents critères de sélection ont été utilisés pour choisir les ICE et les IME à analyser. Pour les ICE, des représentants des six familles identifiées ont été sélectionnés. Ces ICE codent des relaxases appartenant à deux familles (MOB_P, ou MOB_T) et des CP de deux familles (TcpA ou VirD4). Des éléments de la famille Tn5252 non transférables car dépourvus de relaxase (éléments défectifs car mutés appelés dICE) ont également été sélectionnés. En effet, en absence de relaxase d'ICE, si la mobilisation d'un IME est mise en évidence, elle sera due à l'activité de la relaxase de l'IME qui pourra s'associer avec le MPF de l'ICE (mobilisation en *trans*).

ii. Matériel et méthodes

a. Sélection des souches à analyser

Les souches étudiées ont été sélectionnées pour leur contenu en ICE et en IME (Tableaux 2 et 3).

Tableau 2 : Caractéristiques des différents ICE d'intérêt et souches les portant.

| Souches | ICE | Relaxase | CP |
|--|------------------|---------------------|-------|
| 548 | Tn916 | MobT | TcpA |
| 1285, 1531 | ICES <i>t3</i> | MobT | TcpA |
| 1285, 1540, 1548, 1584 | dICE Tn5252 | (<u>mutation</u>) | VirD4 |
| 1492, 1584 | Tn1549 | MobP | VirD4 |
| 1537, 1540, 1552 | ICE_ <i>vanG</i> | MobP | VirD4 |
| 1595, 1597 | TnGBS2 | MobP | VirD4 |
| 277, 281, 430, 440, 450, 488, 548, 568, 1034 1218, 1333, 1476, 1492, 1534,1537, 1601 | Tn5252 | MobP | VirD4 |

Pour les IME, ceux-ci ont été sélectionnés en fonction de leur contenu en gènes AbR (article 2 Tableau S1 en annexe) et la présence chez la même souche d'ICE co-résident(s) potentiellement mobilisateurs (Tableau 3).

Tableau 3 : Souches sélectionnées pour leur contenu en IME et ICE.

| Souche | IME d'intérêt (gène AbR porté) | Relaxase | CP | ICE porteur de l'IME d'intérêt (site d'insertion) et ICE co-résident(s) | Relaxase | CP |
|--------|---|----------|-----|---|--------------|----------------|
| 277 | IME_ <i>SNF2 tet(O)</i> | MobV | Non | Tn5252 (rplL) | MobP | VirD4 |
| 281 | dIME_ <i>SNF2 tet(O)</i> | MobV | Non | Tn5252 (rplL) | MobP | VirD4 |
| 430 | IME_ <i>SNF2 tet(O)</i> | MobV | Non | Tn5252 (rplL) TnGBS2 | MobP MobP | VirD4 VirD4 |
| 450 | IME_ <i>SNF2 tet(40), tet(O/W/32/O)</i> | MobV | Non | Tn5252 (rumA) Tn5252 (rumA) dTn1549 | MobP MobP | VirD4 VirD4 |

| | | | | | | |
|------|--|-------------------------|-----|---|--------------------------------------|---|
| 548 | dIME_ <i>SNF2</i> <i>tet</i> (O), <i>erm</i> (B) | MobV | Non | Tn5252 (<i>rplL</i>) Tn <i>GBS2</i> Tn <i>916</i> | MobP MobP MobT | VirD4 VirD4 TcpA |
| 1034 | IME_ <i>PPI</i> <i>tet</i> (O), <i>ant</i> (9)- <i>Ia</i> , <i>erm</i> (B) | MobV | Non | Tn5252* (<i>mutT</i>) Tn5252* (<i>mutT</i>) Tn5252* (<i>mutT</i>) Tn1549 (<i>rplL</i>) ICE <i>vanG lysS</i> | MobP MobP MobP MobP MobP | VirD4 VirD4 VirD4 VirD4 VirD4 |
| 1218 | IME_ <i>SNF2</i> <i>tet</i> (O) | MobV | Non | Tn5252 (<i>mutT</i>) Tn1549 | MobP MobP | VirD4 VirD4 |
| 1285 | IME_ <i>SNF2</i> <i>tet</i> (O) | MobV | Non | dTn5252, (<i>rumA</i>) ICE <i>St3</i> | MobP MobT | VirD4 TcpA |
| 1285 | HTH_XRE <i>ant</i> (9)- <i>Ia</i> | MobV | Non | dTn5252, (<i>rumA</i>) ICE <i>St3</i> | MobP MobT | VirD4 TcpA |
| 1333 | dIME_ <i>SNF2</i> <i>tet</i> (O/W/32/O), <i>erm</i> (B) | MobV | Non | Tn5252 (<i>rplL</i>) dTn <i>GBS2</i> Tn1549 | MobP MobP MobP | VirD4 VirD4 VirD4 |
| 1531 | IME_ <i>guaA</i> (<i>ermB</i>) | Rel PF01719- PF00910 | Non | ICE <i>St3</i> | MobT | TcpA |
| 1492 | IME_ <i>PPI</i> <i>tet</i> (O) | MobV | Non | Tn5252 (<i>rumA</i>) Tn1549 | MobP MobP | VirD4 VirD4 |
| 1601 | IME_ <i>SNF2</i> <i>tet</i> (O), <i>erm</i> (B) | MobV | Non | Tn5252* (<i>mutT</i>) dTn1549 | MobP MobP | VirD4 VirD4 |
| 1607 | IME_ <i>SNF2</i> <i>tet</i> (O), <i>erm</i> (B) | MobV | Non | Tn5252 (<i>rumA</i>) Tn5252 | MobP MobP | VirD4 VirD4 |

Pour chaque souche, est indiqué l'IME avec son site d'insertion, les gènes de résistance portés, la famille de la relaxase codée et l'absence de protéine de couplage pour les IME est indiqué par un : Non. Les ICE Tn5252 portant des IME insérés dans les gènes *SNF2* ou *PPI* sont indiqués en gras dans le tableau. Leur site d'insertion a été précisé entre parenthèses. Les éléments défectifs sont signalés avec un d (dICE et dIME), les éléments partiels sont signifiés avec un astérisque (*). Sont également indiqué les ICE co-résidents puis pour leurs relaxases et les CP, les familles auxquelles elles appartiennent.

Chapitre de livre : “ Detection and quantification of conjugative transfer of Mobile Genetic Elements carrying antibiotic resistance genes in *Streptococcus suis*”.

Sera publié en Novembre 2023 dans *Streptococcus suis : Methods & Protocols* - Springer

L'intégralité de ce chapitre est reproduit en **Annexe 4**.

Ce chapitre explique les démarches, le matériel nécessaire et les procédures à suivre pour l'étude des ICE et IME, du choix des souches étudiées aux vérifications des expériences de conjugaison.

b. Extraction ADN_g

La lyse bactérienne a été faite sous l'action du lysozyme. Un volume de 10 mL de culture d'une nuit a été centrifugées 10 minutes à 10 000 rpm. Le culot a été repris dans 500 µL de Tris EDTA (TE) 1X. 20 µL de lysozyme (50 mg/mL (p/v)) et 5µL de ribonucléase ont ensuite été ajoutés et une incubation de 30 à 45 min à 37°C a été réalisée. La dégradation des protéines et l'inhibition des nucléases a été faite avec l'ajout de 10 µL de protéinase K (20 mg/mL) et 60 µL d'une solution d'EDTA (0,5M, pH=8). Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 10 minutes. Puis la dénaturation des protéines a été faite avec l'ajout de 60 µL de SDS 10% et une incubation à 50°C pendant 1 à 2 heures. La précipitation de l'ADN a été faite dans de la glace avec ajout de 350 µL d'acétate de potassium (5M, 3M pH5,5) pendant 10 minutes. Les tubes ont ensuite été centrifugés deux fois 10 minutes à vitesse maximale (20000 g) et à une température de 4°C afin d'éliminer le maximum de protéines. Le surnageant a ensuite été repris dans 1 mL d'isopropanol et centrifugé à 20000g pour obtenir un culot d'ADN. Ce dernier a été lavé deux fois avec de l'éthanol 70%. Enfin, le culot déshydraté a été remis en suspension dans 200µL de TE 1X. La qualité de l'extraction a été vérifiée sur gel d'agarose 1,2% avec 15µL d'extrait déposé. Le gel d'agarose contenant l'ADN a été soumis à un champ électrique de 100 volts pendant 1h dans un tampon TBE (Tris Borate EDTA) avant d'être exposé aux UV après coloration au Sybr safe. Les extraits ont ensuite été dilués au 1/100 dans 1 mL d'eau ultra-pure et dosés au nanodrop DS-11 Spectrophotomètre DENOVIIX.

c. Amplifications de fragments d'ADN par PCR

La conception des amorces a été effectuée grâce à l'outil « PrimerQuest Tool » disponible sur le site (www.idtdna.com), en utilisant comme paramètres une séquence de ± 20 nucléotides, un $T_m \pm 52^\circ\text{C}$ et un pourcentage en GC de 45%. L'amorce a ensuite été vérifiée avec l'outil « OligoAnalyzer » (www.idtdna.com) afin de s'assurer que l'oligonucléotide ne formait pas d'homodimère ni d'hétérodimère avec l'autre amorce utilisée pour la réaction de la PCR. La liste des amorces utilisées est présente en annexe 8. Les réactions PCR ont été réalisées en utilisant les préconisations du fournisseur comme indiqué en annexe 6 et 7. Les fragments PCR

ont ensuite été révélés par migration sur gel d'agarose à 1,5% dans du TBE 1X. Deux marqueurs de taille ont été utilisés, le « GeneRuler 100bp DNA » et le « GeneRuler 1Kb+ DNA » en fonction de la taille des fragments attendus. Les produits amplifiés ont ensuite été révélés par du BET puis visualisés sous UV comme expliqué dans le chapitre de livre).

d. Séquençage des fragments *att*

Les ADN à séquencer ont été préparés à une concentration de 10 à 50 ng/μL. Les amorces ont été préparées à une concentration de 10 pM/μL. Le séquençage Sanger a été effectué par la société Azenta. L'analyse des séquences a été réalisée sur Geneious Prime.

e. Analyse *in silico* des souches

Toutes les souches ont été analysées en utilisant le pipeline BAGEL disponible sur le site (<http://bagel4.molgenrug.nl/>) (Van Heel et al., 2018 consulté le 16/05/2022).

f. Tests de production de bactériocines

La méthode a été réalisée comme décrite dans les travaux précédemment réalisés au laboratoire (Libante et al., 2019). La souche indicatrice utilisée était *S. thermophilus* LMG18311.

g. Tests de conjugaison des éléments conjugatifs/mobilisables :

La méthode de conjugaison sur filtres a été réalisée comme décrite par Libante et col. Figure 40 (Libante et al., 2019). L'autre méthode de conjugaison utilisant des billes d'alginate a également été adapté des travaux de Herviou et col. Figure 41 (Herviou et al., 2023). La remise en croissance des souches donatrices et réceptrices a été faite dans les mêmes conditions pour les deux méthodes.

La principale différence concerne l'étape de co-culture. Pour les filtres, elle se fait après étalement de la co-culture sur membrane de nitrocellulose apposé sur une gélose nutritive LM17 0,6% agar « soft ». Ces géloses sont ensuite incubées une nuit à 37°C puis les cellules sont récupérées sur le filtre par remise en suspension dans du milieu en vortexant vigoureusement le filtre avant dilution et étalement sur milieu sélectif. Pour les billes, la co-culture est faite dans des billes d'alginate formées grâce à une polymérisation de l'alginate au contact du CaCl₂. Les co-cultures dans leur matrice d'alginate sont lavées dans du NaCl 0,9% et sont ensuite incubées 4h dans du milieu de culture avant d'être dépolymérisées dans une solution de citrate EDTA

(50 mM EDTA ; 55 mM Citrate de sodium ; 150 mM NaCl). Après centrifugation (5 min. à 4000g) le culot cellulaire est ensuite dilué séquentiellement avant d'être étalé sur milieu sélectif. Suite à ces tests, des fréquences de conjugaison sont ensuite calculées en faisant le ratio de la concentration d'UFC sur les boîtes double antibiotiques (correspondant aux transconjugants putatifs = Tcp) vis-à-vis de la concentration en UFC sur les boîtes simple antibiotique correspondant à la souche donneuse (D) ou receveuse (R). Quatre Tcp ont été remis en culture dans un milieu liquide sélectif contenant les deux antibiotiques. Les Tcp ont été vérifiés par PCR en testant l'amplification des gènes *cse* (spécifique de *S. thermophilus*) et région *ITS* et/ou le sérotype spécifique des souches de *S. suis* afin de s'assurer de l'identité de la souche bactérienne. L'amplification du site *attR* de l'élément étudié a également été testée afin de vérifier le transfert de l'élément (liste des amorces en annexes 8).

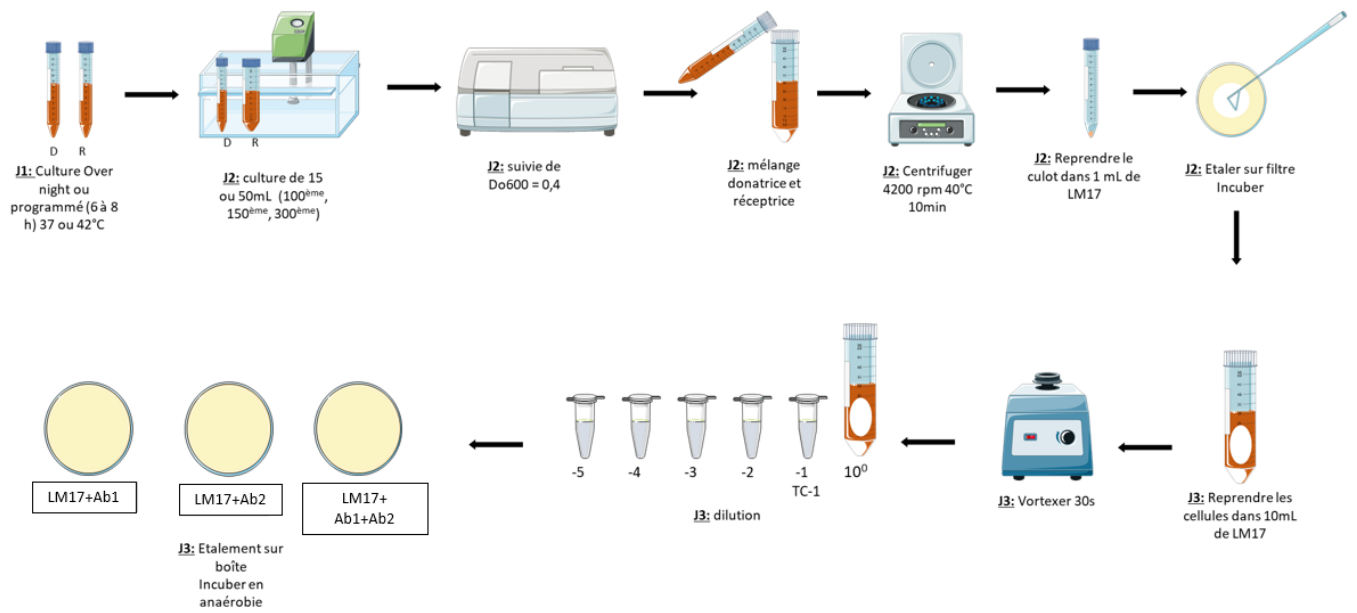


Figure 40 : représentation schématique du protocole de conjugaison sur filtre. L. Thiriet com. pers.

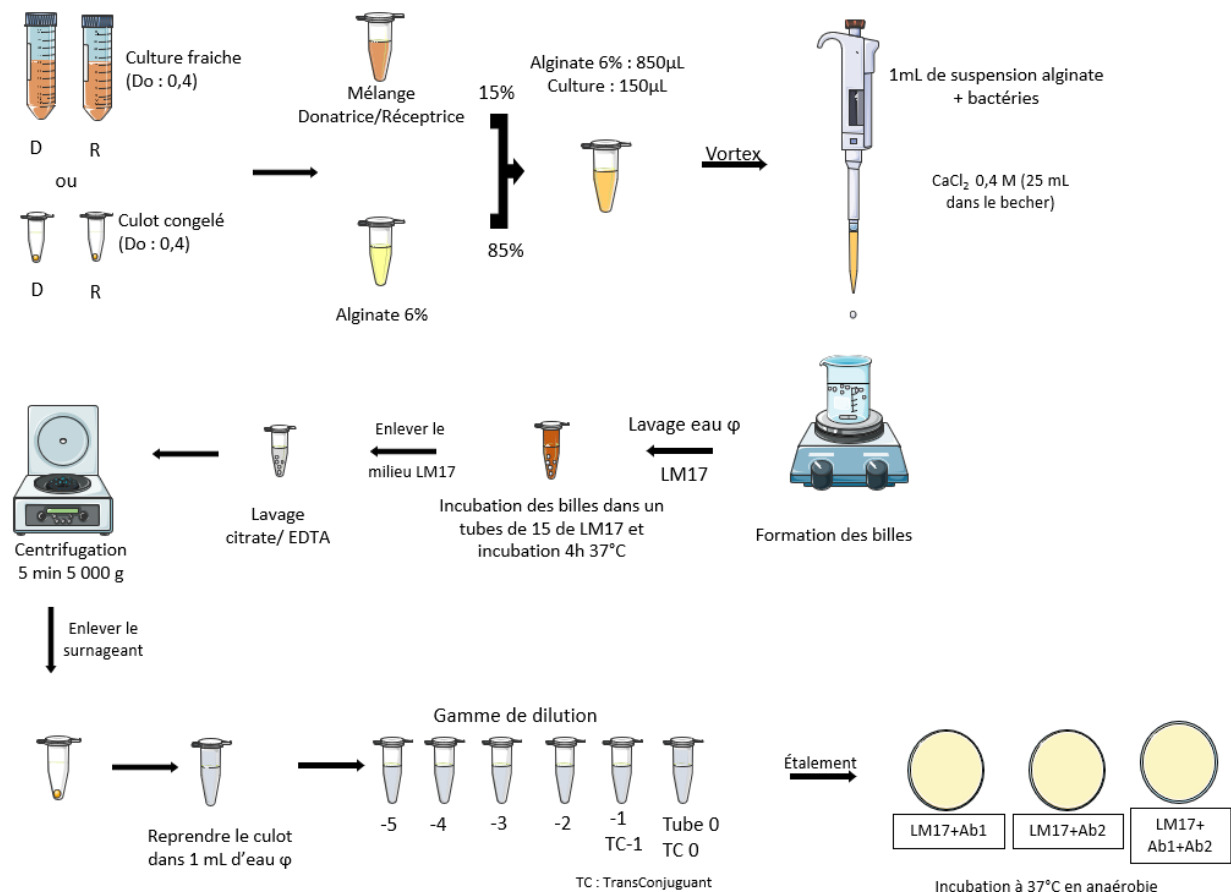


Figure 41 : Représentation schématique du protocole de conjugaison en billes. L. Thiriet com. pers.

h. Congélation des culots bactériens

Les souches ont été mises en cultures dans 15 mL de milieu LM17 à 37°C jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,4. Les cultures ont ensuite été centrifugées 10 minutes à 4 000 rpm et les culots repris deux fois dans du PBS 1% (v/v). A l'issue des deux lavages, les culots ont été congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C.

iii. Résultats et Discussion

a. Tests d'excision des éléments intégratifs

i. Tests d'excision des ICE d'intérêt

Le tableau 4 reprend les résultats des tests d'excisions obtenus pour les ICE d'intérêt.

Tableau 4 Tests d'excisions effectués sur les ICE et dICE d'intérêt.

| Souche | Famille d'ICE (site d'intégration) | AbR | Couples d'amorces | | | | Excision |
|--------|--|--|-------------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| | | | <i>attL</i> | <i>attR</i> | <i>attI</i> | <i>attB</i> | |
| 1531 | <i>ICES_{t3}*</i> (<i>tRNALys</i>) | Non | 1835-1836 | 501-1837 | 1837-1836 | 1835-501 | - |
| 1285 | <i>ICES_{t3}</i> (<i>tRNALys</i>) | Non | 2323-2324 | 2322-2321 | 2322-2224 | 2323-2321 | Oui |
| 1492 | Tn1549 (<i>rbgA</i>) | <i>erm</i> (B) | 1827-1828 | 1861-1862 | 1827-1862 | 1861-1828 | - |
| 440 | Tn5252 (<i>ADP-R</i>) | <i>erm</i> (B) | 2279-2280 | 878-1852 | 878-2280 | 2279-1852 | - |
| 488 | Tn5252 (<i>ADP-R</i>) | Non | 2281-2282 | 2283-1850 | 2283-2282 | 2281-1850 | - |
| 1534 | Tn5252 (<i>ADP-R</i>) | Non | 1850-1851 | 1852-878 | 878-1851 | 1850-1852 | Oui |
| 1540 | Tn5252 (<i>ADP-R</i>) | Non | 1850-1851 | 1852-878 | 878-1851 | 1850-1852 | Oui |
| 1540 | Tn5252 (<i>luciférase-M</i>) | Non | 1842-1843 | 1844-1845 | 1843-1844 | 1842-1845 | Oui |
| 1552 | Tn5252 (<i>luciférase-M</i>) | Non | 1842-1843 | 1844-1845 | 1843-1844 | 1842-1845 | Oui |
| 1034 | Tn5252 (<i>mutT</i>) | Non | 2235-1847 | 1848-2236 | 1848-1847 | 2235-2236 | Oui |
| 1218 | Tn5252 (<i>mutT</i>) | Non | 1846-1847 | 2288-2289 | 2288-1847 | 1846-2289 | - |
| 1537 | Tn5252 (<i>mutT</i>) | Non | 1846-1847 | 1848-1849 | 1848-1847 | 1846-1849 | Oui |
| 1548 | Tn5252 (<i>mutT</i>) | Non | 1846-1847 | 1848-1849 | 1848-1847 | 1846-1849 | Oui |
| 1540 | Tn5252 (<i>mutT</i>) | Non | 1846-1847 | 1848-1849 | 1848-1847 | 1846-1849 | Oui |
| 1601 | Tn5252* (<i>mutT</i>) | Non | 1846-1847 | 1389-1830 | 1389-1847 | 1846-1830 | - |
| 277 | Tn5252 (<i>rplL</i>) | Non | 858-34 | 507-878 | 34-878 | 507-858 | Oui |
| 281 | Tn5252 (<i>rplL</i>) | <i>ant6Ia</i> , <i>sat4</i> , <i>erm</i> (B) | 858-34 | 507-878 | 34-878 | 507-858 | Oui |
| 430 | Tn5252 (<i>rplL</i>) | <i>erm</i> (B) | 858-166 | 861-507 | 861-166 | 858-507 | - |
| 548 | Tn5252 (<i>rplL</i>) | Non | 2284-2285 | 2286-2287 | 2286-2285 | 2284-2287 | - |
| 1333 | Tn5252 (<i>rplL</i>) | Non | 858-34 | 878-859 | 34-878 | 858-859 | Oui |
| 1476 | Tn5252 (<i>rplL</i>) | <i>erm</i> (B) | 858-34 | 507-878 | 34-878 | 507-858 | Oui |
| 450 | Tn5252 (<i>rumA</i>) | Non | 877-876 | 878-879 | 877-878 | 879-876 | Oui |
| 1492 | Tn5252 (<i>rumA</i>) | Non | 1829-876 | 878-879 | 1829-878 | 879-876 | Oui |
| 1285 | Tn5252* (<i>rumA</i>) | Non | 877-876 | 878-879 | 877-878 | 879-876 | - |
| 548 | Tn916 | <i>tet</i> (M) | 2284-2285 | 2286-2287 | 2286-2285 | 2284-2287 | - |
| 1595 | TnGBS2 | Non | 1859-1858 | 1857-1856 | 1857-1858 | 1859-1856 | Oui |

| | | | | | | | |
|-------------|-----------------------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----|
| 1597 | TnGBS2 | Non | 1859-1858 | 1857-1856 | 1857-1858 | 1859-1856 | Oui |
| 1537 | ICE_ <i>vanG_lysS</i> | <i>tet</i> (W) | 1844-1845 | 1842-1843 | 1843-1844 | 1842-1845 | Oui |
| 1540 | ICE_ <i>vanG_lysS</i> | <i>tet</i> (W) | 1844-1845 | 1842-1843 | 1843-1844 | 1842-1845 | Oui |
| 1552 | ICE_ <i>vanG_lysS</i> | <i>tet</i> (W) | 1844-1845 | 1842-1843 | 1843-1844 | 1842-1845 | Oui |

Pour chaque souche (colone de gauche) est indiqué l'ICE d'intérêt, éventuellement son site d'insertion entre parenthèses, les gènes d'AbR porté et les couples d'amorces utilisés pour détecter les différents sites *att*. (*) dICE : éléments qui présentent des gènes de recombinaison ou conjugaison tronqués. Les « - » signalent les ICE pour lesquelles il n'y a pas de détection d'amplicon *attI* ou *attB*. Les amplicons *attI* et/ou *attB* ont été séquencés afin de confirmer les résultats positifs. La liste complète des amorces est présentée en annexe 8.

Chez la souche 1285, l'ICE_*Ssu1285_tRNALys* de la famille ICES*t3* (qui possède une relaxase de la famille MOB_T et une protéine de couplage de la famille Tc*pA*) a montré des amplicons compatibles avec la taille théorique attendue pour les amplicons *attI* et *attB*. Cette souche porte par ailleurs un dICE de la famille Tn5252 qui héberge un IME, inséré dans le gène *SNF2*, portant le gène de résistance *tet*(O). L'excision de cet élément composite n'a pas été détectée. Cette souche héberge un autre IME : IME_*Ssu1285_HTH-XRE* qui porte également un gène de résistance aux antibiotiques (*ant*(6)-Ia). L'ICE de la famille ICES*t3* pourrait servir d'ICE helper pour le transfert en *trans* d'IME_*Ssu 1285_SNF2* et IME_*Ssu 1285_HTH-XRE* co-résidents dans cette souche.

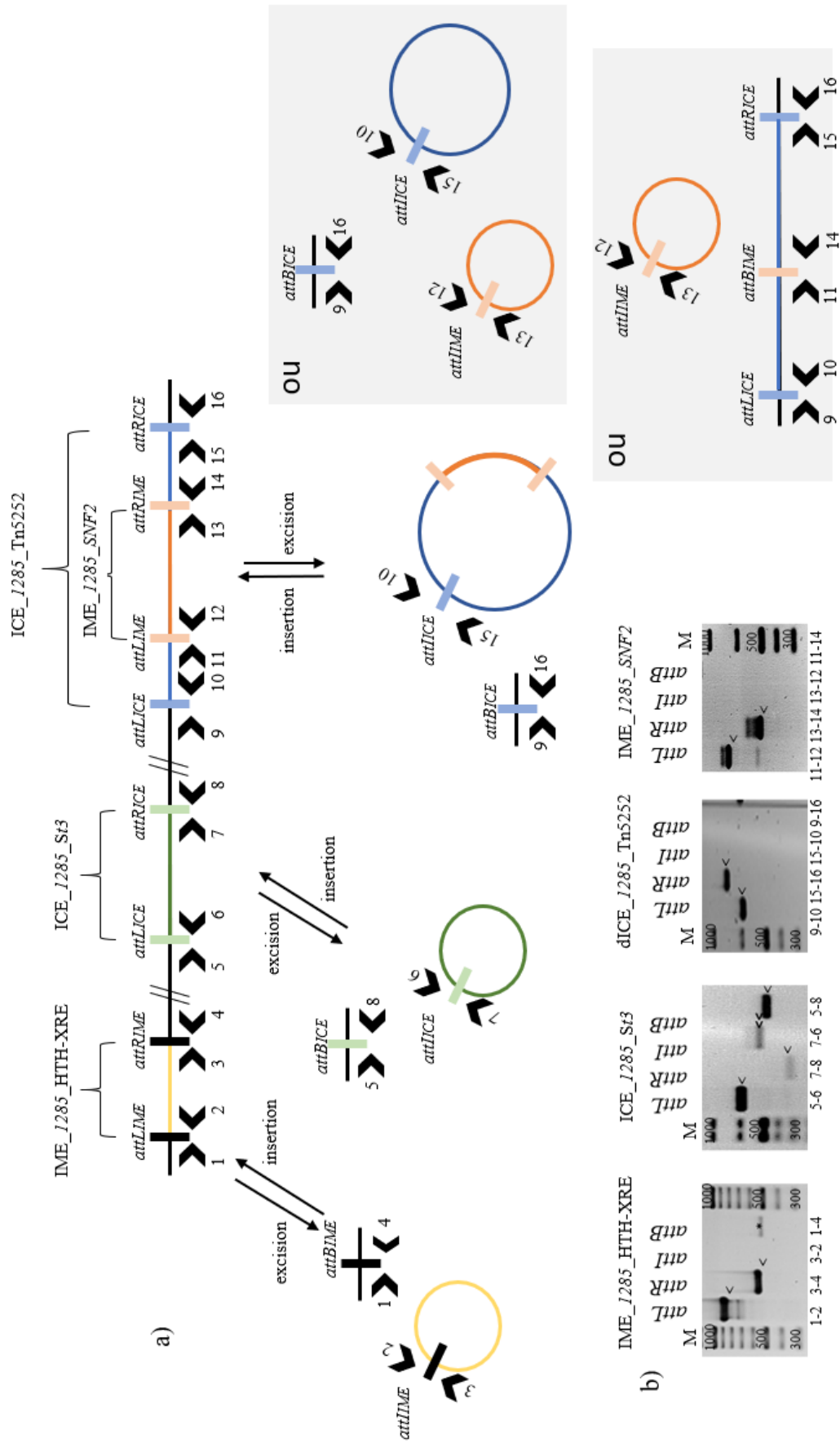


Figure 42 : Tests d'excisions des ICE et IME présents chez la souche *S. suis* 1285. (a) Diagramme montrant la localisation des amorces PCR (chevrons numérotés) utilisés pour détecter les formes intégrées des éléments (*attR* et *attL* pour les sites d'attachements à droite et à gauche, respectivement) et les formes excisées (*attI* pour la forme circulaire des éléments intégratifs et *attB* pour le site bactérien vide) si (i) l'élément composite ICE/IME s'excise, (ii) les deux éléments s'excisent séparément ou (iii) seul l'IME s'excise ; (b) Produits PCR obtenus avec les paires d'amorces (numéros indiqués en bas du gel) lors de l'analyse de l'excision, la taille des fragments PCR a été confirmée par la migration parallèle d'une échelle d'ADN (M pour marqueur de taille sur la figure). Les amplicons présentant des tailles cohérentes avec les tailles attendues ont été significés avec une flèche (<). L'amplicon correspondant à une amplification non spécifique et de taille incohérente avec la taille attendue est significé avec un astérisque (*). Lorsqu'un séquençage a été réalisé, il est indiqué par une double flèche (<<). Les doubles traits verticaux (//) désignent une distance entre les éléments.

Au total, 21 ICE de la famille Tn5252, insérés dans cinq sites différents, ont été testés pour leur capacité à s'exciser. Pour ce qui est des ICE insérés dans un gène codant pour une ADP ribose pyrophosphatase, quatre ICE, possédant un module de recombinaison comprenant trois recombinases à sérine, ont été testés. Deux ICE (souches 1534 et 1540) présentent des amplicons compatibles avec les tailles théoriques attendues pour les amplicons *attI* et *attB*. Le module de recombinaison de ces deux ICE est donc fonctionnel. Les ICE insérés dans un gène codant pour une luciférase monooxygénase (souches 1540 et 1552) avec trois recombinases à sérine, sont également capables de s'exciser. Parmi les six ICE insérés dans un gène *mutT* (avec trois recombinases à sérine dans leur module de recombinaison), quatre sont capables de s'exciser (souches 1034, 1537, 1540 et 1548). Concernant les ICE insérés dans un gène *rplL* (avec recombinase à tyrosine dans leur module de recombinaison), six ICE ont été testés et quatre sont capables de s'exciser (souches 277, 281, 1333, 1476). De plus, deux ICE intégrés dans un gène *rumA* (avec trois recombinases à sérine, chez les souches 450 et 1492) montrent une fonctionnalité de leur module de recombinaison.

Aucune excision n'a été observée pour l'ICE de la famille Tn916 testé.

Deux ICE de la famille TnGBS2 ont également été testés. Un signal n'a été observé que pour l'amplicon *attI*. La séquence de cet amplicon a été confirmée par séquençage pour la souche 1595 (Figure 43). C'est la première fois que l'excision d'un ICE de la famille TnGBS2 est mise en évidence chez *S. suis*.

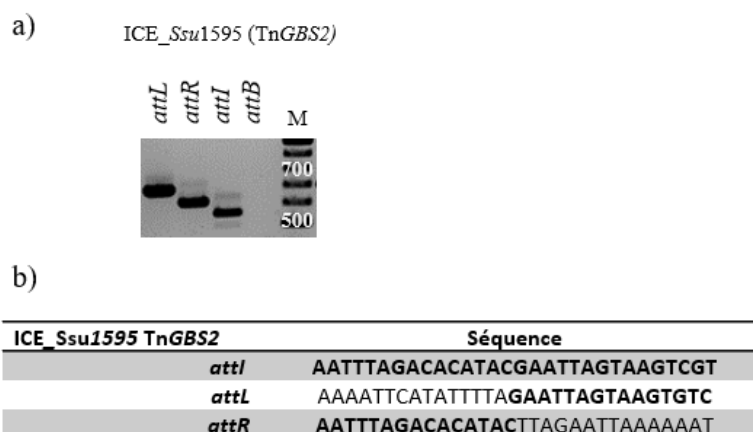


Figure 43 : Excision d'ICE_ *Ssu1595* TnGBS2. (a) La taille des fragments PCR a été confirmée par la migration parallèle d'une échelle d'ADN (M pour marqueur de taille sur la figure). (b) La séquence « *attI* » correspond au séquençage de l'amplicon *attI*. Les séquences chromosomiques bactériennes *attL* et *attR* sont issues du séquençage des génomes. Les séquences alignées avec *attI* sont représentées en gras.

Des amplicons, compatibles avec la taille théorique attendue pour les amplicons *attI* et *attB*, ont été obtenus pour les trois ICE de la famille ICE-*vanG_lysS*, portant le gène de résistance à la tétracycline *tet(W)*. Le séquençage des amplicons issus des PCR ciblant les régions *attI* et *attB* de la souche 1552 ont permis de confirmer l'excision de l'élément et sont présentés dans la Figure 44. C'est également la première fois que l'excision d'ICE de cette famille est démontrée chez *S. suis*.

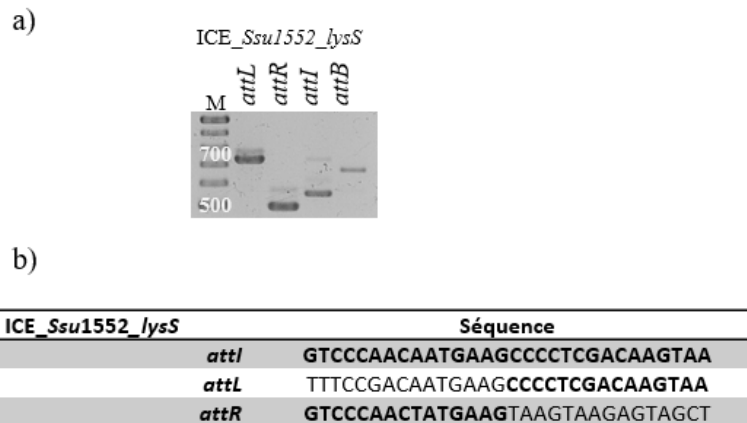


Figure 44 : Excision d'ICE_ *Ssu1552_lysS*. (a) La taille des fragments PCR a été confirmée par la migration parallèle d'une échelle d'ADN (M pour marqueur de taille sur la figure). (b) La séquence *attI* a été obtenue après séquençage de l'amplicon *attI*. Les séquences chromosomiques bactériennes *attL* et *attR* sont issues du séquençage des génomes. Les séquences contribuant à générer le site *attI* sont représentées en gras.

ii. Tests d'excision des IME d'intérêt

Le tableau 5 reprend les résultats des tests d'excisions obtenus pour les IME d'intérêt.

Tableau 5 : Tests d'excision réalisés sur les IME d'intérêt

| Souche | Famille d'IME | AbR | Couples d'amorces | | | | Excision |
|--------|---------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------|
| | | | <i>attL</i> | <i>attR</i> | <i>attI</i> | <i>attB</i> | |
| 277 | dIME_SNF2 | <i>tet(O)</i> | 1389-1830 | 886-1581 | 886-1830 | 1389-1581 | - |
| 281 | dIME_SNF2 | <i>tet(O)</i> | 1389-1412 | 886-1361 | 886-1412 | 1389-1361 | - |
| 430 | IME_SNF2 | <i>tet(O)</i> | 1389-1830 | 327-328 | 1389-327 | 1830-328 | - |
| | | | 863-1830 | 886-1834 | 886-1830 | 863-1834 | - |
| 450 | IME_SNF2 | <i>tet(40), tet(O/W/32/O)</i> | 1389-1830 | 1580-1834 | 1834-1830 | 1389-1580 | - |
| 548 | dIME_SNF2 | <i>tet(O), ermB</i> | 1389-863 | 327-1834 | 1384-327 | 1834-863 | - |
| 1034 | IME_PPI | <i>tet(O), ant6Ia, ermB</i> | 866-1834 | 1830-1831 | 1830-1834 | 866-1831 | - |
| 1218 | dIME_SNF2 | <i>tet(O)</i> | 1389-1830 | 886-864 | 1830-886 | 1389-864 | - |
| 1285 | IME_SNF2 | <i>tet(O)</i> | 1389-1830 | 1834-1580 | 1830-1834 | 1389-1580 | - |
| 1285 | HTH_XRE | <i>ant(9)-Ia</i> | 2237-2238 | 2239-2240 | 2238-2239 | 2237-2240 | - |
| 1333 | dIME_SNF2 | <i>tet(O/W/32/O, ermB)</i> | 1830-1831 | 1834-866 | 1834-1830 | 866-1831 | - |
| 1492 | IME_PPI | <i>tet(O)</i> | 866-875 | 1830-865 | 1830-875 | 866-865 | - |
| | | | PCR nichée: 866-1834 | PCR nichée: 863-865 | PCR nichée: 863-1834 | PCR nichée: 866-865 | Oui |
| 1531 | IME_guaA | <i>ermB</i> | 1842-1843 | 1844-1845 | 1843-1844 | 1842-1845 | - |
| | | | 1838-1839 | 1840-1841 | 1840-1839 | 1838-1841 | - |
| | | | PCR nichée: 2333-2334 | PCR nichée: 2335-2236 | PCR nichée: 2335-2334 | PCR nichée: 2333-2336 | - |
| 1601 | dIME_SNF2 | <i>tet(O), ermB</i> | 864-875 | 889-1505 | 889-875 | 864-1505 | - |
| | | | 1389-1830 | 1846-1847 | 1846-1830 | 1847-1389 | - |
| 1607 | IME_SNF2 | <i>tet(O), ermB</i> | 1389-1830 | 1846-1847 | 1846-1830 | 1847-1389 | - |

Pour chaque souche (colonne de gauche) est indiqué l'IME d'intérêt, les gènes d'AbR portés et les couples d'amorces utilisés pour détecter les différents sites *att*. dIME : éléments qui présentent des gènes (de recombinaison ou relaxase) tronqués (ici sérine recombinase). Les « - » signalent les IME pour lesquelles il n'y a pas de détection d'amplicon *attI* ou *attB*. Dans certains cas, des PCR nichées ont été réalisées avec des couples d'amorces différents. Les amplicons *attI* et/ou *attB* ont été séquencés afin de confirmer les résultats positifs. La liste complète des amorces est présentée en annexe 8.

Des amplicons ont été obtenus pour deux IME (IME_Ssu1492_PPI et IME_Ssu1531_guaA) (Tableau 5). Cependant, la taille des amplicons n'était pas celle déduite de l'analyse de séquence génomique (Figure 45b). Afin d'augmenter la sensibilité et la spécificité de détection des PCR nichées ont été réalisées sur deux IME différents : un IME_PPI et un IME_guaA. Des fragments d'amplification des régions *attI* et *attB* ayant les tailles proches de celles attendues ont été obtenus dans les deux cas. Ces amplicons ont été séquencés. Les résultats obtenus ont confirmé la détection d'un site *attI* pour IME_Ssu1492_PPI de la souche

Quatre souches de *S. suis* (109, 430, 1527 et 1597) ont montré une activité antibactérienne contre la souche indicatrice *S. thermophilus* LMG18311 (Figure 46) précédemment utilisée pour des tests de production de bactériocines (Libante et al., 2019).

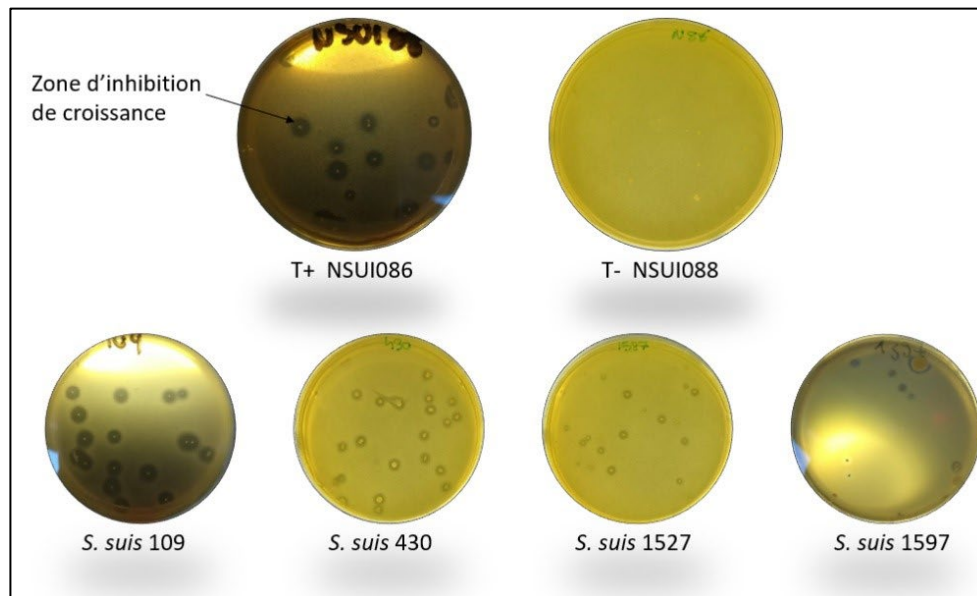


Figure 46 : Tests de production de bactériocines par des souches de *S. suis*. La souche de *S. suis* NSUI086 a été utilisée en tant que témoin positif (T+) de production de bactériocines. La souche de *S. suis* NSUI088 a été utilisée en tant que témoin négatif (T-). Les souches productrices sont les souches de *S. suis* 109, 430, 1527 et 1597. Les résultats des souches non productrices ne sont pas présentés.

La souche 109 a été identifiée par BAGEL comme codant pour une streptococcine_A-FF22. Cette bactériocine appartient à la classe 1, qui a pour caractéristique d'être de petite taille (26 acides-aminés) et résistante à la chaleur (Vogel et Spellerberg, 2021). McLaughlin et col. ont caractérisé les gènes impliqués dans la production de cette bactériocine. Les gènes (n=9) sont organisés en trois opérons, impliqués dans (1) la régulation de la production, (2) la biosynthèse et (3) l'immunité (McLaughlin et al., 1999). Des analyses génétiques ont mis en évidence la possibilité d'un transfert horizontal de ces gènes (Wescombe et al., 2006). L'analyse du génome de la souche 109 a révélé la présence de gènes impliqués dans la biosynthèse d'une autre activité antibactérienne, un lantibiotique sur un ICE de la famille *Tn5252*. Cette bactériocine provoque la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible induisant ainsi une instabilité membranaire conduisant à la perméabilisation de la membrane (McLaughlin et al., 1999, Vogel & Spellerberg, 2021). Cette souche a été exclue des souches candidates à des expériences de conjugaison.

La souche 430 a été identifiée par BAGEL comme codant pour un « Bacteriocin-like peptide » BlpJ. Cette bactériocine appartient à la classe 2, de par sa petite taille, et le fait que ce peptide ne semble pas être mûri à la suite de modifications post-traductionnelles, explique que sa biosynthèse ne nécessite que peu de gènes. Les gènes (n= 4) impliqués dans la production de cette bactériocine sont arrangés en deux opérons (Wholey et al., 2019). Ces gènes codent pour différentes cascades de signalisation dont une impliquée dans le mécanisme de compétence chez *S. pneumoniae*. Cette bactériocine provoque la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible et est régulée par un système à deux composants (Wholey et al., 2019, Vogel & Spellerberg, 2021). L'analyse de la séquence génomique de la souche 430 n'indique pas de localisation des gènes de production de cette bactériocine sur un EGM. Néanmoins, de part son activité antibactérienne cette souche a été exclue des souches candidates à des expériences de conjugaison.

La souche 1527 ne semble pas coder une voie de biosynthèse d'une bactériocine présente dans les bases de données de BAGEL4. BAGEL4 est un serveur qui permet d'interroger une base de données de plus de 700 peptides (Van Heel et al., 2018). La molécule(s) ayant un effet inhibiteur sur la croissance de la souche LMG18311 mise en évidence dans les tests de production est, soit un peptide non renseigné dans la base de données BAGEL4, soit cette molécule n'est pas un peptide. Quoi qu'il en soit, cette souche a été exclue des souches candidates à des expériences de conjugaison.

Enfin, la souche 1597 a été identifiée par BAGEL comme codant pour la lactococcine_972_(Lcn972). Cette bactériocine a été décrite comme ne pouvant pas être incluse dans aucune des classes décrites car sa cible principale n'est pas la membrane cytoplasmique (Martinez et al., 1996). Les deux gènes impliqués dans la production de cette bactériocine ont été décrits comme regroupés dans un même opéron et présents sur un plasmide (Martinez et al., 1999). Après analyse de la séquence du génome de la souche 1597 avec plasmideFinder-2.0 aucun plasmide n'a été identifié dans la souche (analyses réalisées le 23.09.23). Cette bactériocine semble être active seulement contre des souches lactococciques et inhibe la biosynthèse de septum chez *Lactococcus lactis* (Martinez et al., 1996, Martínez et al., 2008). Son activité antibactérienne l'a exclue des souches candidates à des expériences de conjugaison.

L'analyse *in silico* a montré que les souches de *S. suis* analysées codaient pour une grande diversité de peptides pouvant être considérés comme des bactériocines. Les expériences

de production sur milieu gélosé ont permis d'indiquer que seules quatre souches produisent des bactériocines et donc de conserver un grand nombre de nos souches d'intérêt pour des expériences de conjugaison.

c. Tests de conjugaison des éléments conjugatifs/mobilisables

Des expériences de conjugaison ont été réalisées afin de tester la capacité de transfert d'éléments qui peuvent s'exciser : transfert autonome d'ICE_ *Ssu1552_lysS*.

Un IME_ *PPI* déjà caractérisé dans l'unité DynAMic a été inclus dans l'analyse. Il s'agit d'IME_ *SsuNSUI088_PPI* porteur des gènes *tet(O)* et *erm(B)* mis en évidence lors de l'analyse de souches de *S. suis* isolées au Canada (Libante et al 2019). Cet IME est intégré dans un ICE de la famille *Tn5252*, lui-même intégré à l'extrémité 3' du gène *rplL* et porteur d'une voie de biosynthèse de la suïcine 65 prédite comme fonctionnelle.

Malgré la présence prédite de voies de biosynthèse de bactériocines, les tests préalables ont permis d'écarter le risque de production de bactériocine par les souches NSUI088 et 1552 (Annexe 5). Des expériences de conjugaison ont donc pu être effectuées avec ces souches.

d. Etude de la mobilisation de l'élément IME_ NSUI088_ PPI

Le premier couple qui a été étudié est la souche donneuse NSUI088 portant un ICE *Tn5252* hébergeant IME_ *NSUI088_PPI* et la souche receveuse *S. thermophilus* LMG18311. La souche LMG18311 a été choisie comme receveuse car elle n'est pas naturellement compétente (Fontaine et al, 2010). Elle possède un site d'insertion *rplL* disponible qui présente 100% d'identité avec les 15 derniers nucléotides du gène *rplL* de la souche de *S. suis* NSUI088 qui sont ciblés pour l'intégration de l'ICE *Tn5252_ NSUI088*. De plus, elle ne produit pas de bactériocines et peut être co-cultivée avec la souche de *S. suis* NSUI088. Elle a été marquée précédemment par un gène de résistance au chloramphénicol à un site chromosomique (V. Libante com. pers.). Deux protocoles de conjugaison (sur filtre et en billes d'alginate) ont été testés. Les résultats de ces expériences sont présentés en Figure 47.

Quatre clones doublement résistants à la tétracycline et au chloramphénicol (transconjugants putatifs) ont été analysés (pistes Transconjugants de la figure 47b). Ils

présentent tous un produit d'amplification pour le gène *cse* qui est spécifique de *S. thermophilus* et une taille d'amplicon ITS équivalente à celle obtenue pour *S. thermophilus* LMG18311. Il s'agit donc bien de bactéries réceptrices. On peut observer, par ailleurs, un signal d'amplification pour le site *attR* d'ICE_*NSUI088_rplL* ce qui indique la présence de cet ICE. Des produits PCR, de taille compatible avec celles prédites, ont également été obtenus lors de l'amplification des sites *attR* de l'IME_*PPI* (bien que ces signaux soient faibles pour les deux derniers transconjugants). L'élément composite ICE_*Tn5252_IME_PPI* de la souche NSUI088 est bien identifié chez LMG18311. L'IME a donc bien été transféré avec les gènes de résistance aux antibiotiques portés par mobilisation (*en cis* ou *en trans*). En effet, la souche LMG18311 ne possède pas de site dans lequel IME_*PPI* est susceptible de s'insérer, son transfert est donc dépendant du transfert concomitant d'ICE_*Tn5252*. Il n'est pas possible de savoir si l'IME s'est transféré *en trans* ou *en cis* comme partie intégrante de l'ICE_*Tn5252*. Néanmoins, le transfert *en cis* de IME_*PPI* nécessitant un seul évènement d'excision et de transfert (celui de ICE_*Tn5252* qui le porte), il semble plus probable que le transfert observé soit un transfert *en cis*. Néanmoins pour s'en assurer d'autres expériences de transfert en bloquant l'excision de ICE_*Tn5252* seront nécessaires.

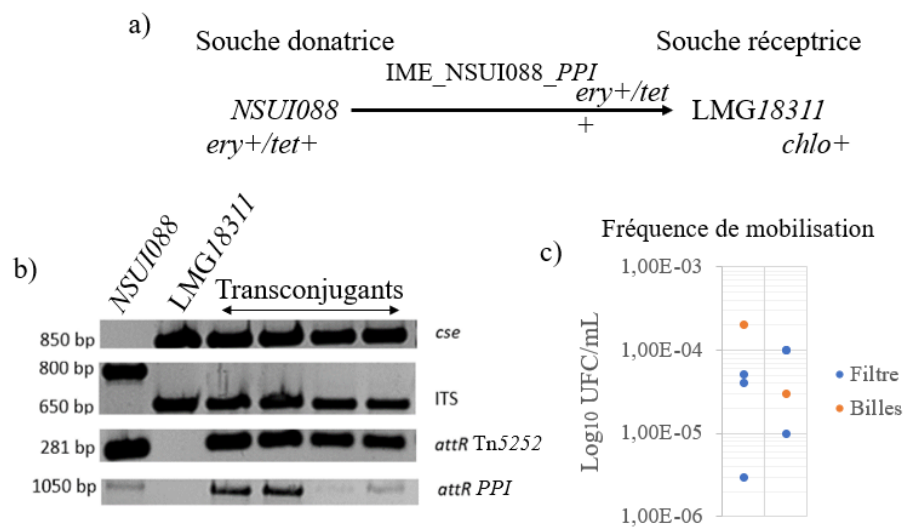
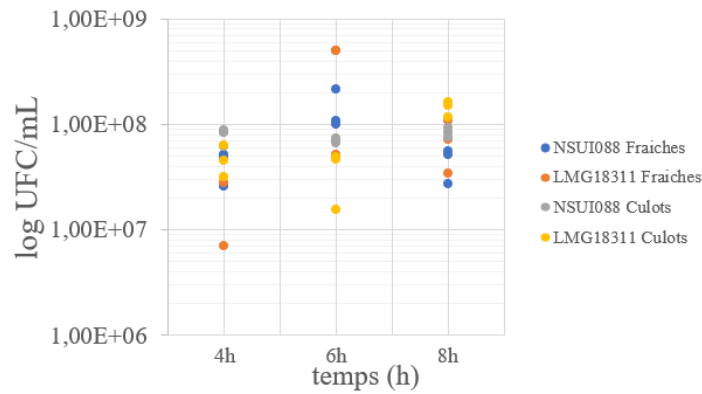


Figure 47 : Mobilisation d'IME_*NSUI088_PPI* dans une souche de *S. thermophilus* LMG18311. (a) Marqueurs de résistance des souches donatrices et réceptrices permettant de sélectionner le transfert des éléments génétiques. (b) Gel d'agarose correspondant à la migration des amplicons *cse*, *ITS*, et des régions *attR* des ICE_*NSUI088_Tn5252_rplL* et IME_*NSUI088_PPI*. (c) Fréquences de mobilisation obtenues à l'issue de deux expériences de conjugaison menées de façon indépendantes (figurées par les deux panels séparés par un trait vertical) en utilisant les deux méthodes (expériences sur filtres réalisés en tripla en bleu et billes d'alginate en orange).

Les fréquences de mobilisation obtenues, bien que disparates, étaient similaires quelle que soit la méthode utilisée (filtre ou billes d'alginate) et comprises entre $2 \cdot 10^{-4}$ et $3 \cdot 10^{-6}$ TC/ D (UFC tet^R et Cm^R /mL: transconjugants / UFC tet^R /mL de cellules donneuses). Etant donné que les conjugaisons en billes d'alginate permettent d'avoir des UFC de Tcp en 36h, cette méthode a été privilégiée pour la suite du projet.

Lors des différentes expériences réalisées au laboratoire de l'Anses et dans l'Unité DynAMic, il est apparu que le temps de génération de *S. suis* pouvait varier d'une souche à l'autre. Afin de s'affranchir le plus possible des différences de croissance des souches lors des expériences de conjugaison, des expériences de conjugaison avec des culots bactériens ont été réalisées (figure 48). Le nombre de souches donatrices et réceptrices obtenues avec les culots congelés était sensiblement le même que ceux des cultures fraîches après les différents temps d'incubation en co-cultures allant de 4 à 8 heures d'incubation (Figure 48a). Les fréquences de mobilisation obtenues avec les souches provenant de cultures fraîches ou de culots étaient comprises entre $1 \cdot 10^{-6}$ et $8,7 \cdot 10^{-7}$ TC/D quelle que ce soit la nature des cellules utilisées (fraîches ou congelées) (figure 48b). Ces résultats nous ont permis de valider l'utilisation de culots congelés pour les expériences de conjugaison.

a) Comparaison du nombre d'UFC des souches donatrices et réceptrices en fonction du temps (h) et du type de pré-cultures utilisées (n=3):



b) Fréquences de mobilisation: en fonction du temps (h) et du type de pré-cultures utilisées (n=3):

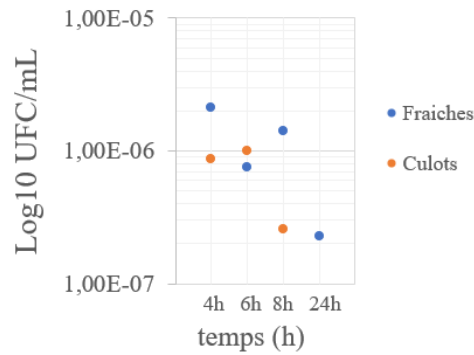


Figure 48 : Optimisation des conditions de conjugaison. (a) Comparaison du nombre d'UFC des souches donatrice (NSUI088) et réceptrice (LMG 18311) après incubation des co-cultures à différents temps. Chaque condition a été réalisée en triplica. (b) Fréquences de transfert obtenues à l'issue de la conjugaison en billes d'alginate à quatre temps différents (4, 6, 8 et 24h) à partir de cultures fraîches ou de culots congelés.

e. Etude du transfert par conjugaison d'ICE_Ssu1552_lysS (famille ICEvanG)

Afin de déterminer si l'ICE_Ssu1552_lysS était transférable par conjugaison, deux espèces bactériennes différentes ont été utilisées comme réceptrices pour ces expériences, une souche de *S. thermophilus* (LMG18311) et une souche de *S. suis* (1531, non productrice de bactériocine cf annexe 5). Ces expériences ont montré le transfert inter-espèces de l'ICEvanG_lysS de la souche 1552 vers une souche de *S. thermophilus* LMG18311 (Figure 49). A ma connaissance, le transfert d'un ICE de cette famille n'a pas encore été démontré dans la littérature chez les streptocoques. En revanche, nous n'avons pas pu montrer de transfert vers la souche de *S. suis* 1531 (*erm*(B)) testée bien que le site *attB* ciblé par cet ICE sur son génome ait été identifié comme vide. L'hypothèse que l'on peut formuler est que la souche de *S. suis* receveuse possède des systèmes de défense qui empêchent l'entrée de l'ICE dans la cellule ou son intégration dans le chromosome. Il faudrait tester d'autres souches de *S. suis* comme receveuses.

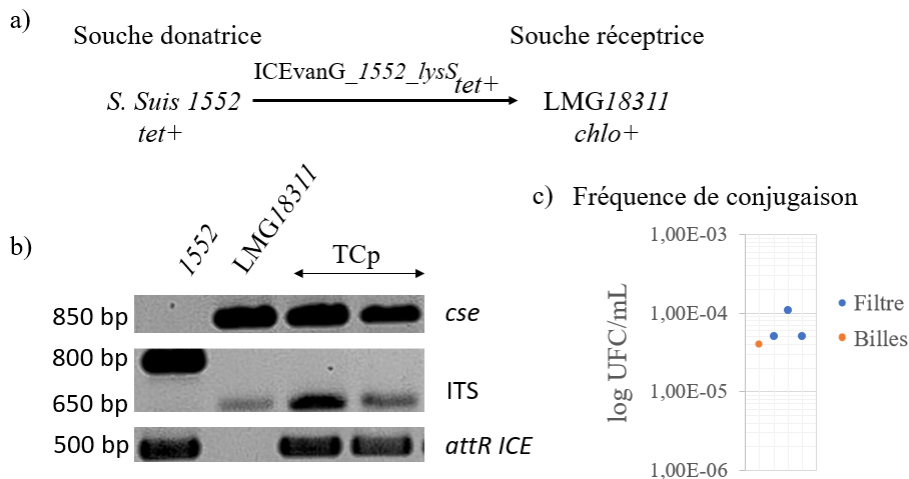


Figure 49 : Transfert d'ICE_Ssu1552_lysS de la souche 1552 vers une souche de *S. thermophilus* LMG18311. (a) Profil de résistance du couple donneuse/receveuse testé. (b) Gel d'agarose correspondant à la migration des amplicons *cse*, *ITS*, et des régions *attR* d'ICE_Ssu1552_lysS pour vérifier la souche et la présence de l'ICE dans les souches donatrice (1552), réceptrice (LMG 18311) et les transconjugants putatifs. (c) Fréquence de conjugaison obtenue en utilisant les deux méthodes (filtres, en bleu et billes d'alginate, en rouge).

iv. Conclusion

La capacité d'excision de plus de six familles d'ICE a été testée. Chez *S. suis*, la présence des ICE des familles ICES*t3*, Tn*GBS2* et ICE *vanG* avait déjà été décrite mais leur capacité d'excision n'avait pas encore été étudiée. Les expériences réalisées ont pu mettre en évidence pour la première fois chez *S. suis* le transfert interspèce d'un ICE de la famille *vanG* intégré au site *lysS*. Cet ICE porte le gène de résistance à la tétracycline *tet(W)* et peut donc contribuer à la dissémination de ce gène de résistance dans l'environnement.

L'excision et la mobilisation de l'élément IME_ *NSUI088_PPI* ont également été démontrées. L'hypothèse la plus probable est que la mobilisation a lieu en *cis* même s'il n'est pas exclu que cet IME puisse s'exciser, utiliser le pore de conjugaison de l'ICE et se réintégrer dans l'ICE une fois celui-ci transféré dans la cellule réceptrice. Cette hypothèse devra être testée expérimentalement en utilisant un ICE codant un pore de conjugaison fonctionnel mais incapable de s'exciser et une souche réceptrice possédant un ICE non-transférable (déléte de sa relaxase) pouvant servir de site d'intégration pour l'IME. La mobilisation en *cis* d'un autre IME_ *PPI* intégré dans un ICE de la famille Tn5252 (ICE*SsuYS388*) a été décrite l'année dernière (J. Wang et al., 2022). Les fréquences de transfert obtenues dans notre étude pour IME_ *NSUI088_PPI* sont 100 fois plus élevées que celles mentionnée pour ICE*SsuYS388* dans leurs travaux (7.10^{-8} TC/D) (J. Wang et al., 2022). IME_ *SSu1492_PPI* qui porte un gène *tet(O)* est également capable de s'exciser. Des expériences de conjugaison devront être réalisées afin d'étudier s'il est mobilisable en *trans* et si oui par quelle(s) famille(s) d'ICE « helper ».

Chapitre 4 : Discussion

L'augmentation de l'AbR chez les bactéries représente comme nous l'avons vu une menace sur la sécurité sanitaire à l'échelle mondiale. La coordination entre les différents acteurs de santé est nécessaire pour prévenir l'émergence et la dissémination de l'antibiorésistance et ainsi lutter efficacement contre cette menace de santé publique mondiale.

Streptococcus suis est une bactérie zoonotique pathogène du porc. Certains sérotypes sont régulièrement responsables d'épidémies mortelles pour l'Homme en Asie. En Europe, *S. suis* cause d'importantes pertes économiques dans les élevages porcins et des infections humaines sporadiques. En France, le réseau national de surveillance de l'Anses (Résapath) assure un suivi chez le porc de l'AbR des isolats cliniques. Malgré une diminution importante de l'usage des antibiotiques dans la filière porcine, en lien avec le plan EcoAntibio, le taux de résistance reste élevé chez *S. suis*. De plus, cette bactérie est un réservoir important de gènes d'AbR localisés sur des ICE ou IME comme montré lors d'analyses à grande échelle de génomes. L'analyse de génomes de *S. suis* d'origine canadienne, a révélé une très grande richesse et une très grande diversité des IME, certains d'entre eux portant des gènes d'AbR (Libante et al., 2019). L'association de gènes d'AbR avec des EGM n'avait pas été exploré en France avant le début de mon projet de recherche.

Ma thèse avait pour objectif d'évaluer la fréquence et la diversité des gènes d'AbR portés par des EGM (ICE et IME en particulier) chez des souches de *S. suis* cliniques et non cliniques isolées en France. Pour cela, la résistance aux antibiotiques de 200 souches isolées chez l'Homme, le porc et le sanglier a été testée contre 22 antibiotiques. Les génomes de 102 souches ont ensuite été séquencés afin d'identifier les gènes d'AbR notamment ceux portés par des EGM et les gènes de compétence présents dans les souches. De plus, l'analyse de la diversité génétique des souches (détermination des ST et CC) a été réalisée et combinée avec l'étude des différents facteurs de virulence présents dans les souches. La mobilité de certains ICE et IME portant des gènes de résistance a également été étudiée *in vitro* dans le but d'identifier les mécanismes potentiellement impliqués dans la dissémination des gènes de résistance.

Cette discussion est organisée en parties thématiques reprenant les différents résultats présentés dans ce manuscrit.

i. Phénotype de résistance aux antibiotiques

Parmi les 200 souches de *S. suis* testées, moins de 1% des souches étaient résistantes aux fluoroquinolones, 5%, 8% et 16% des souches étaient résistantes respectivement aux pénicillines, à la pleuromutiline (tiamuline) et au triméthoprim sulfaméthoxazole (TMPS). Enfin, 71% et 81% des souches étaient respectivement résistantes aux macrolides-lincosamides et à la tétracycline.

En Europe, en 2020, des isolats de bactéries résistantes à la pénicilline (3,8%) ont été identifiés pour la première fois en Suède par Werinder et col. Cette étude a également révélé une forte prévalence de la résistance à la tétracycline, atteignant 88,4%. En ce qui concerne les souches espagnoles, l'étude menée par Petrocchi-Rilo et col. (2021) a montré que 26,2% des souches testées étaient résistantes à la pénicilline et 2,9% à l'ampicilline. De plus, une résistance notable aux macrolides-lincosamides a été observée, avec 88,3% de résistance à la gentamicine et 87,4% à la clindamycine, ainsi qu'aux tétracyclines, avec 93,2% des souches montrant une résistance à l'oxytétracycline.

En Asie, plus précisément en Chine, les souches de *S. suis* ont également montré des taux de résistance aux pénicillines préoccupants, avec 15,6%. Les taux de résistance aux antibiotiques vis-à-vis d'autres familles sont également élevés, notamment pour les macrolides, la tétracycline et les lincosamides, comme l'ont souligné Chang-Zhen Wang et col. (2023). Aux États-Unis, les taux de résistance aux pénicillines et aux fluoroquinolones sont plus faibles, se situant à 8%. La résistance à la tétracycline est particulièrement préoccupante, avec un taux extrêmement élevé de 97%. Les macrolides-lincosamides-streptogramines (MLSb) montrent une résistance de 72%, (Nicholson et Bayles en 2022).

Il est clair que les niveaux de résistance varient en fonction des régions géographiques considérées. En France, nous avons mis en évidence que 86% des souches étaient résistantes à au moins un antibiotique. Cette situation semble un peu moins préoccupante que ce qui est observé pour les souches suédoises (98,9-100%) et espagnoles (98%). En Asie (Chine), la résistance aux macrolides et à d'autres antibiotiques est également fréquente, avec des taux de résistance allant jusqu'à 96,9% de résistance à la lincomycine (Chang-Zhen wang et al., 2023). Aux États-Unis, 50% des isolats étaient multirésistants, avec des niveaux de résistance plus élevés à la tétracycline et aux macrolides (Nicholson et Bayles 2022).

Les données de résistance aux pénicillines, notamment en Chine et en Europe, sont inquiétantes. La résistance aux macrolides est également élevée, la présence de ces forts taux de résistance chez les porcs complique l'utilisation d'antibiotiques et le traitement des infections bactériennes dans les élevages. Il est essentiel de mettre en œuvre des mesures de prévention de la résistance aux antibiotiques et de promouvoir une utilisation adaptée de ces médicaments pour préserver leur efficacité dans le traitement des infections bactériennes.

ii. Résistance aux pénicillines :

Parmi les souches identifiées comme résistantes aux β -lactamines au cours de notre étude, 10 étaient résistantes à la pénicilline G, dont trois étaient également résistantes à l'ampicilline. Ces résultats sont cohérents et plus faibles que ceux publiés précédemment dans d'autres pays d'Europe, notamment en Suède et en Espagne (Werinder et al., 2020, Petrocchi-Rilo et al 2021, Dechène-Tempier et al., 2021). Néanmoins, il est important de noter que les niveaux de résistance observés en Suède, en Espagne et en France (au cours de mon projet) ont été mesurés sur une sélection de 184, 103 et 200 souches, respectivement. Ces souches ont été sélectionnées selon des critères propres à chacune des équipes impliquées. Ainsi cela permet d'avoir des indications sur les niveaux de résistance sur ces différents territoires mais plus d'études sont nécessaires pour déterminer les niveaux de résistance vis-à-vis des pénicillines chez ce pathogène en Europe. En effet, les antibiotiques de la famille des β -lactamines sont des antibiotiques couramment utilisés pour traiter les infections à streptocoques. L'émergence d'une résistance soulève des inquiétudes quant au devenir de l'efficacité de cette famille d'antibiotiques et son utilisation dans le traitement des cas cliniques.

La résistance aux pénicillines est imputable à des altérations des protéines de liaison aux pénicillines (PBP) et n'est donc pas la conséquence de gènes de résistance pouvant être véhiculés par des EGM. Il en va de même pour le gène de résistance *mraY*, codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse de la paroi (Hadjirin et al., 2021). Si la résistance est liée principalement aux altérations des PBP, ou à la modification de la paroi, le risque d'une propagation de cette résistance semble contenu. Néanmoins, chez une souche sensible, un échange allélique avec l'allèle muté reste possible par transformation naturelle. Des études spécifiques sur la dissémination de cette résistance sont nécessaires pour évaluer les risques engendrés par une telle propagation.

iii. Les (nouveaux) gènes de résistance portés par les éléments génétiques mobiles

L'analyse des gènes de résistance portés par des EGM, tels que les ICE et les IME, révèle des aspects préoccupants de la dynamique de l'AbR chez *S. suis*. Parmi les nombreux (n=217) gènes d'AbR identifiés dans les 102 souches séquencées, 186 ont été identifiés sur des EGM. Ce sont principalement des IME (n=18) et des dIME (n= 91). Plusieurs combinaisons jusqu'alors inédites ont été identifiées : un IME_*SNF2* portant le gène de résistance *tet(O/W/32/O)*, un IME_*PPI* associé au gène de résistance *ant(6)-Ia*, un IME_*HTH-XRE* avec le gène de résistance *ant(9)-Ia*, un IME_*guaA* avec le gène de résistance *erm(B)*, ou encore un IME porteur d'une relaxase MobT associée à un gène *dfrF*. À l'exception de IME_*guaA* et IME_*HTH-XRE*, tous ces IME transportant des gènes d'AbR sont intégrés dans des EGM, dont 105 dans des ICE ou des dICE. Ces ICE appartiennent tous à la famille Tn5252. L'intégration des IME a lieu soit dans le gène *SNF2*, soit dans le gène *PPI*. La combinaison de gènes d'AbR la plus fréquemment observée est *erm(B)-tet(O)*, sur un IME/dIME inséré dans le gène *SNF2* d'un ICE Tn5252 (n=41). Cette association fréquente *erm(B)-tet(O)* a été largement documentée chez *S. suis* par de multiples équipes de recherche. Toutefois, nos travaux ont permis de montrer pour la première fois la mobilisation d'un IME_*PPI* qui porte *erm(B)-tet(O)*.

Notre étude a révélé la présence de 72 gènes de résistance supplémentaires localisés sur des ICE, dont sept appartenant à la famille *vanG*, trois à la famille Tn916 (tous intégrés dans un ICE de la famille Tn5252), et un à la famille Tn1549. Il est notable que c'est la première fois que le gène *vat(D)* est rapporté sur un ICE de la famille Tn1549.

L'ensemble de ces résultats soulignent la diversité des gènes de résistance et de leurs associations avec des ICE et IME chez *S. suis*. Cette diversité génétique rend difficile le suivi de la résistance et nécessite de développer des stratégies de surveillance et de contrôle adaptées. Cette surveillance est d'autant plus importante que nous avons montré que la présence de ces gènes d'AbR induisait systématiquement un phénotype résistant vis-à-vis des antibiotiques considérés.

Dans le contexte de notre étude, il est important de noter que des bactériophages, intégrés dans le chromosome bactérien sous forme de prophages, peuvent également porter des gènes d'AbR. En effet, nous avons observé la présence de gènes de résistance tels que *erm(B)*, *mef(A)*, *aph(3')-III*, *ant(6)-Ia*, *aac(6')-aph(2'')*, *cat*, *oprA*, *sat4*, *tet(O/W/32/O)*, *tet(W)*, *lnu(B)* et *lsa(E)* au sein de ces prophages. La transduction peut ainsi être considérée comme un des

mécanismes de dissémination des gènes d'AbR en plus de la conjugaison et la transformation naturelle. Par ailleurs, les ICE et les prophages peuvent coexister dans le génome bactérien sous forme chimérique ou en tandem, ce qui souligne leur rôle potentiel dans le transfert horizontal de gènes de résistance. Récemment, différentes structures intégrées et capables de s'exciser ont été décrites dans la littérature comme pouvant être mobilisées avec les gènes d'AbR qu'elles portent (TU et UCS). Ces études questionnent sur le nombre d'éléments génétiques encore méconnus et pouvant entraîner la dissémination de gènes d'AbR par transfert horizontal.

La description des gènes d'AbR portés par des plasmides (conjugatifs ou non) chez *S. suis* reste un domaine largement méconnu. Bien qu'il ait été suggéré que certains gènes d'AbR tels qu'*erm(B)*, *tet(O/W/32/O)*, *tet(B)*, *cfr* ou *optrA* pourraient potentiellement être transportés par des plasmides, des études complémentaires s'avèrent essentielles pour confirmer ces hypothèses. Dans le cadre de notre étude, nous n'avons pas identifié de gènes de résistance qui pourraient être portés par des plasmides.

Nous avons identifié la présence de gènes de résistance portés par des IME et des ICE particulier. Les conséquences d'une telle cooccurrence pour l'élément et les souches bactériennes qui les protent necessite plus d'étude. Les ICE peuvent s'intégrer dans des sites contenant déjà un élément intégratif, conduisant à la formation de tandems ICE-ICE, ICE-IME ou ICE-prophage, ce qui ajoute à la complexité de leur détection et l'étude de leur mobilité. De plus, les IME sont peu étudiés, bien que leur rôle dans le transfert des gènes d'AbR soit probablement majeur. L'hypothèse de transfert en *trans* soulève des questions cruciales sur la spécificité potentielle entre la relaxase des IME et la CP des ICE et/ou la CP des IME et le MPF des ICE. Pour tester la spécificité de ces différentes interactions, il est nécessaire de mener des expériences en utilisant différents ICE helper (avec de CP de différentes familles et différents MPF) afin d'identifier les combinaisons optimales pour le transfert et présentant le plus grand risque de dissémination. Une autre question importante concerne les IME situés en dehors des ICE, tels que ceux intégrés dans les gènes *guaA* et *HTH-XRE*. Leur transfert n'a pas été documenté dans la littérature pour l'instant, ce qui soulève des interrogations sur leur mobilisation mais également leur régulation.

La mobilité des gènes de résistance chez *S. suis* est donc multifactorielle et dépendante de la diversité des EGM. Cependant, les mécanismes précis de transfert et les interactions entre les différents EGM et leur hôte bactérien restent en grande partie méconnus. Cette complexité souligne l'importance de poursuivre la recherche pour mieux comprendre ces processus

permettant d'évaluer les risques liés à la propagation de la résistance aux antibiotiques depuis cette bactérie pathogène.

iv. Rôle des souches non cliniques dans la résistance aux antibiotiques

L'exploration des souches non cliniques joue un rôle essentiel dans la recherche sur la résistance aux antibiotiques. Nous avons mis en évidence des corrélations entre les profils de résistance et les pathotypes (article 1), indiquant que les résistances sont plus fréquentes dans les isolats qualifiés de "non cliniques" ou "respiratoires" que dans ceux dits "systémiques". Plus particulièrement, il ressort que les résistances à la pénicilline et au TMPS y sont plus fréquentes. Ceci suggère que le taux de résistance pourrait être influencé par la plus grande probabilité d'échanges génétiques avec la communauté bactérienne du microbiote amygdalien et des voies respiratoires hautes, qui est riche en streptocoques commensaux et présente une diversité bactérienne importante. De plus, les souches bactériennes de ces microbiotes sont plus exposées à des stress environnementaux pouvant induire des dommages sur l'ADN induisant la réponse SOS, des mutations et l'activation des EGM. L'article 2 confirme cet aspect de la problématique de dissémination des gènes d'AbR. En effet, les souches "systémiques" sélectionnées pour notre étude se sont retrouvées incluses dans le groupe ayant la plus faible teneur en gènes d'AbR - moins de deux gènes d'AbR- alors que celles "non cliniques" ont été associées au groupe ayant la plus forte teneur en gènes d'AbR - plus de 2 gènes d'AbR. Cette observation suggère que les souches "non cliniques", résidant dans le microbiote, constituent un réservoir de gènes d'AbR.

En somme, ces deux articles mettent en évidence l'importance de l'étude des souches non cliniques, souvent négligées au bénéfice des souches isolées lors d'épidémies mortelles, dans la compréhension de la résistance aux antibiotiques. Ces souches servent de réservoir de gènes d'AbR, contribuant ainsi à leur dissémination dans l'environnement.

v. La compétence chez *S. suis* et son implication dans la résistance aux antibiotiques

La compétence est un processus induit par la densité cellulaire et est associé à divers stress environnementaux, tels que des dommages à l'ADN, des limitations nutritionnelles ou la présence d'antibiotiques. Il a été observé que l'activation de la transformation chez *S. suis* se produit lors de sa croissance en présence de sérum porcin ou humain. Ce processus de transformation présente un caractère aléatoire en ce qui concerne les allèles et les gènes intégrés. Les fragments d'ADN acquis par transformation peuvent contenir divers éléments, tels

que des copies mutées de gènes chromosomiques (tels que PBP, ou *mraY* conférant une résistance aux β -lactamines), des gènes de résistance simples ou multiples, voire même des EGM complets intégratif ou non, qu'ils soient mobiles ou défectueux. Ces événements confèrent un avantage sélectif aux bactéries en générant de la diversité phénotypique dans des populations exposées à des environnements changeants (cas d'exposition aux antibiotiques).

Notre étude, telle que présentée dans l'article 2, révèle que seules 7 des 102 souches étudiées ne portent pas l'ensemble des gènes nécessaires à la compétence. Sur la base de la séquence du peptide signal inducteur de la compétence (phéromone ComS) sont définis différents phérotypes chez les souches de *S. suis* (Okura et al., 2017). La grande majorité des souches (67/102) semble présenter un phérotyp de type I, tandis que 24 souches présentent un phérotyp de type II, et seulement quatre souches un phérotyp de type III.

Il est intéressant de noter que le phérotyp de type I est associé dans notre étude aux complexes clonaux CC1 et CC16, tandis que le phérotyp de type II est observé chez les souches du CC28. Cette observation suggère la présence de cercles privilégiés d'échange selon le phérotyp. Les souches possédant les trois systèmes de détection ComR des différentes phéromones et celles produisant différentes ComS présentent peut-être un avantage sélectif de par leur capacité à échanger avec plus de partenaires. La fonctionnalité de ces différents systèmes de détection ou de production de phéromones devra être validé expérimentalement. Ces résultats nous permettront par la suite d'étudier le transfert des éléments par conjugaison chez des souches compétentes (en présence ou absence de peptides signal) et non compétentes afin de mieux comprendre le rôle de la compétence naturelle dans le transfert de gènes de résistance chez *S. suis*.

vi. Facteurs de virulence

Nos analyses ont montré un lien significatif entre les gènes de virulence et les complexes clonaux, ainsi qu'avec les pathotypes (article 2). Plus spécifiquement, les complexes clonaux CC1, CC16 et CC28 ont été associés à des clusters spécifiques de gènes de virulence. Par exemple, CC1 est associé au cluster de gène de virulence 2 comprenant une douzaine de gènes de virulence, et il est principalement associé au pathotype "systémique". Ces souches sont *epf*^f *mrp*⁺ *sly*⁺. La présence de ces trois marqueurs a déjà été publiée comme un bon indicateur d'appartenance aux ST1, nos résultats confirment cette observation (Gottschalk et al., 1998, Berthelot-Hérault et al., 2000).

Il est intéressant de noter que les souches pathogènes isolées de l'appareil respiratoire de porcs ne présentant pas de signe clinique d'infections systémiques à *S. suis*, peuvent héberger un grand nombre de facteurs associés à la virulence. Cela indique que des facteurs environnementaux, y compris les conditions d'élevage, la présence de facteurs prédisposants chez l'hôte ou des co-infections, jouent un rôle déterminant dans la virulence des souches de *S. suis* et la genèse d'une infection. Il serait intéressant de continuer avec l'étude de ces facteurs pour déterminer s'ils sont exprimés et sous quelles conditions environnementales.

Notre étude a également mis en évidence que les souches de différents sérotypes peuvent partager les mêmes CC, ce qui suggère des changements de sérotype par recombinaison (« switching »). Le sérotype de la souche et la composition de sa capsule a un impact sur la virulence des souches et donc sur leur aptitude à provoquer des infections. Le passage du sérotype 2 au sérotype 14 a été documenté en 2021 par Okura et col. et n'aurait aucun effet sur la virulence des souches testées (Okura et al., 2021). Néanmoins, l'impact d'autres changements de sérotype sur la virulence n'a pas encore été étudié.

Chapitre 5 : Conclusion et perspectives

Mon travail de recherche a permis d'évaluer le profil de résistance/sensibilité de 200 souches vis-à-vis de 22 antibiotiques appartenant à 12 familles utilisés en médecine humaine et vétérinaire. Ces souches de *S. suis* ont été isolées chez l'Homme, le porc et le sanglier en France métropolitaine. Nos résultats nous ont permis de montrer que les profils de résistance observés chez les souches d'origine animale (porc et sanglier) ou humaine n'avaient pas de lien avec la cible thérapeutique des antibiotiques utilisés (médecine vétérinaire ou humaine). Cela témoigne de l'intérêt de travailler en suivant l'approche One Health.

Suite à ces analyses, 102 souches ont été sélectionnées afin de séquencer leur génome et étudier la fréquence et la diversité des gènes responsables de la résistance aux antibiotiques observée par antibiogramme. En plus de rechercher les gènes de résistance aux antibiotiques, les gènes impliqués dans la virulence et la compétence ont également été étudiés. Les données MLST obtenues grâce au typage des souches ont permis d'identifier les différents CC présents dans notre collection. L'analyse de différents facteurs de virulence a mis en évidence des combinaisons de facteurs associés à la virulence (cluster) distinguant les souches invasives des autres souches de notre étude. Ces associations de gènes de virulence pourraient être utilisées pour la surveillance épidémiologique de ce pathogène zoonotique en France et possiblement en Europe voire dans le Monde. L'utilisation de l'outil ICEscreen développé par l'Unité DynAMic en collaboration avec l'Unité MAiAGE (INRAE) a permis d'identifier et localiser les ICE et IME présents dans les génomes. Le positionnement des gènes d'AbR identifiés dans les souches a permis de déterminer ceux portés par des ICE/IME susceptibles d'être transférés par conjugaison.

Enfin, l'étude de six familles d'ICE a permis de mettre en évidence la capacité d'excision des ICE de la famille ICESt3, TnGBS2 et *vanG* qui n'avait pas encore été démontrée chez *S. suis*. Le transfert d'un ICE de la famille *vanG* a également été démontré pour la première fois au cours de ce projet. L'excision d'un IME inséré dans le gène *PPI* d'un ICE de la famille Tn5252 a également été démontrée avec pour la première fois un transfert conjugatif conférant la résistance aux tétracyclines et macrolides-lincosamides. Des études complémentaires seront nécessaires pour tester les capacités de transfert, identifier les éléments « helper » et leur spécificité et étudier les régulations mises en jeu.

L'analyse *in silico* approfondie des IME_*SNF2* et IME_*PPI* portant des gènes de résistance aux antibiotiques dans les souches étudiées indique la présence d'un système complexe d'activation/répression de la machinerie de transcription de l'excision (recombinases) de ces IME. Une approche de RT-qPCR avec différents stress environnementaux permettra de déterminer si la recombinaise à sérine sensée permettre l'excision des IME est bien exprimée en réponse à des stress (antibiotiques, pH, stress oxydant, dommages sur l'ADN...) dans les souches précédemment testées lors des tests d'excision. Pour cela une quantification de l'expression de la recombinaise à sérine à partir de son ARNm grâce à une reverse transcription suivie d'une PCR quantitative sera réalisée. Les résultats seront ensuite normalisés par rapport à trois gènes de références (*mutS*, *gyrA* et *ldh*, Arenas et al., 2019 et Carraro et al., 2011).

Se pose également la question du coût biologique induit par la présence de ces IME porteurs d'AbR. Des souches porteuses naturellement d'ICE_*Tn5252* actifs dépourvus d'IME seront utilisées. Ainsi, l'effet de l'insertion d'un IME dans le gène *SNF2* ou *PPI* des ICE *Tn5252* sera étudié. Pour ce faire, différents IME_*SNF2* portant le gène *tet(O)* et IME_*PPI* ont été sélectionnés. Des promoteurs inductibles vont être insérés en amont du gène du module de recombinaison de ces IME afin de déterminer s'il est possible d'induire l'excision de ces éléments et donc leur mobilisation. Un gène rapporteur fluorescent sera intégré en aval du gène codant la recombinaise afin de déterminer à quel moment de la croissance et dans quelles conditions environnementales le module de recombinaison est activé dans les cellules. La compréhension du mécanisme de transfert de ces gènes permettra de prévenir le transfert afin, *in fine*, de développer de nouvelles approches de traitement en couplant la prise d'antibiotique à des inhibiteurs de transfert des ICE et IME.

Comme évoqué dans l'introduction, l'augmentation de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes constitue une menace pour la sécurité sanitaire mondiale. Les pathogènes zoonotiques émergents comme *S. suis* ont déjà été documentés comme responsables d'épidémies mortelles pour l'Homme sur le continent asiatique. Lors de ces épisodes épidémiques, la présence de différents gènes de résistance aux antibiotiques portés par des EGM a été démontrée chez les souches de *S. suis*. Ces gènes de résistance représentent une menace directe puisque le panel d'antibiotiques utilisables contre ces infections en est donc réduit. La présence de ces gènes représente aussi une menace indirecte puisque la majorité des gènes AbR chez *S. suis* sont présents sur des EGM qui sont capables de se transférer à d'autres

streptocoques voire à d'autres Firmicutes présents dans les écosystèmes (microbiote du porc ou autres animaux). De plus, *S. suis*, de par la quantité et la diversité des EGM présents dans son pangéome est un modèle d'étude remarquable pour comprendre et analyser au niveau moléculaire les interactions entre différents mécanismes de transfert horizontaux, entre hôte et EGM et entre différents EGM.

Bibliographie

- Abraham, N. G., & Kappas, A. (2008). Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacological Reviews*, *60*(1), 79–127. <https://doi.org/10.1124/pr.107.07104>
- Abril, C., Brodard, I., & Perreten, V. (2010). Two novel antibiotic resistance genes, tet(44) and ant(6)-Ib, are located within a transferable pathogenicity island in *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(7), 3052–3055. <https://doi.org/10.1128/AAC.00304-10>
- Ambroset, C., Coluzzi, C., Guédon, G., Devignes, M. D., Loux, V., Lacroix, T., Payot, S., & Leblond-Bourget, N. (2016). New insights into the classification and integration specificity of streptococcus integrative conjugative elements through extensive genome exploration. *Frontiers in Microbiology*, *6*(JAN), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01483>
- Anses. (2019). *RESAPATH - French surveillance network for antimicrobial resistance in bacteria from diseased animals - 2017 Annual report. March.* <https://www.anses.fr/en/system/files/LABO-Ra-Resapath2017EN.pdf>
- Anses. (2021). Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2020. *Rapport Annuel.* www.anses.fr
- Anses. (2022). *Antibiorésistance en santé animale Bilan 2022.*
- Anses-anmv, & Chauvin, C. (2020). *Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2009 Résumé.*
- Arenas, J., Bossers-de Vries, R., Harders-Westerveen, J., Buys, H., Ruuls-van Stalle, L. M. F., Stockhofe-Zurwieden, N., Zaccaria, E., Tommassen, J., Wells, J. M., Smith, H. E., & de Greeff, A. (2019). *In vivo* transcriptomes of *Streptococcus suis* reveal genes required for niche-specific adaptation and pathogenesis. *Virulence*, *10*(1), 334–351. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1599669>
- Arends, J. P., & Zanen, H. G. (1988). Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Reviews of Infectious Diseases*, *10*(1), 131–137. <https://doi.org/10.1093/CLINIDS/10.1.131>
- Arnold, B. J., Huang, I. T., & Hanage, W. P. (2022). Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 20, Issue 4, pp. 206–218). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00650-4>

- Athey Taryn B T, Vaillancourt Katy, Frenette Michel, Fittipaldi Nahuel, Gottschalk Marcelo, Grenier Daniel, & Kumar Basu Malay. (2016). *Distribution of Suicin Gene Clusters in Streptococcus suis Serotype 2 Belonging to Sequence Types 25 and 28*. <https://doi.org/10.1155/2016/6815894>
- Athey, T. B. T., Teatero, S., Lacouture, S., Takamatsu, D., Gottschalk, M., & Fittipaldi, N. (2016). Determining *Streptococcus suis* serotype from short-read whole-genome sequencing data. *BMC Microbiology*, *16*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12866-016-0782-8/FIGURES/2>
- Avery, O. T., Macleod, C. M., & McCarty, M. (1944). 16 Microbiology: A Centenary Perspective. *The Journal of Experimental Medicine*, *79*, 137–156.
- Baig, A., Weinert, L. A., Peters, S. E., Howell, K. J., Chaudhuri, R. R., Wang, J., Holden, M. T. G., Parkhill, J., Langford, P. R., Rycroft, A. N., Wren, B. W., Tucker, A. W., Maskell, D. J., Maglennon, G. A., Bossé, J. T., Li, Y., Cuccui, J., & Terra, V. (2015). Whole genome investigation of a divergent clade of the pathogen *Streptococcus suis*. *Frontiers in Microbiology*, *6*(NOV). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01191/ABSTRACT>
- Bañuelos-Vazquez, L. A., Torres Tejerizo, G., & Brom, S. (2017). Regulation of conjugative transfer of plasmids and integrative conjugative elements. In *Plasmid* (Vol. 91, pp. 82–89). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.04.002>
- Baums, C. G., Verkühlen, G. J., Rehm, T., Silva, L. M. G., Beyerbach, M., Pohlmeier, K., & Valentin-Weigand, P. (2007). Prevalence of *Streptococcus suis* Genotypes in Wild Boars of Northwestern Germany. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, *73*(3), 711–717. <https://doi.org/10.1128/AEM.01800-06>
- Bellanger, X., Morel, C., Decaris, B., & Guédon, G. (2007). Derepression of excision of integrative and potentially conjugative elements from *Streptococcus thermophilus* by DNA damage response: Implication of a *ci*-related repressor. *Journal of Bacteriology*, *189*(4), 1478–1481. <https://doi.org/10.1128/JB.01125-06>
- Bellanger, X., Payot, S., Leblond-Bourget, N., & Guédon, G. (2014a). Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: Evolution and diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, *38*(4), 720–760. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12058>

- Bellanger, X., Payot, S., Leblond-Bourget, N., & Guédon, G. (2014b). Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(4), 720–760. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12058>
- Bensaid, T., Bonnefoi-Kyriacou, B., Dupel-Pottier, C., Bellon, O., Lagier, E., & Chardon, H. (2003). [*Streptococcus suis* meningitis following wild boar hunting]. *Presse Medicale (Paris, France : 1983)*, 32(23), 1077–1078. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12910163/>
- Berthelot-Hérault, F., Marois, C., Gottschalk, M., & Kobisch, M. (2002). Genetic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and humans as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 615–619. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.615-619.2002>
- Berthelot-hérault, F., Morvan, H., Kéribin, A.-M., Gottschalk, M., Kobisch, M., & Berthelot-Hérault, F. (2000). Production of Muraminidase-Released Protein (MRP), Extracellular Factor (EF) and Suilysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. *Vet. Res*, 31, 473.
- Bi, D., Xu, Z., Harrison, E. M., Tai, C., Wei, Y., He, X., Jia, S., Deng, Z., Rajakumar, K., & Ou, H.-Y. (2012). ICEberg: a web-based resource for integrative and conjugative elements found in Bacteria. *Nucleic Acids Research*, 40, D621–D626. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr846>
- Billroth Theodor. (1874). *Untersuchungen über die Vegetationsformen von Coccobacteria septica und den Antheil, welchen sie an der Entstehung und Verbreitung der accidentellen Wundkrankheiten haben: Versuch einer wissenschaftlichen Kritik der verschiedenen Methoden antiseptischer Wundbehandlung* (Reimer. G., Ed.). https://books.google.be/books?id=fTxiAAAACAAJ&hl=fr&source=gbs_navlinks_s
- Bleuzé, M., Gottschalk, M., & Segura, M. (2021). Neutrophils in *Streptococcus suis* Infection: From Host Defense to Pathology. *Microorganisms*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9112392>
- Bojarska, A., Janas, K., Pejsak, Z., Otulak-Kozieł, K., Garbaczewska, G., Hryniewicz, W., & Sadowy, E. (2019). Diversity of serotypes and new cps loci variants among *Streptococcus suis* isolates from pigs in Poland and Belarus. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108534>
- Bonifait, L., Charette, S. J., Filion, G., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2011). Amoeba host model for evaluation of *Streptococcus suis* virulence. *Applied and Environmental Microbiology*,

77(17), 6271–6273. <https://doi.org/10.1128/AEM.00659-11/ASSET/49E9EE90-68D5-4ABC-A87F-8392965B9C50/ASSETS/GRAPHIC/ZAM9991024400002.JPEG>

Bonifait, L., Veillette, M., Létourneau, V., Grenier, D., & Duchaine, C. (2014). *Detection of Streptococcus suis in Bioaerosols of Swine Confinement Buildings*. <https://doi.org/10.1128/AEM.04167-13>

Botelho, J., & Schulenburg, H. (2021). The Role of Integrative and Conjugative Elements in Antibiotic Resistance Evolution. *Trends in Microbiology*, 29(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2020.05.011>

Bouwman, B. A. M., Crosetto, N., & Bienko, M. (2022). The era of 3D and spatial genomics. In *Trends in Genetics* (Vol. 38, Issue 10, pp. 1062–1075). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2022.05.010>

Brassard, J., Gottschalk, M., & Quessy, S. (2004). Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin. *Veterinary Microbiology*, 102(1–2), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.05.008>

Brizuela, J., Kajeekul, R., Roodsant, T. J., Riwoad, A., Boueroy, P., Pattanapongpaibool, A., Thaipadungpanit, J., Jenjaroenpun, P., Wongsurawat, T., Batty, E. M., L van der Putten, B. C., Schultz, C., & Kerdsin, A. (2023). *Streptococcus suis outbreak caused by an emerging zoonotic strain with acquired multi-drug resistance in Thailand OUTBREAK REPORT*. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000952>

Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., & Guédon, G. (2002). Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Molecular Microbiology*, 46(3), 601–610. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2002.03191.X>

Callejo, R., Prieto, M., Salamone, F., Auger, J. P., Goyette-Desjardins, G., & Gottschalk, M. (2014). Atypical *Streptococcus suis* in man, Argentina, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(3), 500–502. <https://doi.org/10.3201/EID2003.131148>

Carraro, N., & Burrus, V. (2014). *Biology of Three ICE Families: SXT/R391, ICEBs1, and ICES1/ICES3*. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3>

Carvalho, G., Fouchet, D., Danesh, G., Godeux, A. S., Laaberki, M. H., Pontier, D., Charpentier, X., & Venner, S. (2020). Bacterial transformation buffers environmental fluctuations through the reversible integration of mobile genetic elements. *MBio*, 11(2).

<https://doi.org/10.1128/MBIO.02443-19/ASSET/FBD3BD6D-BB41-494D-B01A-761798EECF8E/ASSETS/GRAPHIC/MBIO.02443-19-F0004.JPEG>

- Cavaillon, J. M., & Legout, S. (2022). Louis Pasteur: Between Myth and Reality. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom12040596>
- Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S, & Gottschalk M. (1998). *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology*, *144*, 325–332.
- Chen, C., Zhang, W., Zheng, H., Lan, R., Wang, H., Du, P., Bai, X., Ji, S., Meng, Q., Jin, D., Liu, K., Jing, H., Ye, C., Gao, G. F., Wang, L., Gottschalk, M., & Xu, J. (2013). Minimum core genome sequence typing of bacterial pathogens: A unified approach for clinical and public health microbiology. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(8), 2582–2591. <https://doi.org/10.1128/JCM.00535-13>
- Chen, W., Mandali, S., Hancock, S. P., Kumar, P., Collazo, M., Cascio, D., & Johnson, R. C. (2018). Multiple serine transposase dimers assemble the transposon-end synaptic complex during IS 607-family transposition. *ELife*, *7*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.39611>
- Clifton-Hadley, F. A., Alexander, T. J., Upton, I., & Duffus, W. P. (1984). Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs. *The Veterinary Record*, *114*(21), 513–518. <https://doi.org/10.1136/VR.114.21.513>
- Cloutier, G., D’Allaire, S., Martinez, G., Surprenant, C., Lacouture, S., & Gottschalk, M. (2003). Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. *Veterinary Microbiology*, *97*(1–2), 135–151. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2003.09.018>
- Collineau, L., Backhans, A., Dewulf, J., Emanuelson, U., Grosse Beilage, E., Lehébel, A., Loesken, S., Okholm Nielsen, E., Postma, M., Sjölund, M., Stärk, K. D. C., & Belloc, C. (2017). Profile of pig farms combining high performance and low antimicrobial usage within four European countries. *The Veterinary Record*, *181*(24). <https://doi.org/10.1136/VR.103988>
- Comité des référentiels de la SPILF. (2022). *Actualisation de la liste des antibiotiques critiques disponibles en France pour l’exercice libéral ET en établissements de santé*.
- Costa, T. R. D., Harb, L., Khara, P., Zeng, L., Hu, B., & Christie, P. J. (2021). Type IV secretion systems: Advances in structure, function, and activation. In *Molecular Microbiology* (Vol. 115, Issue 3, pp. 436–452). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/mmi.14670>

- Croucher, N. J., Mostowy, R., Wymant, C., Turner, P., Bentley, S. D., & Fraser, C. (2016). Horizontal DNA Transfer Mechanisms of Bacteria as Weapons of Intragenomic Conflict. *PLOS Biology*, 14(3), e1002394. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1002394>
- Cummins, E. A., Hall, R. J., McInerney, J. O., & McNally, A. (2022). Prokaryote pangenomes are dynamic entities. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 66, pp. 73–78). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.01.005>
- Dechêne-Tempier, M., Marois-Créhan, C., Libante, V., Jouy, E., Leblond-Bourget, N., & Payot, S. (2021). Update on the mechanisms of antibiotic resistance and the mobile resistome in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. In *Microorganisms* (Vol. 9, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081765>
- Dee SA, Carlson AR, Winkelman NL, & Corey MM. (1993). Effect of management practices on the *Streptococcus suis* carrier rate in nursery swine - PubMed. *J Am Vet Med Assoc*, 203(2), 295–299. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8407494/>
- de Greeff, A., Buys, H., Verhaar, R., Dijkstra, J., van Alphen, L., & Smith, H. E. (2002). Contribution of Fibronectin-Binding Protein to Pathogenesis of *Streptococcus suis* Serotype 2. *Infection and Immunity*, 70(3), 1319–1325. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1319-1325.2002>
- Dekker, N., Bouma, A., Daemen, I., Klinkenberg, D., & Van Leengoed, L. (2013). Effect of Spatial Separation of Pigs on Spread of *Streptococcus suis* Serotype 9. *PLoS ONE*, 8(4), 61339. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061339>
- Delphine Urban, Anne Chevance, & Gérard Moulin. (2020). *Rapport de l'Anses : Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2019 | Enhanced Reader*. Anses.
- de Moor, C. E. (1963). Septicaemic infections in pigs, caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designated R, S and T. *Antonie van Leeuwenhoek*, 29(1), 272–280. <https://doi.org/10.1007/BF02046069/METRICS>
- Dessen, A., Di Guilmi, A. M., Vernet, T., & Dideberg, O. (2001). Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in Gram-Positive Pathogens. In *Current Drug Targets-Infectious Disorders* (Vol. 1).
- Ding, W. Y., Li, Y. H., Lian, H., Ai, X. Y., Zhao, Y. L., Yang, Y. B., Han, Q., Liu, X., Chen, X. Y., & He, Z. (2017). Sub-minimum inhibitory concentrations of rhubarb water extracts inhibit

Streptococcus suis biofilm formation. *Frontiers in Pharmacology*, 8(JUL).
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2017.00425/FULL>

- Dong, C. L., Che, R. X., Wu, T., Qu, Q. W., Chen, M., Zheng, S. Di, Cai, X. H., Wang, G., & Li, Y. H. (2023). New Characterization of Multi-Drug Resistance of *Streptococcus suis* and Biofilm Formation from Swine in Heilongjiang Province of China. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12010132>
- Ducrot, C., Guénin, M.-J., Hemonic, A., Rousset, N., Carre, Y., Facon, C., Le Coz, P., Marguerie, J., Petiot, J.-M., Jarnoux, M., Leblanc-Maridor, M., Paul, M., Molia, S., & Belloc, C. (2022). *Towards a Better Use of Antimicrobials on Farms: Insights from a Participatory Approach in the Towards a Better Use of Antimicrobials on Farms: Insights from a Participatory Approach in the French Pig and Poultry Sectors*. 11, 1370. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101370>
- Du, H., Huang, W., Xie, H., Ye, C., Jing, H., Ren, Z., & Xu, J. (2013). The genetically modified suilysin, rSLY(P353L), provides a candidate vaccine that suppresses proinflammatory response and reduces fatality following infection with *Streptococcus suis*. *Vaccine*, 31(38), 4209–4215. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2013.07.004>
- Elliott, S. D. (1966). Streptococcal infection in young pigs. I. An immunochemical study of the causative agent (PM streptococcus). *The Journal of Hygiene*, 64(2), 205–212. <https://doi.org/10.1017/S0022172400040468>
- Elliott, S. D., McCarty, M., & Lancefield, R. C. (1977). Teichoic acids of group D streptococci with special reference to strains from pig meningitis (*Streptococcus suis*). *Journal of Experimental Medicine*, 145(3), 490–499. <https://doi.org/10.1084/JEM.145.3.490>
- Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F., & Magarvey, N. A. (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(5), 980–987. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2015.10.018>
- Esgleas, M., Li, Y., Hancock, M. A., Harel, J., Dubreuil, J. D., & Gottschalk, M. (2008). Isolation and characterization of alpha-enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. *Microbiology (Reading, England)*, 154(Pt 9), 2668–2679. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.2008/017145-0>
- Estrada, A. A., Gottschalk, M., Rossow, S., Rendahl, A., Gebhart, C., & Marthaler, D. G. (2019). Serotype and genotype (multilocus sequence type) of *Streptococcus suis* isolates from the

- United States serve as predictors of pathotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(9).
<https://doi.org/10.1128/JCM.00377-19/FORMAT/EPUB>
- Evans, A. C. (1936). STUDIES ON HEMOLYTIC STREPTOCOCCI II. STREPTOCOCCUS PYOGENES. *Senior Bacteriologist, National Institute of Health, Washington, D.C.*, 611–624.
- Feng, L., Zhu, J., Chang, H., Gao, X., Gao, C., Wei, X., Yuan, F., & Bei, W. (2016). The CodY regulator is essential for virulence in *Streptococcus suis* serotype 2. *Scientific Reports*, 6.
<https://doi.org/10.1038/srep21241>
- Ferrando, M. L., Fuentes, S., De Greeff, A., Smith, H., & Wells, J. M. (2010). ApuA, a multifunctional alpha-glucan-degrading enzyme of *Streptococcus suis*, mediates adhesion to porcine epithelium and mucus. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 9), 2818–2828.
<https://doi.org/10.1099/MIC.0.037960-0>
- Ferrando, M. L., Gussak, A., Mentink, S., Gutierrez, M. F., van Baarlen, P., & Wells, J. M. (2021). Active Human and Porcine Serum Induce Competence for Genetic Transformation in the Emerging Zoonotic Pathogen *Streptococcus suis*. *Pathogens 2021, Vol. 10, Page 156, 10(2)*, 156. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10020156>
- Ferretti, J., & Köhler, W. (2016). History of Streptococcal Research. *Streptococcus Pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*, 1–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26866232>
- Fittipaldi, N., Segura, M., Grenier, D., & Gottschalk, M. (2012). Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiology*, 7(2), 259–279. <https://doi.org/10.2217/FMB.11.149>
- Fontaine, L., Wahl, A., Fléchar, M., Mignolet, J., & Hols, P. (2015). Regulation of competence for natural transformation in streptococci. *Infection, Genetics and Evolution*, 33, 343–360.
<https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2014.09.010>
- Fred Griffith, B. (1928). *THE SIGNIFICANCE OF PNEUMOCOCCAL TYPES*. 2.
<https://doi.org/10.1017/S0022172400031879>
- Gao, M., Zuo, J., Shen, Y., Yuan, S., Gao, S., Wang, Y., Wang, Y., & Yi, L. (2023). Modeling Co-Infection by *Streptococcus suis* and *Haemophilus parasuis* Reveals Influences on Biofilm Formation and Host Response. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 13(9).
<https://doi.org/10.3390/ANI13091511>

- Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., & De La Cruz, F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(3), 657–687. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2009.00168.X>
- Ge, J. G., Feng, Y., Hongfeng, A. E., Ae, J., Zhang, H., Feng, A. E., Ae, Z., Wang, C., Zhimin, A. E., Ae, Y., Pan, X., & Tang, A. J. (2009). Inactivation of Dipeptidyl Peptidase IV Attenuates the Virulence of *Streptococcus suis* Serotype 2 that Causes Streptococcal Toxic Shock Syndrome. *Current Microbiology*, 59(3), 248–255. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9425-8>
- Gentry A., Clutton-Brock J., & Groves C. (2004). The naming of wild animal species and their domestic derivatives. *Journal of Archaeological SCIENCE*, 31, 645–651. <https://doi.org/10.1016/J.JAS.2003.10.006>
- Giang, E., Hetman, B. M., Sargeant, J. M., Poljak, Z., & Greer, A. L. (2020). Examining the Effect of Host Recruitment Rates on the Transmission of *Streptococcus suis* in Nursery Swine Populations. *Pathogens*, 9(174). <https://doi.org/10.3390/pathogens9030174>
- Gilmer, D. B., Schmitz, J. E., Thandar, M., Euler, C. W., & Fischetti, V. A. (2017). The Phage Lysin PlySs2 Decolonizes *Streptococcus suis* from Murine Intranasal Mucosa. *PLoS ONE*, 12(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0169180>
- Glazunova, O. O., & Ronique Roux, V. (2009). Partial sequence comparison of the rpoB, sodA, groEL and gyrB genes within the genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2317–2322. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.005488-0>
- Global action plan on antimicrobial resistance*. (2015).
- Gottschalk, M., Lebrun, A., Wisselink, H., Dubreuil, J. D., Smith, H., & Vecht, U. (1998). Production of Virulence-Related Proteins by Canadian Strains of *Streptococcus suis* Capsular Type 2. *Can J Vet Res*, 62, 75–79.
- Gottschalk, M., & Segura, M. (2019). Streptococcosis. *Diseases of Swine*, 934–950. <https://doi.org/10.1002/9781119350927.CH61>
- Gottschalk, M., Segura, M., & Xu, J. (2007). *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Animal Health Research Reviews*, 8(1), 29–45. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001247>

- Goyette-Desjardins, G., Auger, J. P., Xu, J., Segura, M., & Gottschalk, M. (2014). *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerging Microbes and Infections*, 3(March). <https://doi.org/10.1038/emi.2014.45>
- Goyette-Desjardins Guillaume, Auger Jean-Philippe, Xu Jianguo, Segura Mariela, & Gottschalk Marcelo. (2014). *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent— an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerging Microbes and Infections*. <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1038/emi.2014.45?needAccess=true&role=button>
- Goyette-Desjardins, G., Vinogradov, E., Okura, M., Takamatsu, D., Gottschalk, M., & Segura, M. (2018). *Streptococcus suis* serotype 3 and serotype 18 capsular polysaccharides contain di-N-acetyl-bacillosamine. *Carbohydrate Research*, 466, 18–29. <https://doi.org/10.1016/J.CARRES.2018.07.003>
- Grohmann, E., Christie, P. J., Waksman, G., & Backert, S. (2018). Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. In *Molecular Microbiology* (Vol. 107, Issue 4, pp. 455–471). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/mmi.13896>
- Groves, M. D., Jordan, D., Chapman, T. A., & Jassim, R. Al. (2015). Multilocus sequence typing of Australian *Streptococcus suis* type 2 by MALDI-TOF mass spectrometry analysis of PCR amplicons. *Veterinary Microbiology*, 177(3–4), 394–397. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2015.03.006>
- Guédon, G., Libante, V., Coluzzi, C., Payot, S., & Leblond-Bourget, N. (2017). The obscure world of integrative and mobilizable elements, highly widespread elements that pirate bacterial conjugative systems. *Genes*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/genes8110337>
- Guglielmini, J., De La Cruz, F., & Rocha, E. P. C. (2013). Evolution of Conjugation and Type IV Secretion Systems. *Molecular Biology and Evolution*, 30(2), 315–331. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSS221>
- Gu, H., Zhu, H., & Lu, C. (2009). Use of in vivo-induced antigen technology (IVIAT) for the identification of *Streptococcus suis* serotype 2 in vivo-induced bacterial protein antigens. *BMC Microbiology*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-201/TABLES/4>

- Guo, D., Wang, L., & Lu, C. (2012). In vitro biofilm forming potential of *Streptococcus suis* isolated from human and swine in China. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 43(3), 993–1004. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120003000021>
- Gustavsson, C., & Ramussen, M. (2014). Septic arthritis caused by *Streptococcus suis* serotype 5 in pig farmer. *Emerging Infectious Diseases*, 20(3), 489–490. <https://doi.org/10.3201/EID2003.130535>
- Haas, B., & Grenier, D. (2016). Impact of Sub-Inhibitory Concentrations of Amoxicillin on *Streptococcus suis* Capsule Gene Expression and Inflammatory Potential. *Pathogens 2016, Vol. 5, Page 37*, 5(2), 37. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS5020037>
- Haas, B., & Grenier, D. (2018). Understanding the virulence of *Streptococcus suis*: A veterinary, medical, and economic challenge. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 48(3), 159–166. <https://doi.org/10.1016/J.MEDMAL.2017.10.001>
- Hadjirin, N. F., Miller, E. L., Murray, G. G. R., Yen, P. L. K., Phuc, H. D., Wileman, T. M., Hernandez-Garcia, J., Williamson, S. M., Parkhill, J., Maskell, D. J., Zhou, R., Fittipaldi, N., Gottschalk, M., Tucker, A. W. (Dan), Hoa, N. T., Welch, J. J., & Weinert, L. A. (2021). Large-scale genomic analysis of antimicrobial resistance in the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *BMC Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01094-1>
- Hampton, H. G., Watson, B. N. J., & Fineran, P. C. (2020). The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature 2020 577:7790*, 577(7790), 327–336. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1894-8>
- Harel, J., Martinez, G., Nassar, A., Dezfulian, H., Labrie, S. J., Brousseau, R., Moineau, S., & Gottschalk, M. (2003). Identification of an inducible bacteriophage in a virulent strain of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infection and Immunity*, 71(10), 6104–6108. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.6104-6108.2003/ASSET/68188024-ECA9-44E0-A729-6E9CFCB0E11A/ASSETS/GRAPHIC/II1030106003.JPEG>
- Hatrongjit, R., Fittipaldi, N., Gottschalk, M., & Kerdsin, A. (2020). Tools for molecular epidemiology of *Streptococcus suis*. *Pathogens*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9020081>

- Herviou, P., Balvay, A., Bellet, D., Bobet, S., Maudet, C., Staub, J., Alric, M., Leblond-Bourget, N., Delorme, C., Rabot, S., Denis, S., & Payot, S. (2023). Transfer of the Integrative and Conjugative Element ICE St3 of *Streptococcus thermophilus* in Physiological Conditions Mimicking the Human Digestive Ecosystem . *Microbiology Spectrum*, 11(3). <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.04667-22>
- Higgins R, & Gottschalk M. (2006). *Streptococcal diseases. Disease of Swine.: Vol. 9th ed.* (Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, & Taylor DJ, Eds.; Blackwell Publishing).
- Hill, J. E., Gottschalk, M., Brousseau, R., Harel, J., Hemmingsen, S. M., & Goh, S. H. (2005). Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Veterinary Microbiology*, 107(1–2), 63–69. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2005.01.003>
- Ho, D. T. N., Le, T. P. T., Wolbers, M., Cao, Q. T., Nguyen, V. M. H., Tran, V. T. N., Le, T. P. T., Nguyen, H. P., Tran, T. H. C., Dinh, X. S., To, S. D., Hoang, T. T. H., Hoang, T., Campbell, J., Nguyen, V. V. C., Nguyen, T. C., Nguyen, V. D., Ngo, T. H., Spratt, B. G., ... Schultsz, C. (2011). Risk factors of *Streptococcus suis* infection in Vietnam. A case-control study. *PLoS ONE*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0017604>
- Horne, T., Orr, V. T., & Hall, J. P. (2023). How do interactions between mobile genetic elements affect horizontal gene transfer? In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 73). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102282>
- Hsueh, K. J., Cheng, L. T., Lee, J. W., Chung, Y. C., Chung, W. Bin, & Chu, C. Y. (2017). Immunization with *Streptococcus suis* bacterin plus recombinant Sao protein in sows conveys passive immunity to their piglets. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12917-016-0937-8/FIGURES/4>
- Huang, J., Liu, X., Chen, H., Chen, L., Gao, X., Pan, Z., Wang, J., Lu, C., Yao, H., Wang, L., & Wu, Z. (2019). Identification of six novel capsular polysaccharide loci (<scp>NCL</scp>) from *Streptococcus suis* multidrug resistant non-typeable strains and the pathogenic characteristic of strains carrying new <scp>NCL</scp> s. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(2), 995–1003. <https://doi.org/10.1111/tbed.13123>
- Huang, J., Ma, J., Shang, K., Hu, X., Liang, Y., Li, D., Wu, Z., Dai, L., Chen, L., & Wang, L. (2016). Evolution and diversity of the antimicrobial resistance associated mobilome in *Streptococcus*

suis: A probable mobile genetic elements reservoir for other streptococci. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(OCT), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00118>

Huong, V. T. L., Ha, N., Huy, N. T., Horby, P., Nghia, H. D. T., Thiem, V. D., Zhu, X., Hoa, N. T., Hien, T. T., Zamora, J., Schultsz, C., Wertheim, H. F. L., & Hirayama, K. (2014). Epidemiology, clinical manifestations, and outcomes of *Streptococcus suis* infection in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 20(7), 1105–1114. <https://doi.org/10.3201/EID2007.131594>

Hu, Q., Liu, C., Zhang, D., Wang, R., Qin, L., Xu, Q., Che, L., & Gao, F. (2020). Effects of Low-Dose Antibiotics on Gut Immunity and Antibiotic Resistomes in Weaned Piglets. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00903/FULL>

Isaev, A. B., Musharova, O. S., & Severinov, K. V. (2021). Microbial Arsenal of Antiviral Defenses – Part I. *Biochemistry (Moscow)* 2021 86:3, 86(3), 319–337. <https://doi.org/10.1134/S0006297921030081>

Jacobs, A. A. C., Loeffen, P. L. W., Van den Berg, A. J. G., & Storm, P. K. (1994). Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infection and Immunity*, 62(5), 1742–1748. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.5.1742-1748.1994>

Jacobs, A. A. C., Van Den Berg, A. J. G., & Loeffen, P. L. W. (1996). Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. *The Veterinary Record*, 139(10), 225–228. <https://doi.org/10.1136/VR.139.10.225>

Jobin, M. C., Brassard, J., Quessy, S., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2004). Acquisition of Host Plasmin Activity by the Swine Pathogen *Streptococcus suis* Serotype 2. *Infection and Immunity*, 72(1), 606–610. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.606-610.2004>

Johnson, C. M., & Grossman, A. D. (2015). Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annual Review of Genetics*, 49, 577–601. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-112414-055018>

Johnston, C., Campo, N., Bergé, M. J., Polard, P., & Claverys, J. P. (2014). *Streptococcus pneumoniae*, le transformiste. *Trends in Microbiology*, 22(3), 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.002>

- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). *Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications [version 1; referees: 2 approved]*. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Kawamura, Y., Hou, X. G., Sultana, F., Miura, H., & Ezaki, T. (1995). Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(2), 406–408. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-2-406>
- Kerdsin, A., Akeda, Y., Takeuchi, D., Dejsirilert, S., Gottschalk, M., & Oishi, K. (2018). Genotypic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from humans in Thailand. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 37(5), 917–925. <https://doi.org/10.1007/S10096-018-3208-8>
- Kerdsin, A., Dejsirilert, S., Sawanpanyalert, P., Boonnark, A., Noithachang, W., Sriyakum, D., Simkum, S., Chokngam, S., Gottschalk, M., Akeda, Y., & Oishi, K. (2011). Sepsis and spontaneous bacterial peritonitis in Thailand. *Lancet (London, England)*, 378(9794), 960. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60923-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60923-9)
- Kerdsin, A., Gottschalk, M., Hatrongjit, R., Hamada, S., Akeda, Y., & Oishi, K. (2016). Fatal Septic Meningitis in Child Caused by *Streptococcus suis* Serotype 24. *Emerging Infectious Diseases*, 22(8), 1519–1520. <https://doi.org/10.3201/EID2208.160452>
- Kerdsin, A., Hatrongjit, R., Gottschalk, M., Takeuchi, D., Hamada, S., Akeda, Y., & Oishi, K. (2017). Emergence of *Streptococcus suis* serotype 9 infection in humans. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 50(4), 545–546. <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2015.06.011>
- Kerdsin, A., Oishi, K., Sripakdee, S., Boonkerd, N., Polwichai, P., Nakamura, S., Uchida, R., Sawanpanyalert, P., & Dejsirilert, S. (2009). Clonal dissemination of human isolates of *Streptococcus suis* serotype 14 in Thailand. *Journal of Medical Microbiology*, 58(Pt 11), 1508–1513. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.013656-0>
- Kerdsin, A., Takeuchi, D., Nuangmek, A., Akeda, Y., Gottschalk, M., & Oishi, K. (2020). Genotypic comparison between *Streptococcus suis* isolated from pigs and humans in Thailand. *Pathogens*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9010050>
- Kilpper-Balz R, & Heinz Schleifer K. (1987). *Streptococcus suis* sp. nov., nom. rev.

- King, S. J., Leigh, J. A., Heath, P. J., Luque, I., Tarradas, C., Dowson, C. G., & Whatmore, A. M. (2002). Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: Identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10), 3671–3680. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.10.3671-3680.2002/FORMAT/EPUB>
- Kobras, C. M., Fenton, A. K., & Sheppard, S. K. (2021). Next-generation microbiology: from comparative genomics to gene function. In *Genome Biology* (Vol. 22, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02344-9>
- Konstantinidis, K. T., & Tiedje, J. M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *PNAS February*, 15(7), 2567–2572. www.tigr.org.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Wolf, Y. I. (2021). Evolution of Microbial Genomics: Conceptual Shifts over a Quarter Century. In *Trends in Microbiology* (Vol. 29, Issue 7, pp. 582–592). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.005>
- Lacouture, S., Okura, M., Takamatsu, D., Corsaut, L., & Gottschalk, M. (2020). Development of a mismatch amplification mutation assay to correctly serotype isolates of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2, 1/2, and 14. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 32(3), 490–494. <https://doi.org/10.1177/1040638720915869>
- Laddika, L., Malik, S., Chauhan, R., Qureshi, S., Sahoo, M., Patel, S., & Tiwari, A. K. (2021). Isolation and Partial Characterisation of *Streptococcus suis* Bacteriophage. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 10(03), 1300–1306. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1003.158>
- Lal, D., Verma, M., & Lal, R. (2011). *Exploring internal features of 16S rRNA gene for identification of clinically relevant species of the genus Streptococcus*. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-28>
- Lancefield Rebecca. (1933). *A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF HUMAN AND OTHER GROUPS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI*.
- Landy, A. (2015). The λ Integrase Site-specific Recombination Pathway. *Microbiology Spectrum*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.MDNA3-0051-2014/FORMAT/EPUB>

- Lansing M. Prescott, Joanne M. Willey, Linda M. Sherwood, C. J. W. (2013). *Microbiologie de Prescott* (4e ed.).
- Lao, J., Lacroix, T., Gú Edon, G., Coluzzi, C., Payot, S., Leblond-Bourget, N., & Eì Ene Chiapello, H. ´. (2022). ICEscreen: a tool to detect Firmicute ICEs and IMEs, isolated or enclosed in composite structures. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 4. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqac079>
- Lederberg, J., & Tatum, E. L. (1946). Gene Recombination in Escherichia Coli. *Nature* 1946 158:4016, 158(4016), 558–558. <https://doi.org/10.1038/158558a0>
- Levy, S. B., McMurry, L. M., Barbosa, T. M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M. C., Rood, J. I., & Taylor, D. E. (1999). Nomenclature for New Tetracycline Resistance Determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1523. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1523>
- Liang, P., Wang, M., Gottschalk, M., Vela, A. I., Estrada, A. A., Wang, J., Du, P., Luo, M., Zheng, H., & Wu, Z. (2021). *Genomic and pathogenic investigations of Streptococcus suis serotype 7 population derived from a human patient and pigs*. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1988725>
- Liang, Z., Wu, H., Bian, C., Chen, H., Shen, Y., Gao, X., Ma, J., Yao, H., Wang, L., & Wu, Z. (2022). The antimicrobial systems of *Streptococcus suis* promote niche competition in pig tonsils. *Virulence*, 13(1), 781–793. https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2069390/SUPPL_FILE/KVIR_A_2069390_SM0560.ZIP
- Libante, V., Nombre, Y., Coluzzi, C., Staub, J., Guédon, G., Gottschalk, M., Teatero, S., Fittipaldi, N., Leblond-bourget, N., & Payot, S. (2019a). Chromosomal conjugative and mobilizable elements in *Streptococcus suis*: Major actors in the spreading of antimicrobial resistance and bacteriocin synthesis genes. *Pathogens*, 9(1), 1–23. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010022>
- Libante, V., Nombre, Y., Coluzzi, C., Staub, J., Guédon, G., Gottschalk, M., Teatero, S., Fittipaldi, N., Leblond-bourget, N., & Payot, S. (2019b). Chromosomal conjugative and mobilizable elements in *Streptococcus suis*: Major actors in the spreading of antimicrobial resistance and bacteriocin synthesis genes. *Pathogens*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens9010022>

- Libante, V., Sarica, N., Ali, A. M., Gapp, C., & Oussalah, A. (2020). *Interplay between an Integrative Mobilizable Element and its hosting Integrative Conjugative Element : how to have one 's cake and eat it too*. 1–15.
- Li, H., Sharp, R., Rutherford, K., Gupta, K., & Van Duyne, G. D. (2018). Serine Integrase ATP Binding and Specificity. *Journal of Molecular Biology*, 430(21), 4401–4418. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.09.007>
- Li, J., Shen, Y., Zuo, J., Gao, S., Wang, H., Wang, Y., Yi, L., Hou, X., & Wang, Y. (2022). Inhibitory Effect of Monoterpenoid Glycosides Extracts from Peony Seed Meal on *Streptococcus suis* LuxS/AI-2 Quorum Sensing System and Biofilm. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(23). <https://doi.org/10.3390/IJERPH192316024/S1>
- Li, J., Tan, C., Zhou, Y., Fu, S., Hu, L., Hu, J., Chen, H., & Bei, W. (2011). The two-component regulatory system CiaRH contributes to the virulence of *Streptococcus suis* 2. *Veterinary Microbiology*, 148(1), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.005>
- Li, M., Wang, C., Feng, Y., Pan, X., Cheng, G., Wang, J., Ge, J., Zheng, F., Cao, M., Dong, Y., Liu, D., Wang, J., Lin, Y., Du, H., Gao, G. F., Wang, X., Hu, F., & Tang, J. (2008). Salk/SalR, a Two-Component Signal Transduction System, Is Essential for Full Virulence of Highly Invasive *Streptococcus suis* Serotype 2. *PLOS ONE*, 3(5), e2080. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0002080>
- Liu, P., Zhang, Y., Tang, H., Wang, Y., & Sun, X. (2023). Prevalence of *Streptococcus suis* in pigs in China during 2000–2021: A systematic review and meta-analysis. *One Health*, 16, 100513. <https://doi.org/10.1016/J.ONEHLT.2023.100513>
- Li, X. X., Zhang, F. Q., Wang, S., Duan, X. C., Hu, D. Y., Gao, D. Y., Tao, P., Li, X. M., & Qian, P. (2023). *Streptococcus suis* prophage lysin as a new strategy for combating streptococci-induced mastitis and *Streptococcus suis* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 78(3), 747–756. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAD006>
- Li, Y., Gottschalk, M., Esgleas, M., Lacouture, S., Dubreuil, J. D., Willson, P., & Harel, J. (2007). Immunization with recombinant Sao protein confers protection against *Streptococcus suis* infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(8), 937–943. <https://doi.org/10.1128/CVI.00046-07>

- Li, Y., Martinez, G., Gottschalk, M., Lacouture, S., Willson, P., Dubreuil, J. D., Jacques, M., & Harel, J. (2006). Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. *Infection and Immunity*, *74*(1), 305–312. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.305-312.2006>
- Louise Prüfer, T., Rohde, J., Verspohl, J., Rohde, M., De Greeff, A., Willenborg, J., & Valentin-Weigand, P. (2019). Molecular typing of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy pigs between 1996-2016. *PloS One*, *14*(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0210801>
- l'Union européenne. (2015). Communication de la Commission — Lignes directrices pour une utilisation prudente des antimicrobiens en médecine vétérinaire. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, C299/7. http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/antimicrobial_resistance/index_en.htm
- Madsen, L. W., Bak, H., Nielsen, B., Jensen, H. E., Aalbæk, B., & Riising, H. J. (2002). Bacterial colonization and invasion in pigs experimentally exposed to *Streptococcus suis* serotype 2 in aerosol. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, *49*(5), 211–215. <https://doi.org/10.1046/J.1439-0450.2002.00491.X>
- Madsen L.W, Nielsen B, Aalbaek B, Jensen H.E, Nielsen J.P, & Piisin H.J. (2001). Experimental infection of conventional pigs with *Streptococcus suis* serotype 2 by aerosolic exposure. *Acta Vet Scand*, *42*, 303–306. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-42-303>.
- Marie, J., Morvan, H., Berthelot-Hérault, F., Sanders, P., Kempf, I., Gautier-Bouchardon, A. V., Jouy, E., & Kobisch, M. (2002). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from swine in France and from humans in different countries between 1996 and 2000. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *50*(2), 201–209. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf099>
- Marois, C., Le Devendec, L., Gottschalk, M., & Kobisch, M. (2007). Detection and molecular typing of *Streptococcus suis* in tonsils from live pigs in France. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *71*(1), 14–22.
- Martínez, B., Böttiger, T., Schneider, T., Rodriguez, A., Sahl, H. G., & Wiedemann, I. (2008). Specific interaction of the unmodified bacteriocin lactococcin 972 with the cell wall precursor lipid II. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(15), 4666–4670. <https://doi.org/10.1128/AEM.00092-08>

- Martinez, B., Fernandez Maria, Suarez, J. E., & Rodriguez, A. (1999). Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiology*, *145*, 3155–3161.
- Martinez, B., Sudrez', J. E., & Rodriguez', A. (1996). Lactococcin 972 : a homodimeric lactococcal bacteriocin whose primary target is not the plasma membrane. *Microbiology*, *142*, 2393–2398.
- Maruggi, G., Chiarot, E., Giovani, C., Buccato, S., Bonacci, S., Frigimelica, E., Margarit, I., Geall, A., Bensi, G., & Maione, D. (2017). Immunogenicity and protective efficacy induced by self-amplifying mRNA vaccines encoding bacterial antigens. *Vaccine*, *35*(2), 361–368. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2016.11.040>
- Matajira, C. E. C., Moreno, L. Z., Poor, A. P., Gomes, V. T. M., Dalmutt, A. C., Parra, B. M., de Oliveira, C. H., Barbosa, M. R. F., Sato, M. I. Z., Calderaro, F. F., & Moreno, A. M. (2020). *Streptococcus suis* in brazil: Genotypic, virulence, and resistance profiling of strains isolated from pigs between 2001 and 2016. *Pathogens*, *9*(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010031>
- Matiasovic, J., Zouharova, M., Nedbalcova, K., Kralova, N., Matiaskova, K., Simek, B., Kucharovicova, I., & Gottschalk, M. (2020). Resolution of *Streptococcus suis* Serotypes 1/2 versus 2 and 1 versus 14 by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Method. *Journal of Clinical Microbiology*, *58*(7). <https://doi.org/10.1128/JCM.00480-20>
- Ma, Y. L., & Lu, C. P. (2008a). Isolation and identification of a bacteriophage capable of infecting *Streptococcus suis* type 2 strains. *Veterinary Microbiology*, *132*(3–4), 340–347. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2008.05.013>
- Ma, Y. L., & Lu, C. P. (2008b). Isolation and identification of a bacteriophage capable of infecting *Streptococcus suis* type 2 strains. *Veterinary Microbiology*, *132*(3–4), 340–347. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2008.05.013>
- McKeithen-Mead, S. A., & Grossman, A. D. (2023). Timing of integration into the chromosome is critical for the fitness of an integrative and conjugative element and its bacterial host. *PLOS Genetics*, *19*(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1010524>
- McLaughlin, R. E., Ferretti, J. J., & Hynes, W. L. (1999). Nucleotide sequence of the streptococcal A-FF22 lantibiotic regulon: model for production of the lantibiotic SA-FF22 by strains of

Streptococcus pyogenes. *FEMS Microbiology Letters*, 175(2), 171–177.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13616.x>

ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt. (2016). *Synthèse et principales réalisations*.

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Neila-Ibáñez, C., Casal, J., Hennig-Pauka, I., Stockhofe-Zurwieden, N., Gottschalk, M., Migura-García, L., Pailler-García, L., & Napp, S. (2021). Stochastic Assessment of the Economic Impact of *Streptococcus suis*-Associated Disease in German, Dutch and Spanish Swine Farms. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.676002>

Nesmelova, I. V., & Hackett, P. B. (2010). DDE Transposases: Structural Similarity and Diversity. *Adv Drug Deliv Rev*, 62(12), 1187–1195. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.06.006>

Nghia, H. D. T., Ngo, T. H., Le, D. L., Campbell, J., To, S. D., Chau, N. V. V., Mai, N. T. H., Tran, T. H., Spratt, B., Farrar, J., & Schultz, C. (2008). Human case of *Streptococcus suis* serotype 16 infection. *Emerging Infectious Diseases*, 14(1), 155–157. <https://doi.org/10.3201/EID1401.070534>

Nicholson, T. L., & Bayles, D. O. (2022). Comparative virulence and antimicrobial resistance distribution of *Streptococcus suis* isolates obtained from the United States. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1043529>

Nomoto, R., Maruyama, F., Ishida, S., Tohya, M., Sekizaki, T., & Osawa, R. (2015). Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22 and 26: *Streptococcus parasuis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(2), 438–443. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.067116-0/CITE/REFWORKS>

Obradovic, M. R., Segura, M., Segalés, J., & Gottschalk, M. (2021). Review of the speculative role of co-infections in *Streptococcus suis*-associated diseases in pigs. *Veterinary Research*, 52(1). <https://doi.org/10.1186/S13567-021-00918-W>

- Oh, Y., Tark, D., Moon, S.-H., Han, J.-I., Kim, W.-I., & Cho, H.-S. (2018). Sepsis Caused by *Streptococcus suis* Serotype 2 in a Eurasian River Otter (*Lutra lutra*) in the Republic of Korea. *Journal of Wildlife Diseases*, *54*(4), 866–869. <https://doi.org/10.7589/2017-11-281>
- OIE. (2020). *Normes, lignes directrices et résolutions de l'OIE sur l'antibiorésistance et l'utilisation des agents antimicrobiens*.
- Okura, M., Auger, J. P., Shibahara, T., Goyette-Desjardins, G., Van Calsteren, M. R., Maruyama, F., Kawai, M., Osaki, M., Segura, M., Gottschalk, M., & Takamatsu, D. (2021). Capsular polysaccharide switching in *Streptococcus suis* modulates host cell interactions and virulence. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-85882-3>
- Okura, M., Lachance, C., Osaki, M., Sekizaki, T., Maruyama, F., Nozawa, T., Nakagawa, I., Hamada, S., Rossignol, C., Gottschalk, M., & Takamatsu, D. (2014). Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(5), 1714–1719. <https://doi.org/10.1128/JCM.03411-13>
- Okura, M., Nozawa, T., Watanabe, T., Murase, K., Nakagawa, I., Takamatsu, D., Osaki, M., Sekizaki, T., Gottschalk, M., Hamada, S., & Maruyama, F. (2017). A Locus Encoding Variable Defense Systems against Invading DNA Identified in *Streptococcus suis*. *Genome Biology and Evolution*, *9*(4), 1000–1012. <https://doi.org/10.1093/GBE/EVX062>
- Okura, M., Osaki, M., Nomoto, R., Arai, S., Osawa, R., Sekizaki, T., & Takamatsu, D. (2016). Current Taxonomical Situation of *Streptococcus suis*. *Pathogens*, *5*(3), 45. <https://doi.org/10.3390/pathogens5030045>
- Osei, E. K., Mahony, J., & Kenny, J. G. (2022a). From Farm to Fork: *Streptococcus suis* as a Model for the Development of Novel Phage-Based Biocontrol Agents. *Viruses*, *14*(9), 1996. <https://doi.org/10.3390/V14091996/S1>
- Osei, E. K., Mahony, J., & Kenny, J. G. (2022b). From Farm to Fork: *Streptococcus suis* as a Model for the Development of Novel Phage-Based Biocontrol Agents. *Viruses*, *14*(9), 1996. <https://doi.org/10.3390/V14091996/S1>
- Palmieri, C., Magi, G., Mingoia, M., Bagnarelli, P., Ripa, S., Varaldo, P. E., & Facinelli, B. (2012). Characterization of a *Streptococcus suis* tet(O/W/32/O)-carrying element transferable to major streptococcal pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(9), 4697–4702.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00629-12/ASSET/02B57263-6D14-4B29-B67C-D96FF304A3E8/ASSETS/GRAPHIC/ZAC9991011650003.JPEG>

- Palmieri, C., Mingoia, M., & Varaldo, P. E. (2013). Unconventional Circularizable Bacterial Genetic Structures Carrying Antibiotic Resistance Determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2440–2441. <https://doi.org/10.1128/AAC.02548-12>
- Pan, Y., An, H., Fu, T., Zhao, S., Zhang, C., Xiao, G., Zhang, J., Zhao, X., & Hu, G. (2018). Characterization of *Streptococcus pluranimalium* from a cattle with mastitis by whole genome sequencing and functional validation. *BMC Microbiology*, 18(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12866-018-1327-0/FIGURES/5>
- Pan, Z., Ma, J., Dong, W., Song, W., Wang, K., Lu, C., & Yao, H. (2015). Novel variant serotype of *Streptococcus suis* isolated from piglets with meningitis. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(3), 976–985. <https://doi.org/10.1128/AEM.02962-14>
- Paolo Lee, I. A., & Andam, C. P. (2022). Frequencies and characteristics of genome-wide recombination in *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, and *Streptococcus suis*. *Scientific Reports*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04995-5>
- Parte, A. C., Carbasse, J. S., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C., & Göker, M. (2020). List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5607–5612. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004332>
- Pasteur Louis. (1879). Septicémie puerpérale. *Obstetrics and Gynecology*, 8, 271–274.
- Pasteur Louis. (1881). Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 10, 94–103.
- Pham Hai Vu, & Marie-Vivien Delphine. (2017). *La sécurité sanitaire des aliments au Vietnam: état des lieux pluridisciplinaire sur les enjeux au niveau de la production, de la distribution, des politiques publiques et des risques microbiologiques*. The Gioi Eds.
- Popa, O., & Dagan, T. (2011). Trends and barriers to lateral gene transfer in prokaryotes. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 14, Issue 5, pp. 615–623). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.027>
- Postma, M., Stärk, K. D. C., Sjölund, M., Backhans, A., Beilage, E. G., Lösken, S., Belloc, C., Collineau, L., Iten, D., Visschers, V., Nielsen, E. O., & Dewulf, J. (2015). Alternatives to the

use of antimicrobial agents in pig production: A multi-country expert-ranking of perceived effectiveness, feasibility and return on investment. *Preventive Veterinary Medicine*, 118(4), 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.01.010>

Prorocic, M. M., & Stark, W. M. (2013). Site-specific Recombination. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 459–462. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01435-2>

Qiu, X., Bai, X., Lan, R., Zheng, H., & Xu, J. (2016). Novel capsular polysaccharide loci and new diagnostic tools for high-throughput capsular gene typing in *Streptococcus suis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(24), 7102–7112. <https://doi.org/10.1128/AEM.02102-16/FORMAT/EPUB>

Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology* 2017 35:9, 35(9), 833–844. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>

Rayanakorn, A., Goh, B. H., Lee, L. H., Khan, T. M., & Saokaew, S. (2018). Risk factors for *Streptococcus suis* infection: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-31598-W>

Richter, M., & Rosselló -Móra, R. (2009). *Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition*. www.pnas.org/cgi/content/full/

Roberts, M. C. (2005). *Update on acquired tetracycline resistance genes*. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.034>

Rosenbach, F. J. (1884). *Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen*. <https://wellcomecollection.org/works/xvar7vnm/items?canvas=10>

Rubio-Cosials, A., Schulz, E. C., Lambertsen, L., Smyshlyaev, G., Rojas-Cordova, C., Forslund, K., Karaca, E., Bebel, A., Bork, P., & Barabas, O. (2018). Transposase-DNA Complex Structures Reveal Mechanisms for Conjugative Transposition of Antibiotic Resistance. *Cell*, 173(1), 208. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.02.032>

Sánchez del Rey, V., Fernández-Garayzábal, J. F., Mentaberre, G., Briones, V., Lavín, S., Domínguez, L., Gottschalk, M., & Vela, A. I. (2014). Characterisation of *Streptococcus suis* isolates from wild boars (*Sus scrofa*). *The Veterinary Journal*, 200(3), 464–467. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2014.03.013>

- Schröder, G., & Lanka, E. (2005). The mating pair formation system of conjugative plasmids—A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid*, *54*(1), 1–25. <https://doi.org/10.1016/J.PLASMID.2005.02.001>
- Schultsz, C., Jansen, E., Keijzers, W., Rothkamp, A., Duim, B., Wagenaar, J. A., & Ende, A. van der. (2012). Differences in the Population Structure of Invasive *Streptococcus suis* Strains Isolated from Pigs and from Humans in the Netherlands. *PLOS ONE*, *7*(5), e33854. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0033854>
- Schwarz, S., Shen, J., Kadlec, K., Wang, Y., Michael, G. B., Feßler, A. T., & Vester, B. (2016). Lincosamides, Streptogramins, Phenicol, and Pleuromutilins: Mode of Action and Mechanisms of Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(11). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A027037>
- Segura, M. (2020). *Streptococcus suis* Research: Progress and Challenges. *Pathogens*, *9*(9), 707. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090707>
- Segura, M., Aragon, V., Brockmeier, S. L., Gebhart, C., De Greeff, A., Kerdsin, A., O’dea, M. A., Okura, M., Saléry, M., Schultsz, C., Valentin-Weigand, P., Weinert, L. A., Wells, J. M., & Gottschalk, M. (2020). Update on *Streptococcus suis* Research and Prevention in the Era of Antimicrobial Restriction: 4th International Workshop on *S. suis* †-operative Research Programme on Biological Resource Management for Sustainable Agricultural Systems, whose financial support made it possible for most of the invited speakers to participate in the workshop. *Pathogens*, *9*(374), 1–39. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050374>
- Segura, M., Calzas, C., Grenier, D., & Gottschalk, M. (2016). Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis* : fighting against nonspecific defenses. *FEBS Letters*, *590*(21), 3772–3799. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12364>
- Segura, M., Fittipaldi, N., Calzas, C., & Gottschalk, M. (2017a). Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors: Are They All Really Critical? In *Trends in Microbiology* (Vol. 25, Issue 7, pp. 585–599). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.005>
- Segura, M., Fittipaldi, N., Calzas, C., & Gottschalk, M. (2017b). Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors: Are They All Really Critical? *Trends in Microbiology*, *25*(7), 585–599. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2017.02.005>

- Shan, X., Szabo, R. E., & Cordero, O. X. (2023). Mutation-induced infections of phage-plasmids. *Nature Communications* 2023 14:1, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37512-x>
- Smith, H. E., Damman, M., van der Velde, J., Wagenaar, F., Wisselink, H. J., Stockhofe-Zurwieden, N., & Smits, M. A. (1999). Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infection and Immunity*, 67(4), 1750–1756. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.4.1750-1756.1999>
- Smith, H. E., Vecht, U., Wisselink, H. J., Stockhofe-Zurwieden, N., Biermann, Y., & Smits, M. A. (1996). Mutants of *Streptococcus suis* Types 1 and 2 Impaired in Expression of Muramidase-Released Protein and Extracellular Protein Induce Disease in Newborn Germfree Pigs. *INFECTION AND IMMUNITY*, 64(10), 4409–4412.
- Smith, M. C. M., & Thorpe, H. M. (2002). Diversity in the serine recombinases. *Molecular Microbiology*, 44(2), 299–307. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2002.02891.X>
- Soler, N., Robert, E., Chauvot De Beauchêne, I., Monteiro, P., Libante, V., Maigret, B., Staub, J., Ritchie, D. W., Guédon, G., Payot, S., Devignes, M.-D., & Leblond-Bourget, N. (2019). Characterization of a relaxase belonging to the MOB T family, a widespread family in Firmicutes mediating the transfer of ICEs. *BMC*. <https://doi.org/10.1186/s13100-019-0160-9>
- Stackebrandt, E., Goebel, B. M., Wayne, G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., C Moore, W. E., E Murray, R. G., Starr, M. P., & Triiper, H. G. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*, 44(4), 37463–37464.
- Stark, W. M. (2014). The Serine Recombinases. *Microbiology Spectrum*, 2(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0046-2014>
- Sternberg, George. M. (1881). A fatal form of septicaemia in the rabbit produced by the subcutaneous injection of human saliva: an experimental research. *John Murphy & Company*.
- Sun, Y., Veseli, I. A., Vaillancourt, K., Frenette, M., Grenier, D., & Pombert, J. F. (2019). The bacteriocin from the prophylactic candidate *Streptococcus suis* 90-1330 is widely distributed across *S. Suis* isolates and appears encoded in an integrative and conjugative element. *PLoS ONE*, 14(4), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216002>

- Tan, C., Liu, M., Jin, M., Liu, J., Chen, Y., Wu, T., Fu, T., Bei, W., & Chen, H. (2007). *The key virulence-associated genes of Streptococcus suis type 2 are upregulated and differentially expressed in vivo*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00980.x>
- Tan, C., Zhang, A., Chen, H., & Zhou, R. (2019). Recent Proceedings on Prevalence and Pathogenesis of *Streptococcus suis*. *Current Issues in Molecular Biology*, 32, 473–520. <https://doi.org/10.21775/CIMB.032.473>
- Tang, F., Bossers, A., Harders, F., Lu, C., & Smith, H. (2013a). Comparative genomic analysis of twelve *Streptococcus suis* (pro)phages. *Genomics*, 101(6), 336–344. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2013.04.005>
- Tang, F., Bossers, A., Harders, F., Lu, C., & Smith, H. (2013b). Complete Genome Sequence of the *Streptococcus suis* Temperate Bacteriophage ϕ NJ2. *Genome Announcements*, 1(1). <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.00008-12>
- Tang, J., Wang, C., Feng, Y., Yang, W., Song, H., Chen, Z., Yu, H., Pan, X., Zhou, X., Wang, H., Wu, B., Wang, H., Zhao, H., Lin, Y., Yue, J., Wu, Z., He, X., Gao, F., Khan, A. H., ... Gao, G. F. (2006). Streptococcal Toxic Shock Syndrome Caused by *Streptococcus suis* Serotype 2. *PLOS Medicine*, 3(5), e151. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.0030151>
- Taniyama, D., Sakurai, M., Sakai, T., Kikuchi, T., & Takahashi, T. (2016). Human case of bacteremia due to *Streptococcus suis* serotype 5 in Japan: The first report and literature review. *IDCases*, 6, 36–38. <https://doi.org/10.1016/J.IDCR.2016.09.011>
- Tansirichaiya, S., Mullany, P., & Roberts, A. P. (2016). PCR-based detection of composite transposons and translocatable units from oral metagenomic DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 363(18). <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNW195>
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 149–177. <https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2011.12.005>
- Thoma, L., & Muth, G. (2016). Conjugative DNA-transfer in *Streptomyces*, a mycelial organism. *Plasmid*, 87–88, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.PLASMID.2016.09.004>
- Tohya, M., Arai, S., Tomida, J., Watanabe, T., Kawamura, Y., Katsumi, M., Ushimizu, M., Ishida-Kuroki, K., Yoshizumi, M., Uzawa, Y., Iguchi, S., Yoshida, A., Kikuchi, K., & Sekizaki, T. (2017). Defining the taxonomic status of *Streptococcus suis* serotype 33: The proposal for

streptococcus ruminantium sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(9), 3660–3665.
<https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.002204/CITE/REFWORKS>

Toussaint, A., & Merlin, C. (2002). Mobile Elements as a Combination of Functional Modules. *Plasmid*, 47(1), 26–35. <https://doi.org/10.1006/PLAS.2001.1552>

Trocter, M., & Waksman, G. (2018). *Translocation through the Conjugative Type IV Secretion System Requires Unfolding of Its Protein Substrate*. <https://doi.org/10.1128/JB.00615-17>

Uruén, C., Chopo-Escuin, G., Tommassen, J., Mainar-Jaime, R. C., & Arenas, J. (2020). Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(1), 1–36. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10010003>

Uruén, C., García, C., Fraile, L., Tommassen, J., & Arenas, J. (2022). How *Streptococcus suis* escapes antibiotic treatments. *Veterinary Research*, 53(91), 1–33. <https://doi.org/10.1186/s13567-022-01111-3>

Vaillancourt, K., Lebel, G., Frenette, M., Fittipaldi, N., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2015). *Purification and Characterization of Suicin 65, a Novel Class I Type B Lantibiotic Produced by Streptococcus suis*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145854>

Van Heel, A. J., De Jong, A., Song, C., Viel, J. H., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2018). BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research*, 46. <https://doi.org/10.1093/nar/gky383>

Vázquez, R., Domenech, M., Iglesias-Bexiga, M., Menéndez, M., & García, P. (2017). Csl2, a novel chimeric bacteriophage lysin to fight infections caused by *Streptococcus suis*, an emerging zoonotic pathogen. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-16736-0>

Vecht, U., Wisselink, H. J., Van Dijk, J. E., & Smith, H. E. (1991). Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infection and Immunity*, 60(2), 550–556. <https://doi.org/10.1128/IAI.60.2.550-556.1992>

Vogel, V., & Spellerberg, B. (2021). *pathogens Bacteriocin Production by Beta-Hemolytic Streptococci*. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070867>

Vötsch, D., Willenborg, M., Weldearegay, Y. B., & Valentin-Weigand, P. (2018). *Streptococcus suis* - The “two faces” of a pathobiont in the porcine respiratory tract. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 480. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00480/BIBTEX>

- Waksman, G. (2019). From conjugation to T4S systems in Gram-negative bacteria: a mechanistic biology perspective. *EMBO Reports*, 20(2). <https://doi.org/10.15252/embr.201847012>
- Wang, C.-Z., Wang, M.-G., Chu, Y.-F., Sun, R.-Y., Li, J.-G., Li, X.-A., Sun, J., Liu, Y.-H., Zhou, Y.-F., & Liao, X.-P. (2023). Antibiotic Resistance Patterns and Molecular Characterization of *Streptococcus suis* Isolates from Swine and Humans in China. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e0030923. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00309-23>
- Wang, J., Qi, K., Bai, X., Wu, Z., Kang, W., Liang, P., Zheng, H., & Xu, J. (2022). Characterization of integrative and conjugative elements carrying antibiotic resistance genes of *Streptococcus suis* isolated in China. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.1074844/FULL>
- Wang Kaicheng, & Lu Chengping. (2007). Adhesion activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a Chinese *Streptococcus suis* type 2 strain - PubMed. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 207(9), 5–6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17555040/>
- Wang, X., Yu, D., & Chen, L. (2023). Antimicrobial resistance and mechanisms of epigenetic regulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1199646. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1199646>
- Wang, Y., Wang, Y., Sun, L., Grenier, D., & Yi, L. (2018). *Streptococcus suis* biofilm: regulation, drug-resistance mechanisms, and disinfection strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(21), 9121–9129. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9356-z>
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, J., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., & Truper, H. G. (1987). Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*, 37(4), 463–464.
- Wescombe, P. A., Upton, M., Dierksen, K. P., Ragland, N. L., Sivabalan, S., Wirawan, R. E., Inglis, M. A., Moore, C. J., Walker, G. V., Chilcott, C. N., Jenkinson, H. F., & Tagg, J. R. (2006). Production of the lantibiotic salivaricin A and its variants by oral streptococci and use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1459–1466. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1459-1466.2006/ASSET/AF4F43D4-85D9-4A5A-8842-DBC27A0DDFF/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0020664880002.JPEG>

- Wholey, W. Y., Abu-Khdeir, M., Yu, E. A., Siddiqui, S., Esimai, O., & Dawid, S. (2019). Characterization of the competitive pneumocin peptides of streptococcus pneumoniae. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(MAR). <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2019.00055/FULL>
- Wisselink, H. J., Vecht, U., Stockhofe-Zurwieden, N., & Smith, H. E. (2001). Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine. *The Veterinary Record*, 148(15), 473–477. <https://doi.org/10.1136/VR.148.15.473>
- Wongsawan, K., Chaisri, W., Tangtrongsup, S., & Mektrirat, R. (2019). Bactericidal Effect of Clove Oil against Multidrug-Resistant *Streptococcus suis* Isolated from Human Patients and Slaughtered Pigs. *Pathogens*, 9(14), 1–12. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010014>
- Wu, C.-F., Chen, S.-H., Chou, C.-C., Wang, C.-M., Huang, S.-W., & Kuo, H.-C. (2023). Serotype and multilocus sequence typing of *Streptococcus suis* from diseased pigs in Taiwan. *Scientific Reports* |, 13, 8263. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33778-9>
- Xue, B., Shen, Y., Zuo, J., Song, D., Fan, Q., Zhang, X., Yi, L., & Wang, Y. (2022). Bringing Antimicrobial Strategies to a New Level: The Quorum Sensing System as a Target to Control *Streptococcus suis*. *Life*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/LIFE12122006>
- Yang, M., Li, X. S., Li, D., Shang, Y., Yu, R., Schwarz, S., Huang, Z., & Du, X. D. (2020). Two novel lsa(E)-carrying mobile genetic elements in *Streptococcus suis*. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 75, Issue 9, pp. 2689–2691). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa199>
- Yang, Q., Zhu, Y., Schwarz, S., Wang, L., Liu, W., Yang, W., Liu, S., & Zhang, W. (2023). Integrative and conjugative elements in streptococci can act as vectors for plasmids and translocatable units integrated via IS1216E. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 61(5). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106793>
- Yi, L., Jin, M., Li, J., Grenier, D., & Wang, Y. (2020). Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Streptococcus suis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(20), 8649–8660. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10873-9>
- Yin, S., Li, M., Rao, X., Yao, X., Zhong, Q., Wang, M., Wang, J., Peng, Y., Tang, J., Hu, F., & Zhao, Y. (2016). Subtilisin-like protease-1 secreted through type IV secretion system

contributes to high virulence of *Streptococcus suis* 2. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1038/srep27369>

- Y. Kusumo Adi Arji Atmanto, K. P. I. H. (2022). Culture media. *International Research Journal of Modernization in Engineering Technology and Science*, 4(4), 2213–2225.
- Yu, H., Jing, H., Chen, Z., Zheng, H., Zhu, X., Wang, H., Wang, S., Liu, L., Zu, R., Luo, L., Xiang, N., Liu, H., Liu, X., Shu, Y., Shui, S. L., Shuk, K. C., Wang, Y., Xu, J., Yang, W., ... Pang, Q. (2006). Human *Streptococcus suis* Outbreak, Sichuan, China. *Emerging Infectious Diseases*, 12(6), 914. <https://doi.org/10.3201/EID1206.051194>
- Yu, R., Xu, Y., Schwarz, S., Shang, Y., Yuan, X., Zhang, Y., Li, D., & Du, X.-D. (2022). erm(T)-Mediated Macrolide-Lincosamide Resistance in *Streptococcus suis*. *Microbiology Spectrum*, 10(1). <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01657-21>
- Zaccaria, E., Van Baarlen, P., De Greeff, A., Morrison, D. A., Smith, H., & Wells, J. M. (2014). Control of Competence for DNA Transformation in *Streptococcus suis* by Genetically Transferable Pherotypes. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0099394>
- Zeineldin, M., Megahed, A., Burton, B., Blair, B., Aldridge, B., & Lowe, J. F. (2019). Effect of single dose of antimicrobial administration at birth on fecal microbiota development and prevalence of antimicrobial resistance genes in piglets. *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN), 1414. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01414/FULL>
- Zhang, A., Mu, X., Chen, B., Han, L., Chen, H., & Jin, M. (2011). IgA1 protease contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Veterinary Microbiology*, 148(2–4), 436–439. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2010.09.027>
- Zhang, C., Liu, L., Zhang, P., Cui, J., Qin, X., Ma, L., Han, K., Wang, Z., Wang, S., Ding, S., & Shen, Z. (2022). Characterization of a Novel Gene, *srpA*, Conferring Resistance to Streptogramin A, Pleuromutilins, and Lincosamides in *Streptococcus suis*. *Engineering*, 9, 85–94. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2020.12.015>
- Zhang, C., Maruggi, G., Shan, H., & Li, J. (2019). Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00594/FULL>

- Zhang, G., Yao, S., Liu, Y., Fang, H., Song, Y., Wang, C., Wei, D., & Feng, J. (2023). Systematic Discovery of a New Catalogue of Tyrosine-Type Integrases in Bacterial Genomic Islands. *Applied and Environmental Microbiology*, *89*(2). <https://doi.org/10.1128/AEM.01738-22>
- Zhang, T., Zhu, J., Xu, J., Shao, H., & Zhou, R. (2020). Regulation of (p)ppGpp and Its Homologs on Environmental Adaptation, Survival, and Pathogenicity of Streptococci. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1842. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01842/BIBTEX>
- Zhao, Y., Li, G., Yao, X. Y., Lu, S. G., Wang, J., Shen, X. D., & Li, M. (2019). The Impact of SsPI-1 Deletion on *Streptococcus suis* Virulence. *Pathogens* 2019, Vol. 8, Page 287, *8*(4), 287. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS8040287>
- Zhao, Y., Liu, G., Li, S., Wang, M., Song, J., Wang, J., Tang, J., Li, M., & Hu, F. (2011). Role of a Type IV–Like Secretion System of *Streptococcus suis* 2 in the Development of Streptococcal Toxic Shock Syndrome. *The Journal of Infectious Diseases*, *204*(2), 274–281. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIR261>
- Zheng, C., Xu, J., Li, J., Hu, L., Xia, J., Fan, J., Guo, W., Chen, H., & Bei, W. (2014). Two Spx regulators modulate stress tolerance and virulence in *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS ONE*, *9*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108197>
- Zheng, H., Ji, S., Liu, Z., Lan, R., Huang, Y., Bai, X., Gottschalk, M., & Xu, J. (2015). Eight novel capsular polysaccharide synthesis gene loci identified in nontypeable *Streptococcus suis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(12), 4111–4119. https://doi.org/10.1128/AEM.00315-15/SUPPL_FILE/ZAM999116325SO1.PDF
- Zheng, H., Qiu, X., Roy, D., Segura, M., Du, P., Xu, J., & Gottschalk, M. (2017). Genotyping and investigating capsular polysaccharide synthesis gene loci of non-serotypeable *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in Canada. *Veterinary Research*, *48*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S13567-017-0417-6/TABLES/2>
- Zhu, S., Yang, B., Wang, Z., & Liu, Y. (2023). Augmented dissemination of antibiotic resistance elicited by non-antibiotic factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *262*, 115124. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2023.115124>
- Zuo, J., Shen, Y., Wang, H., Gao, S., Yuan, S., Song, D., Wang, Y., & Wang, Y. (2023). Effects of metformin on *Streptococcus suis* LuxS/AI-2 quorum sensing system and biofilm formation. *Microbial Pathogenesis*, *181*, 106183. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2023.106183>

Sitographie

BAGEL4 « <http://bagel4.molgenrug.nl/> »

CEVA « <https://www.ceva-biovac-campus.com> »

ICEscreen « <https://icescreen.migale.inrae.fr/> »

Inserm « <https://www.inserm.fr/c-est-quoi/bataille-de-microbes-cest-quoi-la-phagotherapie/> »

OligoAnalyzer « www.idtdna.com »

OMS « <https://www.unep.org/explore-topics/chemicals-waste/what-we-do/emerging-issues/antimicrobial-resistance-global-threat> »

PrimerQuest Tool « www.idtdna.com »

pubMLST <https://pubmlst.org/>

Annexes

Annexe 1. Supplementary data de la revue

Revue : “Update on the Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Mobile Resistome in the Emerging Zoonotic Pathogen *Streptococcus suis*”

Publiée dans la revue *Microorganisms* (Vol. 9, Issue 8).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9081765>

S1 : Associations entre les gènes d’AbR identifiés chez *Streptococcus suis*.

Annexe 2. Supplementary data de l'article 1

Article 1 : “Antimicrobial resistance profiles of *Streptococcus suis* isolated from pigs, wild boars and humans in France between 1994 and 2020”.

Publié dans la revue *Journal of Clinical Microbiology* (doi 10.1128/jcm.00164-23)

S1 : Métadonnées et résistance aux 22 antibiotiques des 200 souches incluses dans l'étude

S2 : Profils de résistance

| Profile code | Amoxicillin | Penicillin | Erythromycin | Tylosin | Trimethoprim | Clindamycin | Tiamulin | Enrofloxacin | Levofloxacin | No-floxacin | Tetracycline | Trimethoprim-Sulfamethoxazole | Antimicrobial families with resistance | Number of strains |
|--------------|-------------|------------|--------------|---------|--------------|-------------|----------|--------------|--------------|-------------|---|-------------------------------|--|-------------------|
| P0 | | | | | | | | | | | none | | | 29 |
| P1 | | | | | | | | x | | | Tetracycline | | | 19 |
| P2 | x | | | | | | | | | | Macrolides | | | 1 |
| P3 | | | x | x | | | | | | | Lincosamides | | | 1 |
| P4 | | | | | | | | | | x | Diaminopyrimidine/sulphonamides | | | 1 |
| P5 | | | | | x | | | | | | Pleuromutilin | | | 2 |
| P6 | x | x | | | | | | x | | | Tetracycline, Macrolides | | | 3 |
| P7 | | | x | x | | | | x | | | Tetracycline, Lincosamides | | | 1 |
| P8 | x | x | x | x | | | | | | | Macrolides, Lincosamides | | | 2 |
| P9 | | | | | | | | x | | x | Tetracycline, Diaminopyrimidine/sulphonamides | | | 2 |
| P10 | | | | | | x | | | | x | Pleuromutilin, Diaminopyrimidine/sulphonamides | | | 1 |
| P11 | x | x | x | x | | | | x | | | Tetracycline, Macrolides, Lincosamides | | | 97 |
| P12 | x | x | x | x | x | | | | | | Pleuromutilin, Macrolides, Lincosamides | | | 1 |
| P13 | | | x | x | | | | x | | x | Tetracycline, Lincosamides, Diaminopyrimidine/sulphonamides | | | 2 |
| P14 | | | x | x | x | | | x | | | Tetracycline, Lincosamides, Pleuromutilin | | | 3 |
| P15 | x | x | x | x | | | | x | | x | Tetracycline, Macrolides, Lincosamides, Diaminopyrimidine/sulphonamides | | | 20 |
| P16 | x | x | x | x | x | | | x | | | Tetracycline, Macrolides, Lincosamides, Pleuromutilin | | | 3 |
| P17 | x | x | x | x | | | | x | | | Tetracycline, Macrolides, Lincosamides, B-lactams | | | 3 |
| P18 | x | | | x | x | | | x | | | Tetracycline, Lincosamides, Pleuromutilin, B-lactams | | | 1 |
| P19 | x | x | x | x | x | | | x | | | Tetracycline, Macrolides, Lincosamides, Pleuromutilin, B-lactams | | | 2 |
| P20 | x | x | x | x | | | | x | | x | Tetracycline, Macrolides, Lincosamides, Diaminopyrimidine/sulphonamides, Phenicol | | | 2 |
| P21 | x | x | x | x | | | | x | | x | Tetracycline, Macrolides, Lincosamides, Diaminopyrimidine/sulphonamides, B-lactams | | | 1 |
| P22 (x) | x | x | x | x | x | | | x | | x | Tetracycline, Macrolides, Lincosamides, Pleuromutilin, Diaminopyrimidine/sulphonamides, B-lactams | | | 2 |
| P23 | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | Tetracycline, Macrolides, Lincosamides, Pleuromutilin, Diaminopyrimidine/sulphonamides, Fluoroquinolones, B-lactams | | | 1 |

Table S2: Antibiotic susceptibility/resistance profiles of *S. suis* strains (n = 200) collected in France

Annexe 3. Supplementary data de l'article 2

Article 2 : " Characterization of virulence traits, antimicrobial resistance genes carried by mobile genetic elements and competence in *Streptococcus suis* strains isolated in France"

S1 : Tableau de souches séquencées + Analyses

S3 : N° d'accèsion des 21 génomes de référence

S6 : Contrôle qualité des génomes séquencés par nos soins

S7 : Heatmap des gènes d'antibiorésistance présent dans les souches

| Strain | Genome Accession number | Year | Host | Isolation_region | Isolation_site | Pathotype | Serotype | ST | Clonal complex | Gentamicin |
|--------|-------------------------|-------------|-----------|------------------|----------------|-------------|----------|----|----------------|-------------|
| 1 | JAUTF000000000.1 | Before_2010 | pig | Other | Blood | Systemic | 1,2 | 28 | | 28 S |
| 81 | JAUTE000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Blood | Systemic | 1,2 | 28 | | 28 S |
| 94 | JAUTD000000000.1 | Before_2010 | pig | Other | Lung | Respiratory | 1,2 | 28 | | 28 S |
| 106 | JAUTC000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Tonsil | Carriage | | 3 | 231 | 231 S |
| 109 | JAUTB000000000.1 | Before_2010 | pig | Other | Nasal cavity | Carriage | 1,2 | 28 | | 28 S |
| 141 | JAUTA000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Lung | Respiratory | 1,2 | 28 | | 28 S |
| 150 | JAUTH000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Lung | Respiratory | 1,2 | 28 | | 28 S |
| 277 | JAUTHY000000000.1 | Before_2010 | human | Other | Nervous system | Systemic | | 2 | 1 | 1 S |
| 281 | JAUTHX000000000.1 | Before_2010 | human | Other | Blood | Systemic | | 2 | 1 | 1 S |
| 384 | JAUTHW000000000.1 | Before_2010 | wild_boar | Other | Blood | Systemic | | 7 | 1855 | singleton S |
| 430 | JAUTHV000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Nasal cavity | Carriage | | 12 | 1856 | singleton S |
| 434 | JAUTHU000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Nasal cavity | Carriage | | 3 | 231 | 231 S |
| 440 | JAUTHT000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Lung | Respiratory | | 2 | 28 | 28 S |
| 443 | JAUTHS000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Lung | Respiratory | | 3 | 231 | 231 S |
| 450 | JAUTHR000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Nasal cavity | Carriage | | 11 | 1857 | singleton S |
| 488 | JAUTHQ000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Tonsil | Carriage | | 27 | 1858 | singleton S |
| 545 | JAUTHP000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Tonsil | Carriage | | 1 | 1859 | singleton S |
| 548 | JAUTHO000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Tonsil | Carriage | | 16 | 1860 | singleton S |
| 561 | JAUTHN000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Tonsil | Carriage | | 27 | 1861 | singleton S |
| 568 | JAUTHM000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Nasal cavity | Carriage | | 9 | 16 | 16 S |
| 1009 | JAUTHL000000000.1 | Before_2010 | human | Other | Blood | Systemic | | 2 | 1 | 1 S |
| 1015 | JAUTHK000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Lung | Respiratory | 1,2 | 28 | | 28 S |
| 1027 | JAUTHJ000000000.1 | Before_2010 | human | Other | Nervous system | Systemic | | 2 | 1 | 1 S |
| 1034 | JAUTHI000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Nervous system | Systemic | | 9 | 16 | 16 S |
| 1038 | JAUTHH000000000.1 | Before_2010 | pig | Bzh | Lung | Respiratory | | 3 | 231 | 231 S |
| 1075 | JAUTHG000000000.1 | Before_2010 | human | Bzh | Nervous system | Systemic | | 14 | 231 | 231 S |
| 1218 | JAUTHF000000000.1 | After_2015 | human | Other | Brain | Systemic | | 2 | 1 | 1 S |
| 1221 | JAUTHE000000000.1 | After_2015 | human | Other | Blood | Systemic | | 2 | 1 | 1 S |
| 1222 | JAUTHD000000000.1 | After_2015 | human | Other | Blood | Systemic | | 2 | 1 | 1 S |
| 1224 | JAUTHC000000000.1 | After_2015 | wild_boar | Other | Lung | Respiratory | | 29 | 1862 | singleton S |
| 1266 | JAUTHB000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 9 | 1863 | singleton S |
| 1285 | JAUTHA000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Nasal cavity | Carriage | | 11 | 1864 | 1323/1864 S |
| 1311 | JAUTG200000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 18 | 1865 | singleton S |
| 1333 | JAUTGY000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Lung | Respiratory | | 29 | 1866 | singleton S |
| 1450 | JAUTGX000000000.1 | After_2015 | wild_boar | Other | Tonsil | Carriage | | 10 | 1868 | singleton S |
| 1471 | JAUTGW000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Lung | Respiratory | | 5 | 1854 | singleton S |
| 1473 | JAUTGV000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 2 | 1 | 1 S |
| 1474 | JAUTGU000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Lung | Respiratory | | 2 | 28 | 28 S |
| 1475 | JAUTGT000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 2 | 1 | 1 S |
| 1476 | JAUTGS000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Blood | Systemic | | 2 | 1 | 1 S |
| 1477 | JAUTGR000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Nervous system | Systemic | | 2 | 1 | 1 S |
| 1486 | JAUTGQ000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Lung | Respiratory | | 2 | 1 | 1 S |
| 1488 | JAUTGP000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 2 | 1 | 1 S |
| 1492 | JAUTGO000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Blood | Systemic | | 2 | 28 | 28 S |
| 1499 | JAUTGN000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Lymph node | Systemic | | 2 | 1 | 1 S |
| 1500 | JAUTGM000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 7 | 29 | 28 S |
| 1501 | JAUTGL000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Blood | Systemic | | 7 | 29 | 28 S |
| 1502 | JAUTGK000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Joint | Systemic | | 7 | 1515 | 28 S |
| 1503 | JAUTGI000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Na | Unknown | | 7 | 29 | 28 S |
| 1504 | JAUTGJ000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Joint | Systemic | | 7 | 29 | 28 S |
| 1505 | JAUTGH000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 7 | 1505 | 87 S |
| 1506 | JAUTGF000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Nervous system | Systemic | | 7 | 1505 | 87 S |
| 1507 | JAUTGE000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 7 | 1516 | 28 S |
| 1508 | JAUTGD000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 7 | 29 | 28 S |
| 1509 | JAUTGC000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Na | Unknown | | 7 | 29 | 28 S |
| 1512 | JAUTGB000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 7 | 29 | 28 S |
| 1513 | JAUTGA000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Nervous system | Systemic | | 7 | 29 | 28 S |
| 1517 | JAUTGZ000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Nervous system | Systemic | | 7 | 29 | 28 S |
| 1521 | JAUTFZ000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Nervous system | Systemic | | 7 | 1505 | 87 S |
| 1525 | JAUTFY000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Kidney | Systemic | | 7 | 29 | 28 S |
| 1526 | JAUTFX000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Joint | Systemic | | 7 | 29 | 28 S |
| 1529 | JAUTFW000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Nervous system | Systemic | | 9 | 16 | 16 S |
| 1530 | JAUTFV000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 9 | 1518 | 16 S |
| 1531 | JAUTFU000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Nervous system | Systemic | | 9 | 1519 | singleton S |
| 1532 | JAUTFJ000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Blood | Systemic | | 9 | 16 | 16 S |
| 1533 | JAUTFI000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Heart | Systemic | | 9 | 16 | 16 S |
| 1534 | JAUTFH000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Nervous system | Systemic | | 9 | 16 | 16 S |
| 1535 | JAUTFG000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Joint | Systemic | | 9 | 16 | 16 S |
| 1537 | JAUTFD000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Blood | Systemic | | 9 | 16 | 16 S |
| 1538 | JAUTFC000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Blood | Systemic | | 9 | 16 | 16 S |
| 1540 | JAUTFB000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 9 | 16 | 16 S |
| 1548 | JAUTFA000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 9 | 16 | 16 S |
| 1551 | JAUTFL000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 9 | 1521 | 1521/1801 S |
| 1552 | JAUTFK000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 9 | 16 | 16 S |
| 1553 | JAUTFJ000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 14 | 1 | 1 S |
| 1554 | JAUTFI000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 14 | 1522 | 231 S |
| 1556 | JAUTFH000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Liver | Systemic | | 1 | 1 | 1 S |
| 1557 | JAUTFG000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 1 | 13 | 13 S |
| 1558 | JAUTFF000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 1 | 1 | 1 S |
| 1559 | JAUTFE000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 1 | 1 | 1 S |
| 1564 | JAUTFD000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Nervous system | Systemic | | 1 | 1 | 1 S |
| 1566 | JAUTFC000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Blood | Systemic | | 1 | 1 | 1 S |
| 1570 | JAUTFB000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 1 | 1 | 1 S |
| 1571 | JAUTFA000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 1 | 1 | 1 S |
| 1572 | JAUTEZ000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Blood | Systemic | | 1 | 1 | 1 S |
| 1573 | JAUTEY000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Blood | Systemic | | 1 | 1 | 1 S |
| 1574 | JAUTEX000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Nervous system | Systemic | | 1 | 1 | 1 S |
| 1575 | JAUTEW000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 1 | 13 | 13 S |
| 1577 | JAUTEV000000000.1 | After_2015 | pig | Other | Blood | Systemic | | 1 | 1 | 1 S |
| 1583 | JAUTEU000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Joint | Systemic | | 2 | 1 | 1 S |
| 1584 | JAUTET000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 2 | 28 | 28 S |
| 1585 | JAUTES000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 2 | 1 | 1 S |
| 1586 | JAUTER000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Nervous system | Systemic | | 2 | 1 | 1 S |
| 1588 | JAUTEQ000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 9 | 1508 | 14 S |
| 1589 | JAUTEP000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Heart | Systemic | | 9 | 1508 | 14 S |
| 1590 | JAUTEO00000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Nervous system | Systemic | | 9 | 1508 | 14 S |
| 1591 | JAUTEN000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Nervous system | Systemic | | 9 | 16 | 16 S |
| 1594 | JAUTEM000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Nervous system | Systemic | | 9 | 16 | 16 S |
| 1595 | JAUTEL000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Blood | Systemic | | 9 | 1509 | 138/1509 S |
| 1597 | JAUTEK000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Heart | Systemic | | 9 | 1509 | 138/1509 S |
| 1601 | JAUTEI000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Lung | Respiratory | | 3 | 94 | 94 S |
| 1607 | JAUTEH000000000.1 | After_2015 | pig | Bzh | Na | Unknown | | 3 | 231 | 231 S |

| Linezolid | ant(6)Ia | ant(9)-Ia | aph(3)-III | dfp | dfg | erm(B) | inu(B) | Isa(E) | SAT-4 |
|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|--|-----|----------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| S | | | | | | | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (ICE_Tn5252_mut1) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | 1 (ICE_Tn5252_rplL) | | 1 (ICE_Tn5252_rplL) | | | 1 (ICE_Tn5252_rplL) | | | 1 (ICE_Tn5252_rplL) |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | 1 (ICE_Tn5252_rplL) | | 1 (ICE_Tn5252_rplL) | | | 1 (ICE_Tn5252_rplL) | | | 1 (ICE_Tn5252_rplL) |
| S | | | | | | | | | |
| S | 1 (ICE_Tn5252_rplL) | | 1 (ICE_Tn5252_rplL) | | | 1 (ICE_Tn5252_rplL) | | | 1 (ICE_Tn5252_rplL) |
| S | | | | | | | | | |
| S | | | | | | | 1 | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (ICE_Tn5252_ADPrb) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | 1 | 1 | 1 | | | 1 | | |
| S | 1 (ICE_Tn5252_ADPrb) | | 1 (ICE_Tn5252_ADPrb) | | | | 1 | | 1 (ICE_Tn5252_ADPrb) |
| S | | | | | | | 1 | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | 1 (ICE_Tn5252_rumA) | | 1 (ICE_Tn5252_rumA) | | | 1 (ICE_Tn5252_rumA) | | | 1 (ICE_Tn5252_rumA) |
| S | | | | | | 1 (ICE_Tn5252_ADPrb) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diCE_Tn5252_mutT) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | 1 (IME_PPI) | | | | | 1 (IME_PPI) | | | |
| S | | | | 1 (IME_PFO2486 integrated in a prophage) | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | | 1 | | |
| S | | 1 (IME_HTH-XRE) | | | | | 1 | | |
| S | | | | | | | 1 | | |
| S | 1 (prophage_rumA) | | | | | | 1 | | |
| S | | | | | | | | | |
| S | 1 (diCE_Tn5252_mutT) | 1 (diCE_Tn5252_mutT) | | | | 1 (diCE_Tn5252_mutT) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | 1 (ICE_Tn5252_rplL) | 1 (ICE_Tn5252_rplL) | | | | 1 (ICE_Tn5252_rplL) | | | |
| S | | | | | | | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | | | | |
| S | | | | | | 1 (ICE_Tn1549_rbgA) | | | |
| S | | | | | | | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (IME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (IME_guaA) | | | |
| S | | | | | | 1 (ICE_Tn5252) | | | |
| S | | | | | | | | | |
| S | | | | | | 1 (ICE_Tn5252_ADPrb) | | | |
| S | | | | | | | | | |
| S | | | | | | 1 (IME_PPI) | | | |
| S | | | | | | 1 (ICE_Tn5252_mutTetolite) | | | |
| S | | | | | | | | | |
| S | | 1 (prophage_rumA) | | | | | 1 (prophage_rumA) | 1 (prophage_rumA) | |
| S | | | | | | | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | | | | |
| S | | | | | | 1 (ICE_Tn5252_rumA) | | | |
| S | | | | | | 1 (ICE_Tn5252_rumA) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (ICE_Tn5252_rumA) | | | |
| S | | | | | | | | | |
| S | | | | | | 1 (ICE_Tn5252_rumA) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | 1 (diCE_Tn5252_rplL) | | 1 (diCE_Tn5252_rplL) | | | 1 (diCE_Tn5252_rplL) | | | 1 (diCE_Tn5252_rplL) |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (ICE_Tn5252_ADPrb) | | | |
| S | | | | | | 1 (ICE_Tn5252_ADPrb) | | | |
| S | | | | | | | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |
| S | | | | | | 1 (diME_SNF2) | | | |

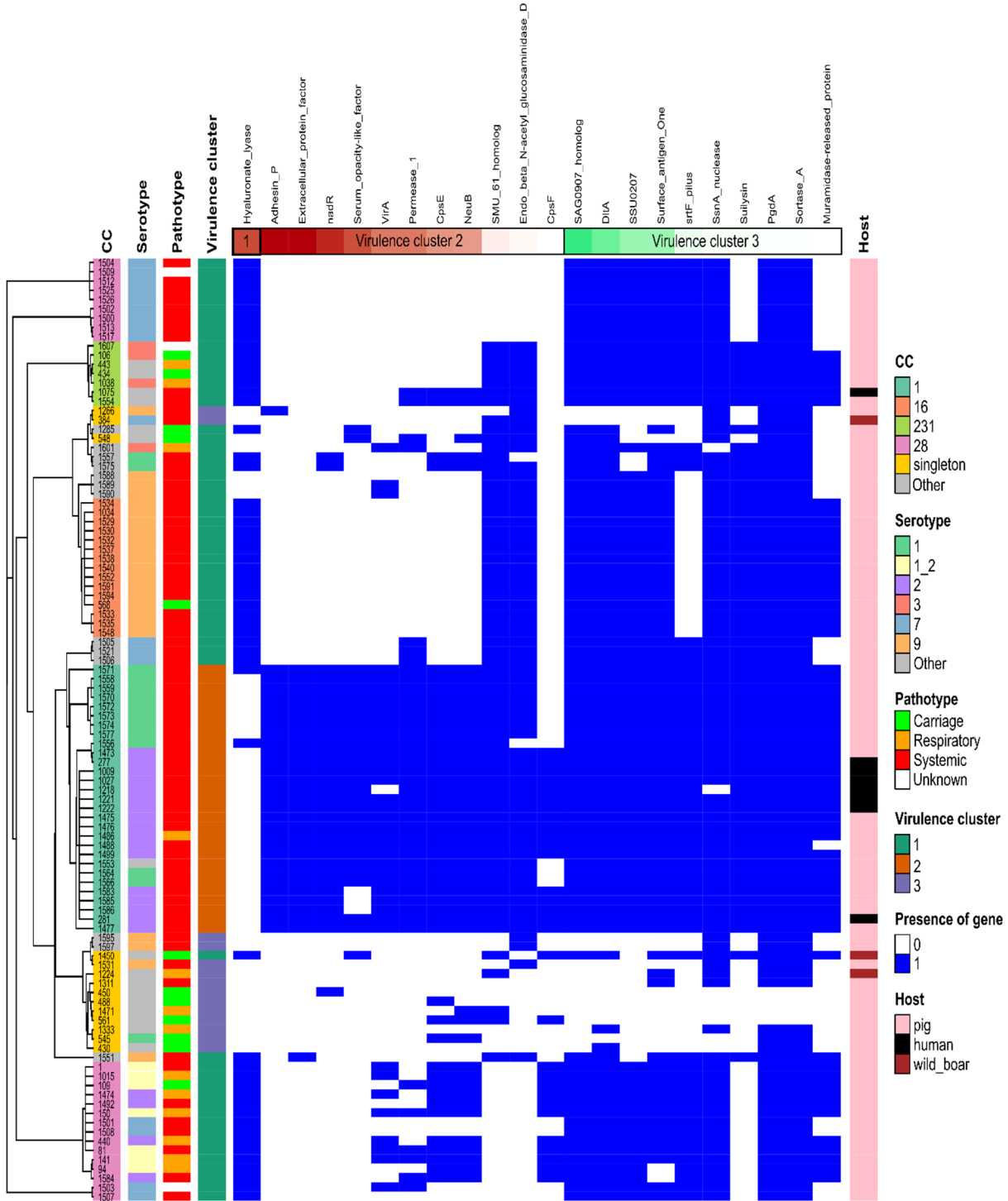
Tableau S3 : N° d'accession des 21 génomes de référence

| Strain | Accession_number |
|-----------------------------|------------------|
| Streptococcus suis D12 | NC_017621.1 |
| Streptococcus suis TL13 | NC_021213.1 |
| Streptococcus suis T15 | NC_022665.1 |
| Streptococcus suis DAT299 | NZ_AP023391.1 |
| Streptococcus suis DAT300 | NZ_AP023392.1 |
| Streptococcus suis 6407 | NZ_CP008921.1 |
| Streptococcus suis ISU2812 | NZ_CP017092.1 |
| Streptococcus suis 1081 | CP017667.1 |
| Streptococcus suis AH681 | NZ_CP025043.1 |
| Streptococcus suis HN105 | NZ_CP029398.1 |
| Streptococcus suis HA1003 | NZ_CP030125.1 |
| Streptococcus suis YSJ17 | NZ_CP032064.1 |
| Streptococcus suis WUSS351 | NZ_CP039462.1 |
| Streptococcus suis 16085/3b | NZ_CP058740.1 |
| Streptococcus suis YZDH1 | NZ_CP065430.1 |
| Streptococcus suis 1112S | NZ_CP071697.1 |
| Streptococcus suis 39565 | NZ_CP076517.1 |
| Streptococcus suis SS389 | NZ_CP082202.1 |
| Streptococcus suis NJ3 | NZ_CP082203.1 |
| Streptococcus suis GD-0088 | NZ_LR738723.1 |
| Streptococcus suis 9401240 | NZ_LR738724.1 |

| Strain | enBank Accession Number | # contigs | contigs (>= 0 bps) | (>= 10bp) | (>= 10bp) | (>= 25bp) | (>= 50bp) | (>= 50bp) | # indels per 100 kbp | local misassembly | misassembled contig | # misassemblies | # mismatches per 100 kbp |
|--------|-------------------------|-----------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------------|-------------------|---------------------|-----------------|--------------------------|
| 1 | JAUTIF000000000.1 | 52 | 66 | 50 | 38 | 28 | 44 | 13 | 62.01 | 150 | 23 | 54 | 2360.15 |
| 81 | JAUTIE000000000.1 | 55 | 66 | 50 | 39 | 29 | 45 | 12 | 59.01 | 154 | 19 | 53 | 2334.88 |
| 94 | JAUTID000000000.1 | 55 | 69 | 50 | 40 | 32 | 45 | 16 | 61.67 | 149 | 23 | 51 | 2368.54 |
| 106 | JAUTIC000000000.1 | 64 | 81 | 58 | 39 | 27 | 46 | 16 | 57.56 | 136 | 21 | 55 | 2341.78 |
| 109 | JAUTIB000000000.1 | 53 | 65 | 47 | 38 | 28 | 44 | 11 | 59.15 | 160 | 18 | 55 | 2331.32 |
| 141 | JAUTIA000000000.1 | 50 | 69 | 46 | 34 | 25 | 40 | 13 | 59.79 | 154 | 17 | 55 | 2358.06 |
| 150 | JAUTHZ000000000.1 | 54 | 66 | 48 | 36 | 27 | 43 | 13 | 59.39 | 155 | 19 | 55 | 2341.65 |
| 277 | JAUTHY000000000.1 | 39 | 50 | 35 | 26 | 21 | 30 | 16 | 3.8 | 12 | 5 | 9 | 100.74 |
| 281 | JAUTHX000000000.1 | 35 | 46 | 30 | 23 | 18 | 25 | 13 | 3.43 | 10 | 5 | 13 | 103.68 |
| 384 | JAUTHW000000000.1 | 32 | 54 | 28 | 22 | 19 | 23 | 15 | 64.83 | 145 | 19 | 93 | 2742.9 |
| 430 | JAUTHV000000000.1 | 100 | 137 | 79 | 50 | 32 | 62 | 15 | 64.54 | 87 | 13 | 42 | 3018.81 |
| 434 | JAUTHU000000000.1 | 62 | 73 | 59 | 40 | 32 | 47 | 19 | 57.21 | 141 | 25 | 56 | 2351.14 |
| 440 | JAUTHT000000000.1 | 60 | 69 | 55 | 43 | 32 | 48 | 15 | 60.08 | 158 | 23 | 52 | 2345.77 |
| 443 | JAUTHS000000000.1 | 68 | 89 | 63 | 41 | 30 | 48 | 16 | 57.18 | 142 | 24 | 56 | 2334.13 |
| 450 | JAUTHR000000000.1 | 78 | 97 | 74 | 44 | 34 | 56 | 16 | 70.98 | 5 | 0 | 0 | 3348.52 |
| 488 | JAUTHQ000000000.1 | 86 | 114 | 75 | 53 | 36 | 57 | 17 | 58.34 | 4 | 2 | 3 | 3494.21 |
| 545 | JAUTHP000000000.1 | 121 | 175 | 110 | 49 | 30 | 69 | 18 | 63.98 | 94 | 19 | 45 | 3030.18 |
| 548 | JAUTHO00000000.1 | 49 | 72 | 41 | 33 | 24 | 38 | 16 | 65.47 | 165 | 20 | 79 | 2706.06 |
| 561 | JAUTHN000000000.1 | 135 | 198 | 117 | 62 | 35 | 86 | 10 | 61.49 | 5 | 2 | 3 | 3570.02 |
| 568 | JAUTHM000000000.1 | 70 | 87 | 60 | 35 | 27 | 46 | 17 | 47.43 | 105 | 19 | 40 | 1708.73 |
| 1009 | JAUTHL000000000.1 | 41 | 49 | 38 | 30 | 21 | 32 | 12 | 4.04 | 11 | 7 | 8 | 114.36 |
| 1015 | JAUTHK000000000.1 | 60 | 70 | 52 | 40 | 30 | 46 | 17 | 59.66 | 153 | 21 | 47 | 2345.47 |
| 1027 | JAUTHJ000000000.1 | 37 | 53 | 34 | 26 | 20 | 28 | 12 | 4.45 | 13 | 4 | 12 | 112.56 |
| 1034 | JAUTHI000000000.1 | 67 | 74 | 57 | 32 | 27 | 43 | 18 | 47.9 | 107 | 20 | 42 | 1724.7 |
| 1038 | JAUTHH000000000.1 | 72 | 87 | 66 | 49 | 34 | 54 | 18 | 57.91 | 136 | 27 | 59 | 2354.36 |
| 1075 | JAUTHG000000000.1 | 64 | 80 | 58 | 40 | 30 | 50 | 16 | 57.39 | 138 | 26 | 53 | 2300.67 |
| 1218 | JAUTHF000000000.1 | 37 | 52 | 32 | 25 | 19 | 27 | 15 | 3.57 | 12 | 7 | 13 | 92.44 |
| 1221 | JAUTHD000000000.1 | 39 | 56 | 36 | 28 | 22 | 31 | 15 | 4.87 | 13 | 7 | 16 | 152 |
| 1222 | JAUTHD000000000.1 | 41 | 60 | 40 | 31 | 24 | 35 | 16 | 4.34 | 13 | 4 | 12 | 110.02 |
| 1224 | JAUTHC000000000.1 | 117 | 186 | 90 | 54 | 33 | 73 | 15 | 71.05 | 109 | 22 | 45 | 2998.21 |
| 1266 | JAUTHB000000000.1 | 52 | 75 | 43 | 31 | 21 | 36 | 14 | 67.23 | 126 | 16 | 89 | 2827.79 |
| 1285 | JAUTHA000000000.1 | 96 | 117 | 81 | 55 | 36 | 66 | 16 | 68.02 | 141 | 32 | 57 | 2768.43 |
| 1311 | JAUTGZ000000000.1 | 176 | 228 | 154 | 74 | 27 | 111 | 4 | 62.28 | 113 | 29 | 53 | 2925.96 |
| 1333 | JAUTGY000000000.1 | 89 | 114 | 80 | 54 | 31 | 61 | 18 | 57.47 | 115 | 17 | 44 | 2997.6 |
| 1450 | JAUTGX000000000.1 | 70 | 98 | 61 | 45 | 29 | 52 | 16 | 76.08 | 139 | 20 | 43 | 2944.32 |
| 1471 | JAUTGW000000000.1 | 104 | 159 | 88 | 57 | 35 | 76 | 15 | 56.83 | 5 | 2 | 2 | 3585.48 |
| 1473 | JAUTGV000000000.1 | 30 | 38 | 25 | 20 | 17 | 22 | 13 | 3.45 | 13 | 7 | 14 | 104.62 |
| 1474 | JAUTGU000000000.1 | 50 | 67 | 43 | 36 | 27 | 40 | 13 | 59.57 | 156 | 19 | 60 | 2346.98 |
| 1475 | JAUTGT000000000.1 | 32 | 39 | 27 | 22 | 17 | 24 | 14 | 3.68 | 9 | 6 | 12 | 110.78 |
| 1476 | JAUTGS000000000.1 | 30 | 37 | 24 | 20 | 17 | 23 | 15 | 4.72 | 12 | 6 | 13 | 130.88 |
| 1477 | JAUTGR000000000.1 | 34 | 40 | 29 | 24 | 19 | 27 | 13 | 3.43 | 10 | 6 | 8 | 54.96 |
| 1486 | JAUTGQ000000000.1 | 39 | 44 | 33 | 27 | 21 | 29 | 15 | 3.63 | 11 | 5 | 10 | 98.79 |
| 1488 | JAUTGP000000000.1 | 31 | 36 | 24 | 20 | 16 | 22 | 13 | 3.9 | 10 | 6 | 14 | 83.92 |
| 1492 | JAUTGO000000000.1 | 52 | 82 | 45 | 37 | 26 | 39 | 13 | 59.71 | 151 | 20 | 61 | 2342.47 |
| 1499 | JAUTGN000000000.1 | 38 | 45 | 28 | 24 | 19 | 26 | 14 | 3.64 | 9 | 5 | 6 | 96.42 |
| 1500 | JAUTGM000000000.1 | 99 | 122 | 91 | 54 | 29 | 76 | 15 | 56.97 | 142 | 30 | 52 | 2381.26 |
| 1501 | JAUTGL000000000.1 | 95 | 127 | 86 | 58 | 35 | 73 | 11 | 60.1 | 138 | 31 | 49 | 2420.87 |
| 1502 | JAUTGK000000000.1 | 105 | 132 | 97 | 55 | 30 | 80 | 15 | 57.28 | 144 | 32 | 50 | 2383.39 |
| 1503 | JAUTGJ000000000.1 | 77 | 95 | 71 | 48 | 31 | 61 | 16 | 57.61 | 148 | 24 | 56 | 2401.1 |
| 1504 | JAUTGI000000000.1 | 94 | 115 | 87 | 55 | 29 | 71 | 13 | 57.16 | 147 | 30 | 54 | 2389.86 |
| 1505 | JAUTHG000000000.1 | 35 | 46 | 28 | 23 | 21 | 26 | 16 | 62.05 | 130 | 16 | 67 | 2329.57 |
| 1506 | JAUTGG000000000.1 | 40 | 53 | 35 | 26 | 21 | 29 | 18 | 61.43 | 123 | 18 | 67 | 2343.12 |
| 1507 | JAUTGF000000000.1 | 97 | 116 | 89 | 51 | 30 | 70 | 13 | 57.64 | 147 | 29 | 54 | 2401.82 |
| 1508 | JAUTGE000000000.1 | 92 | 110 | 84 | 59 | 32 | 72 | 13 | 59.86 | 140 | 34 | 54 | 2425.72 |
| 1509 | JAUTGD000000000.1 | 92 | 112 | 85 | 50 | 32 | 71 | 14 | 57.39 | 149 | 31 | 55 | 2404.16 |
| 1512 | JAUTGC000000000.1 | 92 | 116 | 87 | 50 | 29 | 70 | 14 | 57.48 | 146 | 28 | 50 | 2405.5 |
| 1513 | JAUTGB000000000.1 | 105 | 130 | 95 | 55 | 29 | 80 | 15 | 57.21 | 145 | 30 | 54 | 2386.54 |
| 1517 | JAUTGA000000000.1 | 101 | 128 | 94 | 55 | 29 | 80 | 13 | 57.3 | 144 | 28 | 51 | 2384.98 |
| 1521 | JAUTFZ000000000.1 | 35 | 48 | 29 | 23 | 21 | 26 | 16 | 62.04 | 130 | 16 | 66 | 2330.32 |
| 1525 | JAUTFY000000000.1 | 97 | 116 | 88 | 51 | 29 | 72 | 12 | 57.02 | 148 | 29 | 52 | 2406.12 |
| 1526 | JAUTFX000000000.1 | 99 | 123 | 90 | 53 | 32 | 74 | 13 | 57.55 | 145 | 28 | 49 | 2404.02 |
| 1529 | JAUTFW000000000.1 | 72 | 100 | 62 | 41 | 29 | 50 | 15 | 46.33 | 105 | 20 | 51 | 1721.84 |
| 1530 | JAUTFV000000000.1 | 71 | 97 | 62 | 41 | 30 | 50 | 15 | 46.21 | 103 | 19 | 50 | 1720.93 |
| 1531 | JAUTFU000000000.1 | 68 | 86 | 59 | 44 | 31 | 52 | 15 | 61.45 | 128 | 27 | 69 | 3203.16 |
| 1532 | JAUTFT000000000.1 | 74 | 89 | 60 | 37 | 28 | 43 | 16 | 48.08 | 104 | 18 | 48 | 1749.38 |
| 1533 | JAUTFS000000000.1 | 74 | 96 | 69 | 44 | 29 | 51 | 16 | 48.92 | 96 | 27 | 52 | 1728.01 |
| 1534 | JAUTFR000000000.1 | 69 | 88 | 61 | 33 | 27 | 43 | 17 | 47.65 | 107 | 23 | 53 | 1732.41 |
| 1535 | JAUTFQ000000000.1 | 71 | 87 | 67 | 42 | 29 | 50 | 18 | 48 | 98 | 24 | 54 | 1729.73 |
| 1537 | JAUTFP000000000.1 | 68 | 93 | 60 | 41 | 30 | 49 | 15 | 46.98 | 103 | 19 | 51 | 1736.42 |
| 1538 | JAUTFO000000000.1 | 78 | 95 | 70 | 40 | 32 | 51 | 18 | 46.82 | 100 | 24 | 47 | 1734.84 |
| 1540 | JAUTFN000000000.1 | 73 | 92 | 63 | 38 | 29 | 46 | 16 | 47.66 | 104 | 19 | 47 | 1748.63 |
| 1548 | JAUTFM000000000.1 | 76 | 92 | 70 | 44 | 27 | 51 | 17 | 48.17 | 99 | 28 | 55 | 1730.21 |
| 1551 | JAUTFL000000000.1 | 43 | 54 | 40 | 31 | 26 | 34 | 20 | 63.13 | 148 | 19 | 55 | 2521.17 |
| 1552 | JAUTFK000000000.1 | 66 | 83 | 59 | 37 | 31 | 44 | 18 | 47.85 | 105 | 20 | 43 | 1730.35 |
| 1553 | JAUTFJ000000000.1 | 32 | 38 | 25 | 21 | 16 | 23 | 13 | 4.36 | 10 | 6 | 8 | 64.58 |
| 1554 | JAUTFI000000000.1 | 67 | 91 | 55 | 44 | 30 | 50 | 16 | 57.96 | 133 | 26 | 54 | 2282.18 |
| 1556 | JAUTFH000000000.1 | 44 | 50 | 41 | 32 | 27 | 36 | 18 | 6.98 | 11 | 11 | 15 | 146.98 |
| 1557 | JAUTFG000000000.1 | 68 | 88 | 64 | 40 | 22 | 55 | 16 | 58.65 | 143 | 25 | 49 | 2144.1 |
| 1558 | JAUTFF000000000.1 | 28 | 36 | 24 | 21 | 17 | 23 | 13 | 4.61 | 14 | 7 | 17 | 113.03 |
| 1559 | JAUTFE000000000.1 | 30 | 38 | 24 | 21 | 17 | 23 | 14 | 4.31 | 13 | 7 | 16 | 112.18 |
| 1564 | JAUTFD000000000.1 | 30 | 35 | 24 | 20 | 16 | 22 | 14 | 3.39 | 13 | 6 | 8 | 62.43 |
| 1566 | JAUTFC000000000.1 | 26 | 30 | 22 | 18 | 14 | 20 | 13 | 6.69 | 12 | 6 | 17 | 173.29 |
| 1570 | JAUTFB000000000.1 | 28 | 35 | 25 | 21 | 17 | 24 | 13 | 4.26 | 13 | 6 | 15 | 112.75 |
| 1571 | JAUTFA000000000.1 | 38 | 48 | 33 | 25 | 19 | 29 | 16 | 10.33 | 22 | 9 | 12 | 279.08 |
| 1572 | JAUTEZ000000000.1 | 30 | 38 | 26 | 21 | 18 | 25 | 15 | 4.3 | 16 | 7 | 16 | 114.23 |
| 1573 | JAUTEY000000000.1 | 27 | 36 | 24 | 19 | 16 | 23 | 14 | 4.31 | 15 | 7 | 16 | 113.83 |
| 1574 | JAUTEX000000000.1 | 26 | 36 | 24 | 19 | 16 | 23 | 14 | 4.31 | 15 | 7 | 16 | 113.09 |
| 1575 | JAUTEW000000000.1 | 63 | 77 | 59 | 38 | 22 | 51 | 16 | 59.68 | 146 | 26 | 54 | 2141.58 |
| 1577 | JAUTEV000000000.1 | 31 | 40 | 24 | 20 | 17 | 23 | 15 | 4.15 | 15 | 7 | 15 | 110.81 |
| 1583 | JAUTEU000000000.1 | 28 | 33 | 23 | 19 | 16 | 21 | 16 | 3.88 | 15 | 5 | 12 | 105.01 |
| 1584 | JAUTET000000000.1 | 52 | 68 | 43 | 37 | 26 | 40 | 14 | 61.38 | 152 | 20 | 61 | 2385.08 |
| 1585 | JAU TES000000000.1 | 33 | 39 | 25 | 21 | 18 | 23 | 16 | 3.93 | 16 | 5 | 12 | 104.39 |
| 1586 | JAU TER000000000.1 | 53 | 56 | 45 | 25 | 21 | 32 | 15 | 4.19 | 13 | 6 | 10 | 126.57 |
| 1588 | JAU TEQ000000000.1 | 85 | 108 | 79 | 49 | 34 | 63 | 13 | 49.95 | 118 | 30 | 49 | 1927.77 |
| 1589 | JAU TEP000000000.1 | 87 | 116 | 82 | 47 | 33 | 62 | 12 | 49.98 | 115 | 30 | 51 | 1924.68 |
| 1590 | JAU TEO000000000.1 | 83 | 112 | 80 | 49 | 33 | 63 | 12 | 49.84 | 116 | 29 | 48 | 1921.89 |
| 1591 | JAU TEN000000000.1 | 73 | 91 | 66 | 45 | 35 | 53 | 14 | 48.37 | 109 | 25 | 53 | 1752.05 |
| 1594 | JAU TEM000000000.1 | 77 | 100 | 69 | 44 | 35 | 54 | 14 | 47.91 | 109 | 25 | 50 | 1748.99 |
| 1595 | JAU TEL000000000.1 | 46 | 55 | 44 | 34</ | | | | | | | | |

| # N's per 100 kbp | genes | l genes (>1 genes) | l genes (>1 genes) | l genes (>1 genes) | l genes (>1 genes) | GC (%) | L50 | Largest contig | N50 | Total length | completeness (checkM) | inflation (erogeneity (checkM)) | erogeneity (checkM) |
|-------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------|---------|----------------|------|--------------|-----------------------|---------------------------------|---------------------|
| 0 | .61 + 0 pa:66 + 0 pa:34 + 0 pa:3 + 0 pa:3 + 0 part | 1.005 | 41.14 | 9 | 211050 | 62199 | 2050313 | 99.95 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .97 + 0 pa:66 + 0 pa:60 + 0 pa:1 + 0 pa:3 + 2 part | 1.005 | 41.06 | 9 | 279740 | 68374 | 2113678 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .90 + 0 pa:73 + 0 pa:56 + 0 pa:1 + 0 pa:3 + 0 part | 1.005 | 41.06 | 11 | 210077 | 66979 | 2115227 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .52 + 2 pa:86 + 0 pa:17 + 2 pa:1 + 0 pa:3 + 0 part | 1.004 | 40.96 | 9 | 313872 | 71428 | 2251576 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .90 + 0 pa:68 + 0 pa:58 + 0 pa:3 + 0 pa:3 + 0 part | 1.005 | 41.04 | 8 | 272087 | 80610 | 2103493 | 99.62 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .85 + 2 pa:65 + 0 pa:50 + 2 pa:6 + 0 pa:3 + 0 part | 1.005 | 41.07 | 7 | 278581 | 95375 | 2110021 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .90 + 0 pa:71 + 0 pa:56 + 0 pa:3 + 0 pa:3 + 0 part | 1.006 | 41.05 | 9 | 196375 | 80673 | 2102289 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .39 + 3 pa:72 + 0 pa:07 + 3 pa:6 + 0 pa:3 + 2 part | 1.001 | 41.16 | 6 | 336035 | 93622 | 2052589 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .33 + 0 pa:70 + 0 pa:08 + 0 pa:4 + 0 pa:3 + 2 part | 1.002 | 41.15 | 5 | 367289 | 131499 | 2043909 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .58 + 4 pa:63 + 0 pa:36 + 4 pa:7 + 0 pa:3 + 2 part | 1.001 | 41.45 | 6 | 229185 | 136566 | 2022036 | 99.63 | 0.12 | 0 | | | |
| 0 | .05 + 8 pa:77 + 3 pa:63 + 8 pa:4 + 2 pa:3 + 2 part | 1.005 | 41.68 | 15 | 160231 | 50922 | 2281033 | 99.95 | 0.37 | 0 | | | |
| 0 | .58 + 3 pa:86 + 0 pa:22 + 3 pa:2 + 0 pa:3 + 1 part | 1.005 | 40.96 | 12 | 244885 | 61527 | 2254514 | 99.95 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .89 + 1 pa:69 + 0 pa:54 + 1 pa:4 + 0 pa:3 + 0 part | 1.005 | 41.16 | 11 | 197568 | 61251 | 2105977 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .77 + 0 pa:91 + 0 pa:39 + 0 pa:9 + 0 pa:3 + 0 part | 1.003 | 40.95 | 10 | 263536 | 73278 | 2275543 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .74 + 3 pa:66 + 1 pa:17 + 3 pa:4 + 0 pa:4 + 0 part | 1.006 | 43.12 | 13 | 158974 | 58806 | 2345977 | 99.63 | 0.19 | 0 | | | |
| 0 | .51 + 4 pa:97 + 1 pa:09 + 4 pa:13 + 1 pa:3 + 2 part | 1.013 | 41.54 | 15 | 105643 | 60712 | 2402398 | 99.63 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .31 + 8 pa:06 + 5 pa:81 + 7 pa:02 + 2 pa:4 + 0 part | 1.008 | 41.3 | 14 | 155329 | 58341 | 2378636 | 100 | 0.19 | 0 | | | |
| 0 | .78 + 2 pa:71 + 0 pa:50 + 2 pa:4 + 0 pa:3 + 2 part | 1.003 | 41.11 | 8 | 197909 | 97201 | 2143377 | 100 | 0.62 | 66.67 | | | |
| 0 | .12 + 8 pa:83 + 4 pa:62 + 8 pa:02 + 1 pa:3 + 2 part | 1.023 | 41.37 | 21 | 123507 | 39189 | 2352655 | 99.63 | 0.37 | 100 | | | |
| 0 | .89 + 4 pa:95 + 0 pa:53 + 4 pa:5 + 0 pa:3 + 2 part | 1.006 | 41.04 | 10 | 208537 | 78654 | 2278721 | 100 | 0.37 | 100 | | | |
| 0 | .46 + 2 pa:63 + 1 pa:12 + 2 pa:5 + 0 pa:3 + 0 part | 1.001 | 41.25 | 6 | 305835 | 93586 | 2039787 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .92 + 0 pa:69 + 0 pa:58 + 0 pa:3 + 0 pa:3 + 2 part | 1.006 | 41.16 | 11 | 158797 | 67122 | 2111215 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .35 + 2 pa:68 + 1 pa:06 + 2 pa:8 + 0 pa:3 + 0 part | 1.002 | 41.18 | 5 | 234091 | 170388 | 2033062 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .03 + 6 pa:03 + 1 pa:62 + 6 pa:7 + 0 pa:3 + 2 part | 1.008 | 40.95 | 10 | 222426 | 77017 | 2321189 | 99.95 | 0.37 | 0 | | | |
| 0 | .89 + 0 pa:87 + 0 pa:52 + 0 pa:2 + 0 pa:3 + 0 part | 1.005 | 40.96 | 14 | 211115 | 51776 | 2293207 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .22 + 1 pa:66 + 0 pa:93 + 1 pa:6 + 0 pa:3 + 0 part | 1.005 | 40.88 | 11 | 216461 | 63404 | 2203919 | 100 | 0.37 | 0 | | | |
| 0 | .55 + 1 pa:77 + 0 pa:26 + 1 pa:4 + 0 pa:3 + 0 part | 1.001 | 41.08 | 5 | 305822 | 99053 | 2081053 | 100 | 0.06 | 0 | | | |
| 0 | .58 + 3 pa:70 + 2 pa:24 + 3 pa:8 + 0 pa:3 + 2 part | 1.001 | 41.14 | 7 | 272327 | 93573 | 2076298 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .37 + 3 pa:66 + 1 pa:07 + 3 pa:7 + 0 pa:3 + 2 part | 1.001 | 41.13 | 8 | 224418 | 76895 | 2046177 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .76 + 6 pa:88 + 2 pa:21 + 4 pa:7 + 1 pa:3 + 1 part | 1.007 | 41.39 | 16 | 103614 | 48847 | 2296404 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .57 + 2 pa:12 + 1 pa:22 + 2 pa:5 + 0 pa:3 + 0 part | 1.001 | 41.08 | 6 | 366109 | 113783 | 2308089 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .59 + 5 pa:74 + 0 pa:30 + 5 pa:8 + 0 pa:3 + 2 part | 1.008 | 40.98 | 17 | 98930 | 48177 | 2151715 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .54 + 5 pa:52 + 2 pa:11 + 5 pa:9 + 1 pa:4 + 0 part | 1.013 | 41.27 | 29 | 83605 | 23444 | 2204304 | 99.63 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .28 + 11 pa:92 + 2 pa:86 + 11 pa:7 + 0 pa:3 + 0 part | 1.004 | 41.54 | 14 | 154723 | 56207 | 2359889 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .55 + 2 pa:63 + 0 pa:25 + 2 pa:8 + 0 pa:4 + 0 part | 1.007 | 41.17 | 12 | 151035 | 59629 | 2069459 | 99.95 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .43 + 4 pa:06 + 2 pa:87 + 4 pa:5 + 2 pa:3 + 2 part | 1.045 | 41.28 | 19 | 98486 | 48642 | 2382570 | 99.63 | 0.37 | 100 | | | |
| 0 | .32 + 0 pa:68 + 0 pa:04 + 0 pa:8 + 0 pa:5 + 0 part | 1.002 | 41.21 | 5 | 305078 | 133674 | 2026185 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .91 + 0 pa:68 + 0 pa:56 + 0 pa:4 + 0 pa:5 + 0 part | 1.006 | 41.09 | 8 | 210051 | 80650 | 2106726 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .32 + 3 pa:71 + 1 pa:04 + 3 pa:8 + 0 pa:4 + 0 part | 1.002 | 41.19 | 5 | 305927 | 157075 | 2052458 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .23 + 0 pa:65 + 0 pa:99 + 0 pa:6 + 0 pa:5 + 0 part | 1.002 | 41.1 | 5 | 305925 | 155820 | 2044868 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .20 + 4 pa:67 + 3 pa:95 + 4 pa:1 + 1 pa:5 + 0 part | 1.001 | 41.25 | 6 | 306027 | 101418 | 2015501 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .34 + 0 pa:67 + 0 pa:08 + 0 pa:7 + 0 pa:5 + 0 part | 1.002 | 41.19 | 6 | 262024 | 93641 | 2040127 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .38 + 2 pa:72 + 1 pa:08 + 2 pa:4 + 0 pa:5 + 0 part | 1.002 | 41.17 | 4 | 368291 | 170754 | 2046888 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .96 + 1 pa:72 + 1 pa:61 + 1 pa:5 + 0 pa:4 + 0 part | 1.006 | 41.09 | 8 | 212842 | 80623 | 2116456 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .27 + 0 pa:66 + 0 pa:98 + 0 pa:8 + 0 pa:5 + 0 part | 1.001 | 41.19 | 5 | 306035 | 131367 | 2033019 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .02 + 1 pa:60 + 1 pa:66 + 1 pa:6 + 1 pa:4 + 0 part | 1.01 | 41.09 | 18 | 115633 | 45247 | 2085001 | 100 | 0.06 | 0 | | | |
| 0 | .99 + 0 pa:67 + 0 pa:68 + 0 pa:8 + 0 pa:4 + 0 part | 1.009 | 41.05 | 18 | 104279 | 38185 | 2099378 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .97 + 0 pa:60 + 0 pa:60 + 0 pa:9 + 0 pa:4 + 0 part | 1.01 | 41.09 | 19 | 84859 | 40880 | 2086205 | 100 | 0.06 | 0 | | | |
| 0 | .85 + 1 pa:62 + 1 pa:56 + 1 pa:7 + 1 pa:5 + 0 part | 1.007 | 41.08 | 14 | 192101 | 52502 | 2077619 | 100 | 0.06 | 0 | | | |
| 0 | .84 + 0 pa:58 + 0 pa:57 + 0 pa:1 + 0 pa:4 + 0 part | 1.009 | 41.13 | 16 | 129562 | 41562 | 2068833 | 100 | 0.06 | 0 | | | |
| 0 | .81 + 1 pa:62 + 0 pa:43 + 1 pa:0 + 0 pa:4 + 0 part | 1.004 | 41.1 | 6 | 253523 | 125900 | 2121780 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .51 + 2 pa:74 + 0 pa:15 + 2 pa:9 + 0 pa:4 + 0 part | 1.005 | 41.03 | 7 | 243329 | 111135 | 2221207 | 100 | 0.19 | 0 | | | |
| 0 | .66 + 0 pa:59 + 0 pa:36 + 0 pa:8 + 0 pa:5 + 0 part | 1.01 | 41.09 | 16 | 152486 | 45538 | 2039606 | 100 | 0.06 | 0 | | | |
| 0 | .99 + 2 pa:71 + 0 pa:67 + 2 pa:6 + 0 pa:5 + 0 part | 1.008 | 41.06 | 18 | 104194 | 43563 | 2094340 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .66 + 0 pa:55 + 0 pa:39 + 0 pa:7 + 0 pa:5 + 0 part | 1.01 | 41.09 | 16 | 172066 | 41561 | 2041934 | 100 | 0.06 | 0 | | | |
| 0 | .68 + 2 pa:54 + 1 pa:37 + 2 pa:6 + 1 pa:5 + 0 part | 1.009 | 41.09 | 15 | 164397 | 49995 | 2037476 | 100 | 0.06 | 0 | | | |
| 0 | .99 + 1 pa:61 + 1 pa:61 + 1 pa:7 + 1 pa:5 + 0 part | 1.01 | 41.09 | 18 | 114553 | 38556 | 2086547 | 100 | 0.06 | 0 | | | |
| 0 | .00 + 1 pa:65 + 0 pa:68 + 1 pa:6 + 0 pa:4 + 0 part | 1.01 | 41.09 | 18 | 115633 | 40880 | 2085767 | 100 | 0.06 | 0 | | | |
| 0 | .58 + 1 pa:57 + 0 pa:23 + 1 pa:0 + 0 pa:4 + 0 part | 1.004 | 41.09 | 7 | 253522 | 115114 | 2087038 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .63 + 1 pa:55 + 0 pa:35 + 1 pa:8 + 0 pa:5 + 0 part | 1.009 | 41.09 | 16 | 171960 | 45245 | 2040296 | 100 | 0.06 | 0 | | | |
| 0 | .66 + 2 pa:53 + 0 pa:34 + 2 pa:6 + 0 pa:5 + 0 part | 1.011 | 41.09 | 17 | 135672 | 38783 | 2039451 | 99.62 | 0.06 | 0 | | | |
| 0 | .46 + 2 pa:88 + 1 pa:15 + 2 pa:1 + 0 pa:5 + 0 part | 1.007 | 41.29 | 10 | 242287 | 63015 | 2165034 | 100 | 0.37 | 100 | | | |
| 0 | .44 + 1 pa:91 + 0 pa:11 + 1 pa:2 + 0 pa:5 + 0 part | 1.006 | 41.29 | 10 | 242287 | 62207 | 2163971 | 100 | 0.37 | 100 | | | |
| 0 | .88 + 2 pa:76 + 1 pa:60 + 2 pa:3 + 0 pa:3 + 0 part | 1.005 | 41.42 | 13 | 134534 | 56397 | 2104929 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .41 + 0 pa:17 + 0 pa:03 + 0 pa:9 + 0 pa:5 + 0 part | 1.008 | 41.05 | 9 | 241753 | 83234 | 2374325 | 100 | 0.75 | 50 | | | |
| 0 | .06 + 1 pa:81 + 0 pa:76 + 1 pa:3 + 0 pa:5 + 0 part | 1.008 | 41.22 | 12 | 166804 | 64053 | 2105172 | 100 | 0.37 | 100 | | | |
| 0 | .89 + 0 pa:00 + 0 pa:52 + 0 pa:5 + 0 pa:5 + 0 part | 1.007 | 41.01 | 10 | 209617 | 77682 | 2282997 | 100 | 0.37 | 100 | | | |
| 0 | .09 + 1 pa:85 + 0 pa:83 + 1 pa:5 + 0 pa:5 + 0 part | 1.008 | 41.22 | 13 | 144372 | 62966 | 2101648 | 100 | 0.37 | 100 | | | |
| 0 | .40 + 2 pa:89 + 1 pa:11 + 2 pa:2 + 0 pa:5 + 0 part | 1.007 | 41.29 | 10 | 242287 | 62207 | 2164235 | 100 | 0.37 | 100 | | | |
| 0 | .66 + 1 pa:89 + 0 pa:31 + 1 pa:8 + 0 pa:5 + 0 part | 1.009 | 41 | 12 | 174973 | 66878 | 2238032 | 100 | 0.75 | 50 | | | |
| 0 | .33 + 1 pa:17 + 1 pa:94 + 1 pa:8 + 1 pa:5 + 0 part | 1.008 | 41.05 | 10 | 241790 | 77138 | 2370777 | 100 | 0.75 | 50 | | | |
| 0 | .83 + 1 pa:77 + 0 pa:57 + 1 pa:1 + 0 pa:5 + 0 part | 1.009 | 41.22 | 12 | 144372 | 64053 | 2069559 | 100 | 0.37 | 100 | | | |
| 0 | .22 + 1 pa:74 + 1 pa:86 + 1 pa:9 + 1 pa:4 + 0 part | 1.005 | 41.18 | 9 | 184594 | 81675 | 2156972 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .19 + 1 pa:13 + 0 pa:86 + 1 pa:9 + 0 pa:5 + 0 part | 1.007 | 40.98 | 12 | 161267 | 80962 | 2347163 | 100 | 0.75 | 50 | | | |
| 0 | .03 + 2 pa:59 + 1 pa:78 + 2 pa:1 + 0 pa:5 + 0 part | 1.002 | 41.3 | 4 | 306032 | 171247 | 1966158 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .35 + 2 pa:72 + 1 pa:06 + 2 pa:0 + 0 pa:5 + 0 part | 1.007 | 40.84 | 11 | 175683 | 70334 | 2246966 | 99.72 | 0.37 | 0 | | | |
| 0 | .14 + 1 pa:58 + 0 pa:88 + 1 pa:3 + 0 pa:5 + 0 part | 1.003 | 41.24 | 10 | 177242 | 85628 | 1987296 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .57 + 0 pa:52 + 0 pa:19 + 0 pa:0 + 0 pa:4 + 0 part | 1.007 | 41.42 | 11 | 168519 | 66223 | 1991649 | 99.63 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .21 + 2 pa:71 + 1 pa:94 + 2 pa:8 + 0 pa:5 + 0 part | 1.001 | 41.21 | 4 | 421412 | 131143 | 2028912 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .25 + 2 pa:73 + 1 pa:96 + 2 pa:6 + 0 pa:5 + 0 part | 1.002 | 41.21 | 5 | 305932 | 131142 | 2029132 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .00 + 0 pa:59 + 0 pa:77 + 0 pa:2 + 0 pa:5 + 0 part | 1.001 | 41.3 | 4 | 305938 | 171083 | 1966307 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .29 + 2 pa:67 + 1 pa:02 + 2 pa:0 + 0 pa:5 + 0 part | 1.002 | 41.14 | 4 | 378415 | 170402 | 2037035 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .43 + 2 pa:76 + 1 pa:11 + 2 pa:8 + 0 pa:5 + 0 part | 1.002 | 41.22 | 5 | 305988 | 134845 | 2064699 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .32 + 1 pa:67 + 0 pa:05 + 1 pa:0 + 0 pa:5 + 0 part | 1.003 | 41.3 | 6 | 305000 | 93709 | 2004403 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .54 + 0 pa:76 + 0 pa:20 + 0 pa:9 + 0 pa:5 + 0 part | 1.001 | 41.21 | 5 | 305933 | 124767 | 2070350 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .45 + 0 pa:76 + 0 pa:15 + 0 pa:0 + 0 pa:5 + 0 part | 1.002 | 41.21 | 5 | 305933 | 170442 | 2069548 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .48 + 0 pa:77 + 0 pa:21 + 0 pa:9 + 0 pa:5 + 0 part | 1.002 | 41.21 | 5 | 305933 | 170440 | 2068932 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .59 + 0 pa:50 + 0 pa:21 + 0 pa:8 + 0 pa:4 + 0 part | 1.006 | 41.41 | 10 | 168473 | 66949 | 1988689 | 99.63 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .52 + 1 pa:73 + 0 pa:21 + 1 pa:9 + 0 pa:5 + 0 part | 1.002 | 41.21 | 5 | 305935 | 131142 | 2070148 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .28 + 0 pa:72 + 0 pa:02 + 0 pa:9 + 0 pa:5 + 0 part | 1.001 | 41.18 | 5 | 306027 | 131119 | 2039470 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .85 + 0 pa:71 + 0 pa:54 + 0 pa:4 + 0 pa:4 + 0 part | 1.005 | 41.05 | 8 | 267695 | 83305 | 2103839 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .33 + 0 pa:69 + 0 pa:06 + 0 pa:9 + 0 pa:5 + 0 part | 1.001 | 41.18 | 5 | 306027 | 93645 | 2038930 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .79 + 6 pa:78 + 4 pa:46 + 6 pa:0 + 1 pa:5 + 0 part | 1.009 | 41.1 | 6 | 306456 | 109814 | 2137513 | 100 | 0.37 | 100 | | | |
| 0 | .15 + 2 pa:77 + 0 pa:83 + 2 pa:8 + 0 pa:5 + 0 part | 1.008 | 40.92 | 14 | 167861 | 47145 | 2180672 | 100 | 0 | 0 | | | |
| 0 | .28 + | | | | | | | | | | | | |

Virulence-associated genes



220

Figure 1: Heatmaps of (i) clonal complex (CC), (ii) serotype, (iii) pathotype, (iv) virulence-gene pattern and (v) host for the 102 genomes of French isolates of *Streptococcus suis*. Genomes have been grouped according to their phylogenetic distance determined by alignment of their core genes (see 'Method') (as indicated by a phylogenetic tree at the left). The legends for the heatmaps are indicated on the right of the figure. The names of the strains are indicated in the CC heatmap. Hierarchical clustering (HCPC) enabled the classification of the genomes in three clusters according to their pattern of putative virulence genes. The presence of a putative virulence gene is indicated in blue. Putative virulence genes have been ordered according to their association with one of the three clusters of virulence genes (numbered 1 to 3) obtained by HCPC. Inside each cluster, only genes that are discriminant (n=22) are indicated and ordered according to their discriminating power (decreasing value of v.test obtained through HCPC indicated by a decrease of color intensity, a positive association i.e. v.test positive is indicated in brown and a negative association i.e. v.test negative in green).

Detection and quantification of conjugative transfer of Mobile Genetic Elements carrying antibiotic resistance genes in *Streptococcus suis*

Virginie Libante¹, Manon Dechêne-Tempier^{1,2}, Nathalie Leblond-Bourget¹ and Sophie Payot¹ #

¹ Université de Lorraine, INRAE, DynAMic, F-54000 Nancy, France

² Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Mycoplasmologie, Bactériologie et Antibiorésistance, F-22440 Ploufragan, France

Corresponding author

Tel: +33 3 72 74 51 48

E-mail address: sophie.payot-lacroix@inrae.fr

Running head:

Detection and activity of Mobile Genetic Elements

Abstract

Multidrug resistance, due to acquired antimicrobial resistance genes, is increasingly reported in the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. Most of these resistance genes are carried by chromosomal Mobile Genetic Elements (MGEs), in particular Integrative and Conjugative Elements (ICEs) and Integrative and Mobilizable Elements (IMEs). ICEs and IMEs frequently form tandems or nested composite elements, which make their identification difficult. To evaluate their mobility, it is necessary to (i) select the suitable donor-recipient pairs for mating assays, (ii) do PCR excision tests to confirm that the genetic element is able to excise from the chromosome as a circular intermediate, and (iii) evaluate the transfer of the genetic element by conjugation by doing mating assays. In addition to a dissemination of resistance genes between *S. suis* strains, MGEs can lead to a spreading of resistance genes in the environment and towards pathogenic bacteria. This propagation had to be considered in a One Health perspective.

Keywords

Streptococcus suis, antibiotic resistance, Mobile Genetic Elements, ICE, IME, excision, conjugation.

1. Introduction

Mobile Genetic Elements (MGEs) that can transfer by conjugation are widespread in *Streptococcus suis* [1–3]. Almost all these elements are integrated in the chromosome. They include Integrative and Conjugative Elements (ICEs) and Integrative Mobilizable Elements (IMEs). ICEs are autonomous MGEs that encode all the genes and sequences necessary for their dissemination [4]. In particular, they all encode at least one integrase, an enzyme necessary for their excision and integration into bacterial genomes. Three types of integrases exist: tyrosine integrases, serine integrases and DDE transposases (i.e. with a DDE motif in their catalytic site). DNA transfer is initiated by an enzyme called relaxase, which nicks the origin of transfer (*oriT*) of the ICE and covalently attaches to the 5' end of the DNA [5, 6]. All ICEs contain genes that encode a conjugation pore that is a multiprotein complex related to Type IV secretion systems (T4SSs). It ensures the transport of the DNA-relaxase complex through the cell membranes and walls of both the donor and the recipient bacteria. This transport requires energy supplied by the T4SS ATPases, including the coupling protein and VirB4 [5, 6]. IMEs are also able to excise from the chromosome but, by contrast with ICEs, they are not autonomous for their transfer [4, 7]. They transfer by mobilization through the T4SS of an autonomous conjugative element resident in the same cell. They contain an *oriT* and may also carry some genes involved in conjugation. Almost all known IMEs of Firmicutes encode a relaxase and many putative IMEs from *Streptococcus* encode a coupling protein [8]. This is also the case for *S. suis* [9]. None of them encodes T4SS proteins. For instance, they are all deprived of the VirB4 ATPase, the most conserved protein of conjugative T4SSs. While the literature on ICEs has clearly expanded in recent years, the literature on IMEs remains weak and as a result they remain largely unknown. Most of the antibiotic resistance genes found in *S. suis* are carried by ICEs and IMEs [3, 9]. These MGEs thus contribute to the dissemination of antibiotic resistance genes not only inside the *S. suis* species but also to other bacterial species.

The identification of ICEs and IMEs in bacterial genomes remains a challenge. This is primarily due to the diversity of the elements that results from their evolution through gene exchange. A high diversity of MGEs that could transfer by conjugation has been reported in *S. suis* with seven families of ICEs and twelve families of IMEs (when considering relaxase families) already described [9]. Another difficulty in ICE/IME identification is that they may form composite structures: (i) tandems when two elements integrate in the same target site or (ii)

nested elements when one element integrates in another one (Figure 1). An “host” element (ICE or IME) can be the target of a variety of “guest” elements (ICE, IME, group II introns or other genetic elements). The formation of composite elements is particularly frequent in *S. suis* [9]. Finally, the abundance of ICEs and IMEs can be an additional difficulty, both for detecting the elements in the genomes and for testing their mobility, especially if several identical or closely related elements co-exist within the same genome. This can be the case for Tn*GBS2* and Tn*5252* ICE families found in *S. suis* for which up to three copies can co-exist in bacterial cells [9]. The three factors that complicate the identification and delimitation of chromosomal MGEs are thus combined in *S. suis*. The recently described ICEScreen tool [10] proved to be very efficient to solve these problems and was successfully applied to uncomplete genomes of *S. suis* [9]. For the detection of ICEs and IMEs, ICEScreen relies on the presence of Signature Proteins (SPs) encoded by ICEs and IMEs, i.e. proteins that are characteristic of these integrative elements (integrase-relaxase-coupling protein-VirB4 and integrase-relaxase-(optional coupling protein) respectively) [10]. The strategy to detect SPs of ICEs and IMEs is based on a database dedicated to streptococcus elements and composed of manually curated proteins and Hidden Markov Models (HMM) profiles [10]. ICEScreen is freely available (https://forgemia.inra.fr/ices_imes_analysis/icescreen) and can be run locally or remotely with Galaxy (more details are available on these web pages: https://icescreen.migale.inrae.fr/run_icescreen/).

Once a putative ICE or IME has been identified in the genome, the next step is to evaluate its mobility. Three steps can be defined: (i) selection of suitable donor-recipient mating pairs, (ii) excision tests, and (iii) transfer experiments.

Selection of suitable donor-recipient mating pairs

Since conjugation requires a tight physical contact between donor and recipient cells, it cannot usually be observed in liquid medium unless the MGE encodes an adhesin. Thus, a classical method used to test MGE transfer is mating assays on solid medium using filters to promote interbacterial contact [11, 12]. The use of filters is convenient to recover the entire bacterial population, compared to scraping from the plate with a cotton swab. The method relies on the enumeration of transconjugants (i.e. recipient cells that have acquired the MGE) thanks to two selectable antibiotic resistances: one specific to the recipient cells and an additional one carried by the MGE that has been acquired by conjugation. The high prevalence of antibiotic resistance in *S. suis* precludes the use of many antibiotic resistance markers to track horizontal transfer of

MGEs. Preliminary susceptibility tests are thus needed to determine the antibiotic resistance patterns and levels of resistance (to avoid false-positives) of the donor and recipient strains. If necessary, rifampicin and streptomycin derived mutants of cells devoid of the MGE can be selected using a stepwise method to obtain recipient cells [13]. Spontaneous mutations conferring resistance to rifampicin and streptomycin can be obtained in the *rpoB* gene (encoding the beta subunit of RNA polymerase) and the *rpsL* gene (encoding the S12 ribosomal protein) respectively.

In addition, many strains of *S. suis* produce a bacteriocin (whose production locus is usually encoded by an ICE but not always active) that can kill other *S. suis* strains or other bacterial species [9, 14]. A preliminary evaluation of bacteriocin production by donor and recipient strains is thus needed before doing the transfer experiments, and they are also described below.

Detection of the MGE and excision tests in the donor strain

First, PCR experiments should be carried out to confirm the presence of the MGE in the donor strain(s) (detection of the *attL* and *attR* recombination sites) and its absence in the recipient strain(s) (detection of an empty *attB* site). This is done by using pairs of primers located at both extremities of the MGE and surrounding the integration site (Figure 1).

In order to detect a transfer event, it is necessary to first evaluate if the MGE(s) is (are) able to excise from the chromosome (either alone or as a composite element in case of tandem or nested elements, Figure 1). Excision tests are done by PCR using dedicated primers to detect both the excised element(s) (through its/their *attI* site) and the empty bacterial site (*attB*) (Figure 1).

Transfer experiments

As mentioned previously, the classical method used to test the transfer of conjugative elements is filter-mating assays. This is an “end-point method” that does not quantify conjugation events but measures the number of viable colonies of transconjugants obtained after mating of donor and recipient at a particular ratio and during a certain time. The method is easy to perform and requires only basic laboratory equipment. However, it is time-consuming and needs several replicates to allow interpretation. Other more technically-challenging methods exist [15–17]. They rely on fluorescence reporters (flow-cytometry, time-lapse microscopy) and thus require the preliminary introduction of a fluorescence gene in the sequence of the MGE (with the risk of modifying its regulation or its functionality).

2. Materials

All materials should be sterilized. Experiments should be developed in sterile conditions (except PCR experiments).

2.1 Equipment

1. Autoclave
2. Incubator (37°C).
3. Laminar flow cabinet.
4. Bench centrifuge.
5. PCR machine.
6. Equipment for gel electrophoresis and gel visualization.
7. Densitometer (suspension turbidity detector).
8. System to incubate plates in anaerobic conditions.
9. Glassware and plastic material: microcentrifuge tubes (0.2 mL, 1.5 mL and 2 mL), 50-mL Falcon tubes, 5-mL plastic tubes, Petri dishes, Erlenmeyer flasks, inoculation loops.
10. Automatic pipettes (1 mL, 0.2 mL, 0.02 mL) and respective tips.
11. Nitrocellulose filters (0.22 µm).
12. Centrifuge for 50-mL Falcon tubes
13. Drigalski spreaders.
14. Tweezers.

2.2 Media and solutions

1. Culture media: brain heart infusion (BHI) broth, BHI 2% (w/v) agar and soft-agar BHI 0.8% (w/v) agar powder.
2. Antibiotic powders to prepare stock solutions of antibiotics (according to manufacturer recommendations).
3. Distilled and milliQ water.
4. 0.9% (w/v) NaCl solution in distilled water.
5. BHI broth 15% (w/v) glycerol solutionin.
6. Tris-borate-EDTA (TBE) buffer
7. 100 pb-2kb DNA ladder
8. TBE buffer 0.8%, 1%, 1.5%, or 2.5% (w/v) agarose

9. Ethidium bromide

2.3 Consumables for Polymerase Chain Reaction

1. Genomic DNA extraction kit to prepare DNA template for PCR
2. Oligonucleotides: Primers 1 to 8 (see Figure 1) are MGE-specific primers. These should be standard primers with T_m of 55-65°C. Primers described by Okura et al. [18] can be used for typing *S. suis* donor and recipient strains if they do not belong to the same serotype.
3. *Taq* DNA polymerase
4. 0.2 mM deoxynucleoside triphosphates

2.4 Bacterial strains

The MGE to study should have a selectable antibiotic marker (either naturally or after addition by genetic manipulation of the strain). In order to detect transfer of this MGE by conjugation to recipient cells, these cells need to have a distinct antibiotic resistance phenotype. Prior to molecular and transfer experiments, the resistance phenotypes of both donors and recipient should be confirmed by susceptibility testing using standard protocols [19].

A convenient strain that can be used as recipient for mating assays is the *S. suis* P1/7 strain. The genome of this strain has been completely sequenced (GenBank accession number: NC_012925.1). This strain does not host any ICE and only two IMEs (one integrated in *guaA* and one in a tRNA^{Leu} gene) [8, 20] and does not encode any bacteriocin production pathway. Rifampicin-streptomycin derived mutants of this recipient strain can be selected using a stepwise-selection method (see 3.1.1 part below).

3. Methods

3.1 Selection of suitable donor-recipient mating pairs

3.1.1 Tests of bacteriocin production by donor and recipient cells

The overlay method has been adapted from the one described by Fontaine *et al.* [21].

1. Inoculate donor and recipient strain(s) in a 5-mL tube containing BHI broth and incubate at 37°C until the beginning of the stationary phase (*see Note 1*).
2. Prepare serial ten-fold dilutions of the culture(s) in 0.9% NaCl solution. Add 30-100-150 μ L of 10^{-5} to 10^{-6} cells dilutions in 2-mL tubes. Pour molten soft-agar BHI until the tube is almost

full, homogenize the samples by inversion, pour on non-selective small BHI agar plates (54 mm) and swirl the molten agar containing individual cells around for an even layer (*see Note 2*). When solidified, incubate plates at 37°C in anaerobic conditions overnight.

3. Select plates with 3-30 CFUs (Colony Forming Units).

4. Inoculate donor and recipient strain(s) in a 5-mL tube containing BHI broth and incubate at 37°C until the beginning of the stationary phase (*see Note 3*).

5. Put 150 µL of recipient stationary phase culture(s) in 2-mL tubes. Pour molten soft-agar BHI until the tube is almost full, homogenize the samples by inversion, pour on donor colonies containing plates and swirl the molten agar containing high density culture around for an even third layer. Pour molten soft-agar BHI mixed with donor strain(s) on recipient colonies containing plates as described previously for the recipient layer on donor colonies (*see Note 4*). When solidified, incubate plates at 37°C in anaerobic conditions.

6. After 10 h, analyze if inhibition zones are present around the middle agar layer colonies. If one of the strains is producing a compound (most probably a bacteriocin) that is toxic for the other strain, the donor-recipient pair cannot be used in mating assays. If the top layer is homogenous or slightly affected by the colonies embedded in the middle agar layer, the donor-recipient pair is suitable for doing mating assays.

3.1.2 Selection of rifampicin-streptomycin resistant recipient cells (optional)

1. Inoculate recipient strain(s) in a 50-mL tube containing BHI broth and incubate at 37°C overnight (*see Note 1*).

2. Centrifuge 50-mL overnight culture 4,500 x g for 10 min and concentrate cells 100-fold in BHI broth.

3. Prepare serial ten-fold dilutions of the stationary phase culture in 0.9% NaCl solution. Plate 150 µL of the concentrated cells suspension and 10⁻⁶ to 10⁻⁸ dilutions on three selective (rifampicin 25, 50 and 100 mg/L) and non-selective BHI plates, respectively (*see Note 5*).

4. Incubate plates at 37°C in anaerobic conditions overnight.

5. Inoculate three rifampicin-resistant (Rif^R) colonies in three separate sterile tubes containing 1 mL of BHI selective broth (at the same rifampicin concentration) and incubate at 37°C overnight. Store an aliquot of each culture at -80°C in BHI 15% (w/v) glycerol.

6. Repeat steps 1 to 3 until obtaining clones on the plates with the highest antibiotic concentration (*see Note 6*).

7. Repeat steps 1 to 6 with the three different Rif^R clones by plating on selective plates containing streptomycin (50, 100 and 250 mg/L). Store an aliquot of three different Rif^R Str^R cultures at -80°C in BHI 15% (w/v) glycerol (*see Note 7*).

3.2 Detection of the MGE(s) and excision tests

3.2.1 Detection of the MGE(s) by PCR

1. Perform PCR under standard conditions i.e. 25 µL final volume, containing 1-100 ng of DNA template, 2.5 U of Taq DNA polymerase, 1X buffer, 0.2 mM deoxynucleoside triphosphates and 0.2 µM of each pair of primers. Pairs of primers are: (i) primers 1-2 (*attLMGE*) and 3-4 (*attRMGE*) in the case of a sole MGE (Figure 1A); or (ii) primers 1-2 (*attLMGE1*), 3-4 (junction between MGEs) and 5-6 (*attRMGE2*) in the case of elements in tandem (Figure 1B); or (iii) primers 1-2 (*attLHost*), 3-4 and 5-6 (junctions host-guest) and primers 7-8 (*attRHost*) in the case of nested elements (Figure 1C) (*see Note 8*).

To enable the detection of the MGE(s) in transconjugants (*see 3.3.3 part below*), it is necessary to confirm the absence of the genetic element in recipient strain(s) (i.e. presence of an empty *attB* site). Primers that are used to detect an empty *attB* site are: (i) 1-4 in the case of a sole MGE (Figure 1A), or (ii) primers 1-6 in the case of elements in tandem (Figure 1B) or (iii) primers 1-8 in the case of nested elements (Figure 1C).

2. Use standard PCR conditions for amplification: 5 min at 94 °C, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 sec and annealing at 52 °C for 30 sec and extension at 72 °C for 90 sec, followed by a 10 min final extension step at 72 °C.

3. Analyze PCR products by electrophoresis in a 1.5% (w/v) agarose gel with Tris-borate-EDTA (TBE) buffer, followed by staining with ethidium bromide (0.0001%) and visualization under UV light.

3.2.2 Excision tests by PCR

1. Perform PCR under standard conditions as described above. Primers pairs are: (i) primers 2-3 (*attIMGE*) and primers 1-4 (*attB*) in the case of a sole MGE (Figure 1A); or (ii) primers 2-3 (*attIMGE1*), 4-5 (*attIMGE2*) and 2-5 (*attITandem*) for *attI* sites, and primers 1-4, 3-6 and 1-6 for empty sites in the case of elements in tandem (Figure 1B); or (iii) primers 2-7 (*attIMGE3*) and 4-5

(*attI_{Guest}*) for *attI* sites, and primers 3-6 and 1-8 for empty sites in the case of nested elements (Figure 1C).

2. Use standard PCR conditions for amplification as described above.
3. Analyze PCR products by electrophoresis followed by staining as described above. Amplification products for *attI* (characteristic of a circular intermediate) and *attB* (empty site following excision of the MGE) should be observed. PCR products should be purified on gel and sequenced to confirm their specificity.

3.3 Transfer experiments

The mating assays method has been adapted from the one described by Bellanger *et al.* [22].

3.3.1 Mating assays between donors and recipients

1. Inoculate donor and recipient strain(s) in a 5-mL tube containing BHI broth and incubate overnight at 37°C under antibiotic selective pressure (*see Note 1*).
2. Dilute 100-fold in 37°C-pre-warmed 50-mL BHI broth and incubate at 37°C until optical density at 600 nm reaches 0.4.
3. Mix the donor and recipient strains at a 1:1 ratio (15-mL each) in a 50-mL Falcon tube.
4. Place a nitrocellulose membrane filter onto a soft-agar BHI 40-mL plate, dry 15 min. without cover under a hood, and pre-warm in a 37°C incubator.
5. Centrifuge the strain cultures 4,500 x g for 10 min in a 37°C pre-warmed centrifuge and concentrate cells 30-fold in BHI broth.
6. Spread 150 µL of mixture gently onto the filter with a Drigalski spreader and incubate at 37°C overnight.
7. Take the filter with sterilized tweezers, and displace it in a 50-mL Falcon tube containing 10 mL of 0.9% NaCl solution. Vortex 30 sec at maximum speed.
8. Prepare serial ten-fold dilutions of this cell suspension in 0.9% NaCl solution up to 10⁻⁶ dilutions, vortex and change pipet tips at each dilution.
9. Plate 100 µL of the 10-fold concentrated, undiluted and diluted suspensions on BHI plates supplemented with the suitable antibiotics, i.e. selective(s) marker “x” for MGE in donor (10⁻⁴ to 10⁻⁶ dilutions), selective(s) marker “y” for recipient (10⁻⁴ to 10⁻⁶ dilutions), and antibiotic “x”

+ antibiotic “y” for transconjugant selection (10-fold concentrated, 10^0 and 10^{-1} dilutions) (*see Note 9*).

10. Incubate plates at 37°C in anaerobic conditions during 24-48 h (*see Notes 10 and 11*).

3.3.2 Estimation of the frequency of transconjugant appearance.

We estimate the frequency of transconjugant appearance by calculating the end-point fraction of transconjugants (ratio of CFU TC per donor cells or per recipient cells if the viability of the donor cells has been affected during the mating experiment). Three biological replicates are counted (each with three agar plate replicates). The drawback with this population density-based method is that the measure will be a function of the initial population density, the initial donor to recipient ratio and the duration of the mating experiment. Comparisons with other assays carried in other experimental conditions where the growth rate of the strains differs are not possible. In particular care should be taken when evaluating the effect of a treatment on conjugation if this treatment affects the growth rate of the strains. Other methods based on population dynamics take into account the initial population density and the mating population growth rate and can distinguish transconjugants that appeared after horizontal transfer of the MGE from those resulting from vertical transmission of the conjugative element [23, 24]. The most recently described method [24] considers the differences in growth rates between strains (donor, recipient and transconjugants) and the differences between transfer rates from initial donors and from transconjugants (secondary transfer). In principle, these population dynamics-based methods are not suitable for transfer occurring on solid matrix since they describe conjugation by mass action kinetics thus assuming well-mixed populations. In addition, they also assume that conjugation is not dependent on cell density and that there is no induction of conjugation in stationary phase.

3.3.3 Confirmation of transconjugants by PCR

1. Inoculate colonies of putative transconjugants in BHI medium supplemented with antibiotic “x” (selective marker(s) for the MGE) + antibiotic “y” (selective marker(s) for recipient strain) (*see Note 9*). As controls, inoculate a clone from plate with antibiotic “x” (donor) and a clone from plate with antibiotic “y” (recipient) in BHI medium supplemented with the appropriate antibiotic (*see Note 12*). Incubate overnight at 37°C.
2. Perform PCR under standard conditions (as described above) using 1 µL of the BHI liquid culture as template and primers specific of *attR_{MGE}* for MGE(s) detection (as the sequence is more conserved between strains) and primers described by Okura et al. [18] for typing of capsular polysaccharide synthesis genes in *S. suis* (if donor and recipient strains do not belong to the same serotype).
3. Use standard PCR conditions for amplification as described above.
4. Analyze the PCR products by electrophoresis as described in paragraph 3.2. An amplification product characteristic of the recipient strain and a PCR product indicating the presence of the MGE should be obtained for the transconjugants.

4. Notes

1. Do not shake the bacterial cultures and keep less than 1:10 empty volume in tubes.
2. Small petri plates (54 mm) need a small base layer of BHI agar medium (5-mL). The small volume of molten soft-agar BHI (2-mL) is added to the bacterial dilution at a temperature just above the point where the agar will solidify. A same experiment could be done with medium petri dishes (83 mm) with 20-mL base BHI agar medium, 5-mL of molten-soft-agar BHI and 10-100 CFU.
3. If the cultures are left in stationary phase for too long, the cells form aggregates and the mat formed will not be homogeneous, making it difficult to identify zones of growth inhibition. The top layer should contain 10^7 CFU of the indicator strain.
4. For the middle layer, the majority of colonies are embedded in the agar but few are on surface and will be spread if the top layer is swirled too vigorously.
5. As the frequency of appearance of *rpoB* or *rpsL* mutants is about 10^{-9} , make sure that the density of cells, spread on selective plates, is sufficient.

6. It is possible to obtain clones of *S. suis* resistant to a high concentration of rifampicin or streptomycin using a single step.
7. Mutations in the *rpoB* and *rpsL* genes can impact the growth of the bacterial cells. Therefore, it is necessary to stock 3 independent Rif^R-Strep^R clones and estimate, with a competition experiment against the parental strain, if the mutations strongly affect the growth [25]. Select the clone with the optimal growth to be used as a recipient strain for mating assay experiments.
8. Primer design. Each *attL* and *attR* loci are targeted with a Forward and Reverse primers, designed to produce an amplicon length between 500 and 1200 bp, with T_m 52-60°C. Each primer should generate an amplicon of length comprised between 500 and 1200 bp when associated with the second primer (to detect the *attB* or *attI* site).
9. The selectivity of the plates can be tested with the cultures inoculated in step 1. Spot 10 μ L of 10⁰ and 10⁻² cultures to ensure that the strains will grow properly due to their antibiotic susceptibility/resistance, especially for antibiotic “x” + antibiotic “y” plates. For transconjugants do not use more than three antibiotics in solid or liquid cultures at selective concentrations.
10. After an incubation period of 48 h, the probability of false-positive transconjugants increases.
11. To prove that an MGE transfers autonomously by conjugation (i.e. is an ICE and did not transfer by mobilization mediated by another conjugative element present in the donor) supplementary transfer experiments need to be carried out using transconjugants as donor (retransfer experiments). Suitable recipient cells with a different resistance pattern should be used. Since it can be difficult to find suitable *S. suis* recipient strains due to the high prevalence of multiresistance in this species, another species can be used (*S. thermophilus* for example which has already been used successfully in mating experiments with *S. suis* [9]).
12. Clones can be inoculated in small volumes of selective BHI medium. i.e. in 96-wells plates filled with a 200- μ L volume (sufficient for PCR screening) to use less material.

References

1. Dechêne-Tempier M, Marois-Créhan C, Libante V, et al (2021) Update on the Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Mobile Resistome in the Emerging Zoonotic Pathogen *Streptococcus suis*. *Microorganisms* 9:1765. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081765>
2. Uruén C, García C, Fraile L, et al (2022) How *Streptococcus suis* escapes antibiotic treatments. *Vet Res* 53:91. <https://doi.org/10.1186/s13567-022-01111-3>
3. Wang J, Qi K, Bai X, et al (2022) Characterization of integrative and conjugative elements carrying antibiotic resistance genes of *Streptococcus suis* isolated in China. *Front Microbiol* 13:1074844. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1074844>
4. Bellanger X, Payot S, Leblond-Bourget N, Guédon G (2014) Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiol Rev* 38:720–760. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12058>
5. Grohmann E, Christie PJ, Waksman G, Backert S (2018) Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria: Type IV secretion. *Mol Microbiol* 107:455–471. <https://doi.org/10.1111/mmi.13896>
6. Costa TRD, Harb L, Khara P, et al (2021) Type IV secretion systems: Advances in structure, function, and activation. *Mol Microbiol* 115:436–452. <https://doi.org/10.1111/mmi.14670>
7. Guédon G, Libante V, Coluzzi C, et al (2017) The Obscure World of Integrative and Mobilizable Elements, Highly Widespread Elements that Pirate Bacterial Conjugative Systems. *Genes* 8:337. <https://doi.org/10.3390/genes8110337>
8. Coluzzi C, Guédon G, Devignes M-D, et al (2017) A Glimpse into the World of Integrative and Mobilizable Elements in Streptococci Reveals an Unexpected Diversity and Novel Families of Mobilization Proteins. *Front Microbiol* 8:443. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00443>
9. Libante V, Nombre Y, Coluzzi C, et al (2019) Chromosomal Conjugative and Mobilizable Elements in *Streptococcus suis*: Major Actors in the Spreading of Antimicrobial Resistance and Bacteriocin Synthesis Genes. *Pathogens* 9:22. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010022>

10. Lao J, Lacroix T, Guédon G, et al (2022) ICEscreen: a tool to detect Firmicute ICEs and IMEs, isolated or enclosed in composite structures. *NAR Genom Bioinform* 4:lqac079. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqac079>
11. Toomey N, Monaghan Á, Fanning S, Bolton DJ (2009) Assessment of horizontal gene transfer in Lactic acid bacteria – A comparison of mating techniques with a view to optimising conjugation conditions. *J Microbiol Meth* 77:23–28. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.12.002>
12. Sørensen SJ, Bailey M, Hansen LH, et al (2005) Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat Rev Microbiol* 3:700–710. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1232>
13. Haenni M, Saras E, Bertin S, 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.00805-10>
14. Sun Y, Veseli IA, Vaillancourt K, et al (2019) The bacteriocin from the prophylactic candidate *Streptococcus suis* 90-1330 is widely distributed across *S. suis* isolates and appears encoded in an integrative and conjugative element. *PLoS ONE* 14:e0216002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216002>
15. Sørensen SJ, Bailey M, Hansen LH, et al (2005) Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat Rev Microbiol* 3:700–710. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1232>
16. Delavat F, Moritz R, van der Meer JR (2019) Transient Replication in Specialized Cells Favors Transfer of an Integrative and Conjugative Element. *mBio* 10:e01133-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01133-19>
17. Babic A, Berkmen MB, Lee CA, Grossman AD (2011) Efficient Gene Transfer in Bacterial Cell Chains. *mBio* 2:e00027-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00027-11>
18. Okura M, Lachance C, Osaki M, et al (2014) Development of a Two-Step Multiplex PCR Assay for Typing of Capsular Polysaccharide Synthesis Gene Clusters of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 52:1714–1719. <https://doi.org/10.1128/JCM.03411-13>
19. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2023) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0

20. Ambroset C, Coluzzi C, Guédon G, et al (2016) New Insights into the Classification and Integration Specificity of Streptococcus Integrative Conjugative Elements through Extensive Genome Exploration. *Front Microbiol* 6:1483. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01483>
21. Fontaine L, Hols P (2008) The Inhibitory Spectrum of Thermophilin 9 from *Streptococcus thermophilus* LMD-9 Depends on the Production of Multiple Peptides and the Activity of BlpG_{St}, a Thiol-Disulfide Oxidase. *Appl Environ Microbiol* 74:1102–1110. <https://doi.org/10.1128/AEM.02030-07>
22. Bellanger X, Roberts AP, Morel C, et al (2009) Conjugative Transfer of the Integrative Conjugative Elements ICESt1 and ICESt3 from *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 191:2764–2775. <https://doi.org/10.1128/JB.01412-08>
23. Simonsen L, Gordon DM, Stewart FM, Levin BR (1990) Estimating the rate of plasmid transfer: an end-point method. *J Gen Microbiol* 136:2319–2325. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-11-2319>
24. Huisman JS, Benz F, Duxbury SJN, et al (2022) Estimating plasmid conjugation rates: A new computational tool and a critical comparison of methods. *Plasmid* 121:102627. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2022.102627>
25. DelaFuente J, Rodriguez-Beltran J, San Millan A (2020) Methods to study fitness and compensatory adaptation in plasmid-carrying bacteria. In: *Horizontal Gene Transfer*. Springer, pp 371–382

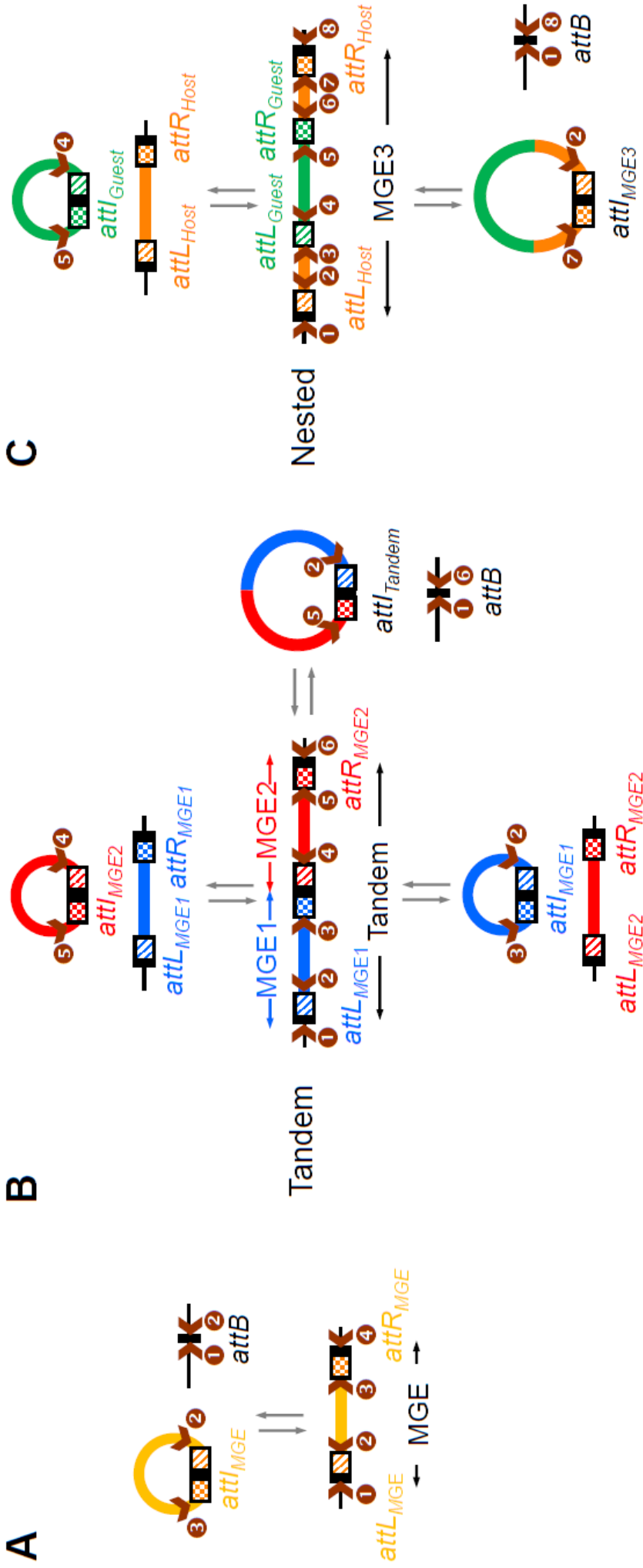


Figure 1: Schematic representation of the different organizations of Mobile Genetic Elements (MGEs) integrated in the chromosome.

(A) Isolated MGE. The MGE is delimited by left and right attachment sites (*attL_{MGE}* and *attR_{MGE}* respectively) at its integration site. The excised MGE adopts a circular form with a characteristic *attL_{MGE}* site. Excision generates an empty chromosomal bacterial site (*attB*).

(B) Composite tandem elements. When MGE1 and MGE2 are integrated at the same chromosomal site, the composite element is delimited by MGE1 *attL* and MGE2 *attR* sites (*attL_{MGE1}* and *attR_{MGE2}* respectively). Each MGE can excise separately or as a tandem element, generating different combinations of *attL*, *attR* and *attB* sites (*attL_{MGE1}* and *attL_{MGE2}* or *attL_{MGE2}* and *attL_{MGE1}* or *attL_{Tandem}* and *attB* sites if MGE1, MGE2 or the tandem excise respectively).

(C) Composite nested element. When an MGE (ICE or IME, called "Guest"), delimited by left and right attachment sites (*attL_{Guest}* and *attR_{Guest}* respectively) integrates in another MGE, this generates a nested element (called MGE3 on the figure) delimited by left and right attachment sites of the "host" element (*attL_{MGE_{Host}}* and *attR_{MGE_{Host}}* respectively). When it excises, the guest MGE adopts a circular form carrying an *attL_{Guest}* site and the initial host element is restored. The full composite element, MGE3, can also excise as a circular form carrying an *attL_{MGE3}* site. This generates an empty chromosomal bacterial site (*attB*).

Boundaries of the elements (attachment sites *att*) are shown as rectangles: yellow for the isolated MGE, blue and red for the MGEs in tandem (MGE1 and MGE2 respectively), orange and green for the nested MGEs (Host and Guest respectively). Black rectangle stands for the identical short sequence belonging to the *attB*, *attL*, *attR* and *attI* sites. The horizontal black arrows below the elements delineate MGEs. The double vertical gray arrows indicate the reversible integration/excision of MGEs. The brown chevrons with numbers indicate the position of the various primers used for the detection of the *att* sites by PCR.

Annexe 5 : Analyse in silico et test expérimental de production de bactériocines

| Souche | AOI (Areas of Interest) identifiées avec BAGEL4 | Production de bactériocine |
|---------------|--|-----------------------------------|
| 106 | Nd | - |
| 109 | Streptococcin A-FF22 | Oui |
| 150 | Streptococcin A-FF22 | - |
| 277 | Sactipeptides | - |
| 281 | Sactipeptides, Nisin U | - |
| 430 | BlpJ | Oui |
| 434 | Nisin U, Lacticin Q, BlpU | - |
| 440 | Nd | - |
| 443 | Lacticin Q, Nisin U, BlpU | - |
| 450 | Sactipeptides, Lactocillin, Lactococcin 972 (Lcn972), Nisin U | - |
| 488 | BlpD | - |
| 545 | Lactococcin 972 (Lcn972) | - |
| 548 | Streptococcin A-FF22 | - |
| 561 | Nd | - |
| 568 | Nd | - |
| 1027 | Sactipeptides, Nisin U | - |
| 1034 | LAPs | - |
| 1038 | BlpU, Lacticin Q, Nisin U | - |
| 1102 | BhtA1 | - |
| 1105 | Lactococcin 972 (Lcn972), Streptococcin A-FF22 | - |
| 1108 | Sactipeptides, LichenicidinVK21A1 (Lichenicidin A1), Nisin U | - |
| 1111 | BlpM | - |
| 1218 | Sactipeptides, Pneumolancidin | - |
| 1221 | Sactipeptides, Nisin U, | - |
| 1222 | Nisin U, Sactipeptides | - |
| 1285 | Sactipeptides, Lactococcin 972 (Lcn972) | - |
| 1333 | Lactococcin 972 (Lcn972), Salivaricin 9 | - |
| 1400 | Streptococcin A-FF22, Lanthipeptide class II, Lactococcin 972 (Lcn972), Pneumolancidin, BlpJ, Lactococcin 972 (Lcn972) | - |
| 1452 | Sactipeptides, Lanthipeptide class IV | - |
| 1476 | Sactipeptides, Streptococcin A-FF22 | - |
| 1477 | Sactipeptides | - |
| 1492 | Nd | - |
| 1503 | Streptococcin A-FF22 | - |
| 1509 | Nd | - |
| 1527 | Nd | Oui |
| 1531 | Lactococcin 972 (Lcn972) | - |
| 1534 | Sactipeptides, carnolysins | - |

| | | |
|--------|---------------------------|-----|
| 1537 | Nd | - |
| 1540 | Nd | - |
| 1548 | Nd | - |
| 1552 | Carnolysins | - |
| 1557 | Nd | - |
| 1564 | Sactipeptides | - |
| 1567 | Nd | - |
| 1575 | Nd | - |
| 1584 | Streptococcin A-FF22 | - |
| 1595 | Lactococcin 972 (Lcn972) | - |
| 1597 | Lactococcin 972 (Lcn972) | Oui |
| 1600 | Nd | - |
| 1601 | Nd | - |
| 1607 | Lacticin Q, BlpU, Nisin U | - |
| NSUI86 | Streptococcin A-FF22 | Oui |
| NSUI88 | Streptococcin A-FF22 | - |

Souches de *S. suis* de la collection (n° souche en première colone), résultat d'analyse BAGEL4 avec nom de la bactériocine prédite. La présence d'une zone d'inhibition de croissance de la souche indicatrice (permettant d'envisager une production de bactériocines) sont surlignées en jaune et noté Oui dans la dernière colone. Les «->» signalent les souches pour lesquelles il n'y a pas de zone d'inhibition de croissance. Nd : Non déterminé.

Annexe 6 Réaction PCR

Composition du mix (μ l)

| | C1 | n=1 |
|------------------|--------------|------|
| H ₂ O | | 13,9 |
| matrice ADN | 1ng/ μ L | 1 |
| Tampon | 10X | 2 |
| dNTP | 2,5 mM | 2 |
| amorces 01 | 20 mM | 0,5 |
| amorces 02 | 20 mM | 0,5 |
| dream taq | 1,25u | 0,1 |

Annexe 10 Conditions de la PCR :

| Étapes | T°C | Temps (min) | n cycles |
|-----------------------|-------|-------------|----------|
| Dénaturation initiale | 95 | 03:00 | 1 |
| Dénaturation | 95 | 00:30 | 34 |
| Hybridation | 52-55 | 00:30 | |
| Élongation | 72 | 01:30 | |
| Élongation finale | 72 | 05:00 | 1 |

Annexe 7 : Liste des différentes amorces utilisées lors des tests d'excision et des vérifications de transconjugants putatifs.

| N°oligo | Nom oligo | Séquence de l'oligo(5'-3') | Taille pb |
|---------|---------------------|----------------------------|-----------|
| 34 | ICENemrplL4 | CATGCTGATAAATCAACAACACT | 21 |
| 886 | 86attNestF | CTCCTATCACTGGGTAAA | 18 |
| 864 | SNF2_NSUI084_Rev | ATTCTCATGGCTTCTACT | 18 |
| 866 | PPIso_NSUI086_Rev | GGAAGCAAATCAGAATAAAG | 20 |
| 875 | TetO_NSUI084_Fwd | CTATCACTGGGTAAATAACT | 20 |
| 863 | SerRec_NSUI084_Rev | TGTCGGTGAATTACATATC | 19 |
| 865 | CDS_689_NSUI086_Fwd | CCAGTTCAAGATAGGATA | 19 |
| 1581 | SNF2_29F | TGAAAAAGGTGGAACGGGTC | 20 |
| 1361 | IMEPPI_165_attRR | AGAAAGGTCAATAGCGGAGAAG | 22 |
| 327 | tetO Fwd | AACTTAGGCATCTGGCTCAC | 21 |
| 328 | tetO Rev | TCCCACTGTCCATATCGTCA | 21 |
| 1834 | 1492PPlattRR_2 | CATACCCTCTATGAGCCTTTC | 21 |
| 858 | CDS_603_NSUI084_Fwd | TTCATGTCTTTCTCCTAATC | 20 |
| 859 | CDS_604_NSUI084_Rev | AACACTTCATGTCCAATC | 18 |
| 866 | PPIso_NSUI086_Rev | GGAAGCAAATCAGAATAAAG | 20 |
| 889 | 84NestLIMER | GAAGAATGGGAAGTGATAC | 19 |
| 865 | CDS_689_NSUI086_Fwd | CCAGTTCAAGATAGGATA | 19 |
| 863 | SerRec_NSUI084_Rev | TGTCGGTGAATTACATATC | 19 |
| 878 | CDS_739_NSUI032_Fwd | GTGATGATGTTCTCTTTT | 20 |
| 879 | rumA_NSUI032_Rev | TGATGCCTATTCAGGTATT | 19 |
| 859 | CDS_604_NSUI084_Rev | AACACTTCATGTCCAATC | 18 |
| 507 | RpILF | CTGAAGAAATCAAAGCTAAA | 20 |
| 501 | rpmGF | GGTGAACGCTTGACCTTACT | 21 |
| 567 | MEGA orf7 fwd | CCAGAGCGTTACAGTCTATG | 20 |
| 876 | CDS_263_NSUI032_Fwd | CGCAAACACTGATTCACATAA | 19 |
| 877 | Ser_rec_NSUI032_Rev | AGACAACACACATAGAAGT | 19 |
| 1842 | ICEtRNALysattRR | CCAAGGAATACGGAAATG | 18 |
| 1843 | ICEtRNALysattRF | GTGTAGTTTTCGATGTAG | 18 |
| 1844 | ICEtRNALysattLR | ACTACGCTCAACATCTAT | 18 |
| 1845 | ICEtRNALysattLF | ACTTGGACCGTTTCTTCTC | 19 |
| 1846 | ICEmutTattLF | GTAAGTCATAGGCCAAATC | 19 |
| 1847 | ICEmutTattLR | TTCAGGACTACAAGGATAG | 19 |
| 1848 | ICEmutTattRF | CTAGATGAGTTGCTTTCTC | 19 |
| 1849 | ICEmutTattRR | ATGAATTGGTACAGGATAAG | 20 |
| 1850 | 1534Tn5252ADPattLF | CAAGGAGACGACATAGAA | 18 |
| 1851 | 1534Tn5252ADPattLR | CAAGGAGACGACATAGAA | 18 |
| 1829 | 1492Tn5252attRF | TTGTTGGTGGAGTTAATAG | 19 |
| 1830 | 1492PPlattLR_2 | GCACTCATAGACAAGATAC | 19 |
| 1827 | 1492Tn1549attLR | TAGCCAAGACAGGATTAG | 18 |
| 1828 | 1492Tn1549attLF | GGACGGAGATAAGGTATT | 18 |
| 1837 | 1531Tn1549attRF | AGCGTTATCGTGCAGATTTA | 20 |
| 1852 | 1534Tn5252ADPattRR | ACCTGGAATGGATGTATG | 18 |
| 1859 | TnGBS2attLF | CGGTTTATTAGGTGTTCTT | 19 |
| 1857 | TnGBS2attRF | GGCTGATACAAGGAATAAA | 19 |
| 1856 | TnGBS2attRR | TCTTCAATACGATCCAATAC | 20 |
| 1858 | TnGBS2attLR | GGGACTGAGTGTATGTAT | 18 |
| 1831 | 1492PPlattLF_2 | CTCTCAGCCACATCTAA | 17 |
| 1838 | 1531IMEGuaAattLF | GCATGGAAACCAGATTAG | 18 |
| 1839 | 1531IMEGuaAattLR | CTCAAATAGGACTTGGTAAA | 20 |
| 1840 | 1531IMEGuaAattRF | GATACCAGGCAATCAATTA | 19 |
| 1841 | 1531IMEGuaAattRR | GTGTCATGGGTGAAATCAC | 19 |

| | | | |
|------|---------------------|---------------------------|----|
| 1389 | IMEPPI_165_attLF | CCCAGCTTCAGCACGATTAT | 20 |
| 1835 | 1531Tn1549attLF | TGCTCTTTCCCAATCACTCA | 20 |
| 1836 | 1531Tn1549attLR | CTCATATCCAAGCCTAAAG | 19 |
| 1861 | 1492Tn1549attRR | ACTTAGGCCAGAGAATAC | 18 |
| 1862 | 1492Tn1549attRF | GAAAGTTATGCACCTAGAC | 19 |
| 1580 | SNF2_84F | TGAAAAAGGTGGAACAGGAT | 20 |
| 1505 | ermBmut165_2 | TGAGTACTTTTTCACTCGTTAA | 22 |
| 1412 | DeltaRel_IMESNF2_2 | ATGAAGAAACAGGATTTAAGGTGT | 25 |
| 488 | T93_1475_1_rev | AGTACGCAGATACAAATGC | 19 |
| 876 | CDS_263_NSUI032_Fwd | CGCAAACCTGATTCACATAA | 19 |
| 2237 | 1285XRELF | GATGACTTAGCAGAGAACTCT | 22 |
| 2238 | 1285XRELR | GTTATAGAAACGACAACCTATTCTA | 25 |
| 2239 | 1285XRERF | GGAACAGGAAGTGGAAATC | 19 |
| 2240 | 1285XRERR | CCGACGTTTGATCAATAG | 19 |
| 2279 | 440Tn5252mutTLF | AAGGGCTGCATAATCCCC | 18 |
| 2280 | 440Tn5252mutTLR | GGAACATGAGTCTAGTTCCAATC | 23 |
| 2281 | 488Tn5252mutTLF | CAAGTACATGGGAGGTTAGA | 20 |
| 2282 | 488Tn5252mutTLR | CGTGACGATGAAACGAAAG | 19 |
| 2283 | 488Tn5252mutTRF | GTCGGATAGATAGAATAGAAGAGGC | 25 |
| 2284 | 548Tn916_LF | CGGCTAACTGTCTTATCAAG | 20 |
| 2285 | 548Tn916_LR | CTCACAGTACAAGCCACTCTCTAAT | 25 |
| 2286 | 548Tn916_RF | CCACACATCACTCCACATAG | 20 |
| 2287 | 548Tn916_RR | GGACGAACCTTGATTAGAC | 19 |
| 2288 | 568Tn5252muTRF | ACCTTGACCTGATAACCG | 18 |
| 2289 | 568Tn5252muTRR | GGAGTTGATGGAGTCAGAA | 19 |
| 2234 | 450TnrumA_F | GCTAGAGAAAGCTGAGAGAAA | 21 |
| 2235 | 1034TnmutT_LF | CGATAATGGTCAGTAGGATCC | 21 |
| 2236 | 1034TnmutT_RR | GGTCAGCAGGTATTAGTTCA | 20 |
| 2321 | 1285_tRNALysattRR | CCCAGAAGCAACTAAGTTAGAA | 22 |
| 2322 | 1285_tRNALysattRF | TTAGAGAAGTGTGAATACTGGA | 23 |
| 2323 | 1285_tRNALysattLF | AAAGTCAAACCGCAATAAACA | 21 |
| 2324 | 1285_tRNALysattLR | CTCTTATCCAGCCCTAAAGA | 20 |
| 2333 | 1531guaANest1 | ACAGATTTCGCTTTGATAAGC | 20 |
| 2334 | 1531guaANest2 | CGACTGGTATTCGAGTTAATG | 21 |
| 2335 | 1531guaANest3 | CGAAACAACGAACTGAATAAAGA | 23 |
| 2336 | 1531guaANest4 | TGCAGAGACAATCAAATCTCA | 21 |
| 768 | cse | CTGTAGTAGCAGAATCTAAC | 20 |
| 769 | cse | GCACTAGCAATCCAGTCTT | 19 |
| 511 | ITS | TTGTACACACCGCCCGTCA | 19 |
| 881 | ITS | AGCTACTTAGATGTTTCAGTTC | 30 |
| 1915 | okuraS2_F | TCAAAATACGCACCTAAGGC | 20 |
| 1916 | okuraS2_R | CACTCACCTGCCCAAGAC | 19 |
| 1942 | okuraS9_R1 | GGACCAACAATGGCCATCTC | 20 |
| 1943 | okuraS9_F2 | GACGCACCAAGTGATATGCC | 20 |

Abstract

The increase in bacterial resistance to antibiotics is a major public health issue. This phenomenon is part of the "One Health" approach, which interconnects human, animal and environmental health. In this context, the study of *Streptococcus suis*, an animal pathogenic and zoonotic bacterium with a high rate of resistance to certain antibiotics, is particularly relevant. Indeed, certain serotypes are regularly responsible for fatal epidemics in Asia. In Europe, *S. suis* causes major economic losses on pig farms and sporadic human infections. Analysis of North American and Asian strains has revealed that the genes involved in antibiotic resistance are located on mobile genetic elements (MGEs), particularly on ICEs and IMEs, which are integrated into the host bacterial genome but, after excision, can be transferred via a conjugation pore. ICEs are autonomous and can act as "helper" elements by transferring non-autonomous elements: IME. The presence of antibiotic resistance genes on such elements represents a major risk of propagation, but these EGMs are still under-researched due to their complex identification. In France, antibiotic resistance in bacteria isolated from sick animals (including *S. suis* in pigs) is monitored by the Résapath network. To complement these data, the aim of my thesis was to determine the level of antibiotic resistance within a more diversified collection of *S. suis* strains, to study the genomic location of the genes responsible for this resistance and thus assess the risk of dissemination.

Our approach was to: (1) compile a collection of 200 strains representative of those present in mainland France, according to their : serotypes, sites of isolation, enabling us to define three pathotypes (pathogenic, non-clinical and respiratory), period of isolation (before or after the EcoAntibio plan), host (pigs, humans, wild boar) and geographical regions of isolation (half in Brittany, a region with a high density of livestock); (2) perform antibiograms of strains against 22 antibiotics used in veterinary and/or human medicine; (3) sequence 102 selected strains according to their resistance profiles; (4) assemble and annotate genomes, then locate antibiotic resistance, virulence and competence genes, as well as ICEs and IMEs.

Our analyses showed that 86% of strains were resistant to at least one antibiotic, with a low rate of resistance to fluoroquinolones, penicillins, pleuromutilin and diaminopyrimidine-sulfonamides, and a very high rate for macrolides-lincosamides and tetracycline. Multidrug resistance profiles were observed in 138 strains, in line with European data. The search for antibiotic resistance genes in *S. suis* genomes revealed a decrease in their frequency in strains

isolated after the EcoAntibio Plan, and a statistically higher number of antibiotic resistance genes in non-clinical strains. What's more, most of these genes (n=217) are located on ICE/IMEs. More than half the strains carry an IME containing tetracycline and macrolide-lincosamide resistance genes, inserted in a Tn5252 ICE family. Thus, *S. suis* probably has a high potential for spreading antibiotic resistance genes. Penicillin resistance accounted for 5% of the collection analyzed. Any spread of this resistance would be a cause for concern, given the importance of β -lactamines in the treatment of *S. suis* infections in both veterinary and human medicine. Our results are complementary to those of the Résapath network, and demonstrate the value of studying strains of serotypes less frequently implicated in pathological cases or carriage strains, in order to improve monitoring of antibiotic resistance in France.

Keywords: *Streptococcus suis*, antibiotic resistance, pathogen, horizontal gene transfer, integrative conjugative element, ICE, integrative mobilizable element, IME.

Résumé grand public :

La lutte contre la dissémination de la résistance bactérienne aux antibiotiques est emblématique de l'approche « One Health », illustrant l'interconnexion des santés humaine, animale et environnementale. Ma thèse a pour objet l'étude de l'antibiorésistance de *Streptococcus suis* et des gènes impliqués. En Asie, cette bactérie pathogène pour le porc est régulièrement responsable d'épidémies mortelles pour l'Homme. En Europe, elle cause d'importantes pertes économiques dans les élevages porcins et des infections humaines sporadiques post-contacts avec des sangliers ou des porcs d'élevage. Mes travaux ont permis d'établir un état des lieux du niveau d'antibiorésistance de 200 souches bactériennes françaises isolées de cas humains ou d'animaux malades ou porteurs sains. Le séquençage et l'analyse de 102 génomes a permis de localiser de très nombreux gènes d'antibiorésistance sur des régions mobiles indiquant le potentiel de *S. suis* dans la propagation de ces gènes.

Mots clés : *Streptococcus suis*, résistance aux antibiotiques, pathogène, transfert horizontal de gènes, élément intégratif conjugatif, ICE, élément intégratif mobilisable, IME.

Abstract

The fight against the spread of bacterial resistance to antibiotics is emblematic of the "One Health" approach, illustrating the interconnection between human, animal and environmental health. The aim of my thesis is to study antibiotic resistance in *Streptococcus suis* and the genes involved. In Asia, this bacterium, pathogenic to pigs, is regularly responsible for fatal epidemics in humans. In Europe, it causes major economic losses on pig farms and sporadic human infections following contact with wild boar or farmed pigs. My work has enabled me to draw up an inventory of the level of antibiotic resistance of 200 French bacterial strains isolated from human cases or from sick animals or healthy carriers. Sequencing and analysis of 102 genomes has made it possible to locate a large number of antibiotic resistance genes in mobile regions, indicating the potential of *S. suis* to spread these genes.

Keywords: *Streptococcus suis*, antibiotic resistance, pathogen, horizontal gene transfer, integrative conjugative element, ICE, integrative mobilizable element, IME.

Résumé

L'augmentation de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Ab) est un enjeu majeur de santé publique. Ce phénomène s'inscrit dans l'approche « One Health » qui interconnecte les santés humaines, animale et environnementale. Dans ce cadre, l'étude de *Streptococcus suis*, une bactérie pathogène et zoonotique avec un fort taux de résistance à certains Ab est particulièrement pertinente. En effet, certains sérotypes sont régulièrement responsables d'épidémies mortelles pour l'Homme en Asie. En Europe, *S. suis* cause d'importantes pertes économiques dans les élevages porcins et des infections humaines sporadiques. L'analyse de souches d'Amérique du Nord et d'Asie ont mis en évidence une localisation des gènes impliqués dans l'antibiorésistance (AbR) sur des éléments génétiques mobiles (EGM), particulièrement sur des ICE et IME, éléments qui sont intégrés au génome bactérien hôte mais, après excision, transférables via un pore de conjugaison. Les ICE sont autonomes et peuvent jouer le rôle d'élément "helper" en transférant des éléments non autonomes : les IME. La présence de gènes d'AbR sur de tels éléments constitue un risque important de propagation, mais ces EGM sont encore très peu étudiés en raison de leur identification complexe. En France, la surveillance de l'AbR des bactéries isolées chez les animaux malades (dont *S. suis* chez le porc) est assurée par le réseau Résapath. En complément de ces données, l'objectif de ma thèse était de déterminer le niveau de résistance aux Ab au sein d'une collection plus diversifiée de souches de *S. suis*, d'étudier la localisation génomique des gènes responsables de ces résistances et d'évaluer ainsi le risque de dissémination.

Notre approche a été de : (1) constituer une collection de 200 souches représentatives de celles présentes en France métropolitaine selon leurs : sérotypes, sites d'isolement permettant de définir trois pathotypes (pathogène, non-clinique et respiratoire), période d'isolement (antérieure ou postérieure au plan EcoAntibio), hôte (porcs, Homme, sanglier) et régions géographiques d'isolement (la moitié en Bretagne, région de forte densité d'élevages) ; (2) réaliser les antibiogrammes des souches vis-à-vis de 22 Ab, utilisés en médecine vétérinaire et/ou humaine ; (3) séquencer 102 souches sélectionnées en fonction de leurs profils de résistance ; (4) assembler, annoter les génomes puis localiser les gènes d'AbR, de virulence et de compétence ainsi que les ICE et les IME.

Nos analyses ont montré que 86% des souches étaient résistantes à au moins un Ab avec un faible taux de résistance aux fluoroquinolones, aux pénicillines, à la pleuromutiline et aux diaminopyrimidine-sulfamides, et un taux très élevé pour les macrolides-lincosamides et la tétracycline. Des profils de multirésistance ont été observés dans 138 souches, en cohérence avec les données européennes. La recherche des gènes d'AbR dans les génomes de *S. suis* a mis en évidence une diminution de leurs fréquences chez les souches isolées post-Plan EcoAntibio et un nombre statistiquement plus élevé de gènes d'AbR chez les souches non-cliniques. De plus ces gènes (n=217) sont majoritairement localisés sur des ICE/IME. Plus de la moitié des souches porte un IME, contenant des gènes de résistance à la tétracycline et aux macrolides-lincosamides, inséré dans un ICE de la famille Tn5252. Ainsi, *S. suis* possède probablement un potentiel élevé de propagation des gènes d'AbR.

La résistance aux pénicillines concernait 5% de la collection analysée. Une éventuelle diffusion de cette résistance serait préoccupante en raison de l'importance des β -lactamines dans le traitement des infections à *S. suis*, tant en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine. Nos résultats sont complémentaires de ceux du réseau Résapath et démontrent l'intérêt d'étudier des souches de sérotypes moins fréquemment impliqués dans des cas pathologiques ou des souches de portage afin d'améliorer le suivi de l'antibiorésistance en France.

Mots clés : *Streptococcus suis*, résistance aux antibiotiques, pathogène, transfert horizontal de gènes, élément intégratif conjugatif, ICE, élément intégratif mobilisable, IME.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Résumé

L'augmentation de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Ab) est un enjeu majeur de santé publique. Ce phénomène s'inscrit dans l'approche « One Health » qui interconnecte les santés humaine, animale et environnementale. Dans ce cadre, l'étude de *Streptococcus suis*, une bactérie pathogène et zoonotique avec un fort taux de résistance à certains Ab est particulièrement pertinente. En effet, certains sérotypes sont régulièrement responsables d'épidémies mortelles pour l'Homme en Asie. En Europe, *S. suis* cause d'importantes pertes économiques dans les élevages porcins et des infections humaines sporadiques. L'analyse de souches d'Amérique du Nord et d'Asie ont mis en évidence une localisation des gènes impliqués dans l'antibiorésistance (AbR) sur des éléments génétiques mobiles (EGM), particulièrement sur des ICE et IME, éléments qui sont intégrés au génome bactérien hôte mais, après excision, transférables *via* un pore de conjugaison. Les ICE sont autonomes et peuvent jouer le rôle d'élément "helper" en transférant des éléments non autonomes : les IME. La présence de gènes d'AbR sur de tels éléments constitue un risque important de propagation, mais ces EGM sont encore très peu étudiés en raison de leur identification complexe. En France, la surveillance de l'AbR des bactéries isolées chez les animaux malades (dont *S. suis* chez le porc) est assurée par le réseau Résapath. En complément de ces données, l'objectif de ma thèse était de déterminer le niveau de résistance aux Ab au sein d'une collection plus diversifiée de souches de *S. suis*, d'étudier la localisation génomique des gènes responsables de ces résistances et d'évaluer ainsi le risque de dissémination.

Notre approche a été de : (1) constituer une collection de 200 souches représentatives de celles présentes en France métropolitaine selon leurs : sérotypes, sites d'isolement permettant de définir trois pathotypes (pathogène, non-clinique et respiratoire), période d'isolement (antérieure ou postérieure au plan EcoAntibio), hôte (porcs, Homme, sanglier) et régions géographiques d'isolement (la moitié en Bretagne, région de forte densité d'élevages) ; (2) réaliser les antibiogrammes des souches vis-à-vis de 22 Ab, utilisés en médecine vétérinaire et/ou humaine ; (3) séquencer 102 souches sélectionnées en fonction de leurs profils de résistance ; (4) assembler, annoter les génomes puis localiser les gènes d'AbR, de virulence et de compétence ainsi que les ICE et les IME.

Nos analyses ont montré que 86% des souches étaient résistantes à au moins un Ab avec un faible taux de résistance aux fluoroquinolones, aux pénicillines, à la pleuromutiline et aux diaminopyrimidine-sulfamides, et un taux très élevé pour les macrolides-lincosamides et la tétracycline. Des profils de multirésistance ont été observés dans 138 souches, en cohérence avec les données européennes. La recherche des gènes d'AbR dans les génomes de *S. suis* a mis en évidence une diminution de leurs fréquences chez les souches isolées post-Plan EcoAntibio et un nombre statistiquement plus élevé de gènes d'AbR chez les souches non-cliniques. De plus ces gènes (n=217) sont majoritairement localisés sur des ICE/IME. Plus de la moitié des souches porte un IME, contenant des gènes de résistance à la tétracycline et aux macrolides-lincosamides, inséré dans un ICE de la famille Tn5252. Ainsi, *S. suis* possède probablement un potentiel élevé de propagation des gènes d'AbR.

La résistance aux pénicillines concernait 5% de la collection analysée. Une éventuelle diffusion de cette résistance serait préoccupante en raison de l'importance des β -lactamines dans le traitement des infections à *S. suis*, tant en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine. Nos résultats sont complémentaires de ceux du réseau Résapath et démontrent l'intérêt d'étudier des souches de sérotypes moins fréquemment impliqués dans des cas pathologiques ou des souches de portage afin d'améliorer le suivi de l'antibiorésistance en France.

Mots clés : *Streptococcus suis*, résistance aux antibiotiques, pathogène, transfert horizontale de gène, élément intégratif conjugatif, ICE, élément intégratif mobilisable, IME.