

Thesis, COLLÉGIALITÉ

Auteur : Egrek, Sabrina

Promoteur(s) : Sacheli, Rosalie

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Année académique : 2020-2021

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/12475>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

ÉVALUATION DU SÉQUENÇAGE À HAUT DÉBIT (NGS) COMBINÉ À UN OUTIL BIOINFORMATIQUE POUR LA CARACTÉRISATION COMPLÈTE DE L'INFECTION AU STREPTOCOCCUS AGALACTIAE ET LE REMPLACEMENT DES MÉTHODES ACTUELLEMENT UTILISÉES PAR LE LABORATOIRE

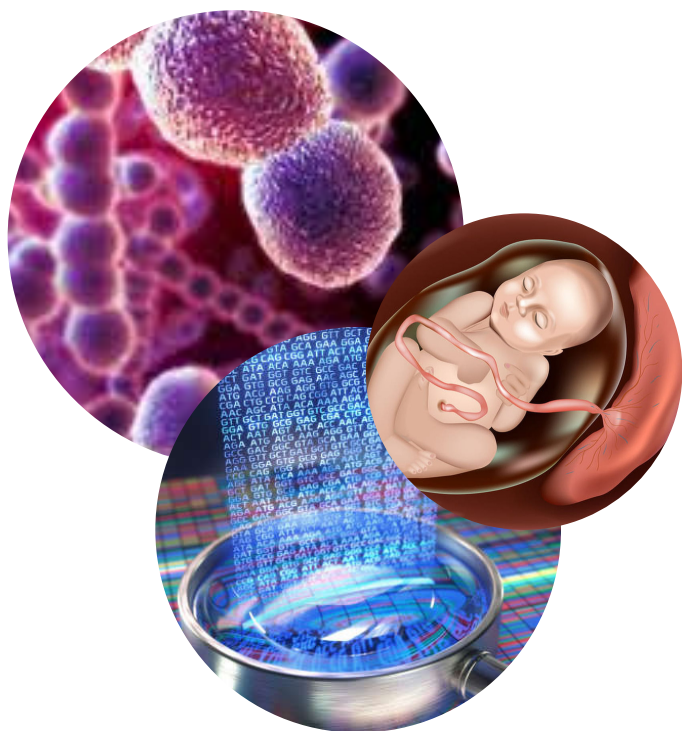
**Mémoire présenté en vue de l'obtention
du grade de Master en Sciences Biomédicales**

SABRINA EGREK

Promotrice : Rosalie Sacheli

Co-promotrice : Marie-Pierre Hayette

Année académique 2020-2021



Remerciements

Par ces quelques lignes, je témoigne toute ma gratitude aux personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration et l'aboutissement de ce travail de fin d'études.

Tout d'abord, merci à Mme **Marie-Pierre Hayette**, chef de service de Microbiologie Clinique du CHU de Liège, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Merci à **Rosalie Sacheli**, sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir. Je la remercie pour ses précisions sur le projet, son encadrement de qualité et sa grande disponibilité. Merci aussi pour son encouragement, ses précieux conseils et les corrections apportées à l'écriture de ce travail.

Merci à **Aymeric Naomé**, **Latifa Karim** et **Emilie Detry**, des collaborateurs de ce projet, de m'avoir consacré de leur temps pour répondre à mes questions.

Merci à toute **l'équipe du laboratoire de Microbiologie Clinique** pour leur bonne humeur, leur gentillesse et leur disponibilité.

Merci à mon ami d'enfance **Rino** pour ses relectures et conseils quant à la rédaction de ce travail.

Merci à **Dominique David** pour son regard aiguisé et sa relecture.

Merci à **Manon**, mon acolyte, d'avoir été présente tout au long de mes études.

Enfin, merci à mes **amis** et ma **famille** pour leur soutien inconditionnel. Je tiens tout particulièrement à remercier mes parents qui, depuis le début, me soutiennent et m'encouragent à donner le meilleur de moi-même.

La table des matières

Remerciements	1
<i>La table des matières</i>	2
Liste des abréviations	5
L'objectif.....	6
La stratégie expérimentale	7
I. L'introduction	8
1. Taxonomie.....	8
1.1. La famille des Streptococcaceae	8
1.2. Le Genre Streptococcus	8
2. L'espèce <i>Streptococcus agalactiae</i>	9
2.1. L'histoire	9
2.2. Généralités.....	10
2.3. Le portage et la transmission	11
3. La virulence	12
3.1. Les étapes de l'infection	12
3.2. Les facteurs de virulence	12
3.2.1. les facteurs de virulence de nature non protéique	13
3.2.2. Les facteurs de virulence de nature protéique	14
3.2.3. Le clone ST-17	17
4. L'infection à streptocoque du groupe B	18
4.1. L'infection du nouveau-né	18
4.2. L'infection de la femme enceinte.....	19
4.3. L'infection de l'adulte	20
4.4. Les facteurs de risque	20
5. Diagnostic, traitements et prévention	21
5.1. Microbiologie clinique : laboratoire de bactériologie	21
5.1.1. Les méthodes de diagnostic.....	21
5.1.1.1. La culture bactérienne	21
5.1.1.2. La spectrométrie de masse Maldi-Tof.....	23
5.1.1.3. Les tests antigéniques.....	23
5.1.1.4. La biologie moléculaire	23
5.2. Microbiologie clinique : Centre National de Référence (CNR)	24
5.3. Les antibiotiques utilisés pour traiter les infections à GBS	25
5.4. Les gènes de résistance.....	25
5.5. Les recommandations préventives pour les nouveau-nés.....	26
5.6. Les recommandations du CDC [83].....	27
5.7. Les recommandations belges.....	27
5.8. La vaccination.....	29
6. Le séquençage du génome	29
6.1. La méthode de Sanger	30
6.2. Le séquençage à haut débit ou Next Generation Sequencing (NGS)	31

II.	Matériel et méthodes	34
1.	Les souches cliniques de <i>Streptococcus agalactiae</i>	34
1.1.	Les caractéristiques des souches	34
1.1.	La mise en culture.....	34
1.1.1.	Mode opératoire.....	35
2.	Les PCR conventionnelles	35
2.1.	L'extraction de l'ADN automatisée	35
2.1.1.	Le principe [92, 93, 94]	35
2.1.2.	Le mode opératoire	37
2.2.	La PCR	38
2.2.1.	La PCR Poyart	39
2.2.1.1.	Le mode opératoire de la pcr poyart.....	39
2.2.1.2.	Le protocole de la pcr poyart	40
2.2.1.3.	L'interprétation des résultats pour la pcr poyart	41
2.2.2.	La PCR Kong.....	41
2.2.2.1.	Le mode opératoire de la PCR Kong.....	41
2.2.2.2.	Le protocole de la pcr kong	42
2.2.2.3.	L'interprétation des résultats pour la pcr kong.....	42
2.2.3.	La PCR Pili.....	43
2.2.3.1.	Le mode opératoire de la PCR pili	43
2.2.3.2.	Le protocole de la pcr pili	44
2.2.3.3.	L'interprétation des résultats pour la pcr pili	44
2.2.4.	La PCR MLS.....	45
2.2.4.1.	Le mode opératoire de la PCR MLS	45
2.2.4.2.	Le protocole de la pcr mls	46
2.2.4.3.	L'interprétation des résultats pour la pcr mls	46
2.3.	L'électrophorèse sur gel d'agarose	47
2.3.1.	Le protocole pour la migration sur un gel d'agarose	47
3.	Le séquençage à haut débit ou Next Generation Sequencing (NGS)	48
3.1.	L'extraction manuelle de l'ADN.....	48
3.1.1.	Le protocole	48
3.2.	Le mode opératoire du NGS.....	49
3.3.	Le logiciel WGS typer	50
III.	Les résultats	51
1.	Le génotypage capsulaire	51
2.	La détermination des protéines pili	52
3.	Le profil de résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS).....	53
4.	La détermination du « séquence type »	54
5.	La comparaison entre les deux approches.....	56
6.	Les nouveaux marqueurs ciblés par le WGS	57
IV.	La discussion	59
1.	Le NGS, une méthode efficace ?.....	59
1.1.	L'identification des gènes de résistance.....	59

1.2.	L'identification du « sequence type »	60
2.	Le NGS, une méthode facile d'utilisation ?	62
3.	Le NGS, une approche prometteuse ?	63
4.	Les limitations du NGS.....	64
5.	Les avantages et inconvénients du NGS combiné à l'outil WGS typer	65
V.	La conclusion	66
	Bibliographie	67
	Les annexes	72

Liste des abréviations

ABC : *Active Bacterial Core*, : *Active Bacterial Core*

adhP : *alcool deshydrogénase*

ADN : *Acide désoxyribonucléique*

atr : *transporteur d'acides aminés*

BHE : *barrière hémato-encéphalique*

BibA : *GBS Immunogenic Bacterial Adhesin*

CDC : *Centers for Disease Control and Prevention*

cDNA : *ADN complémentaire*

CNA : *Acide Nalidixique Colistine*

CNR : *Centre National de Référence*

CPS : *polysaccharide capsulaire*

CSH : *Conseil Supérieur d'Hygiène*

ddNTP : *2',3'-didéoxynucléotides*

dNTP : *désoxynucléotides triphosphate*

EOD : *Early Onset Disease*

GBS : *Streptocoque du groupe B*

glcK : *glucose kinase*

glnA : *glutamine synthétase*

HvgA : *Hypervirulent adhesin*

HylB : *Hyaluronate lyase*

IAP : *Intrapartum Antibiotic Prophylaxis*

LCR : *liquide céphalo-rachidien*

LOD : *Late Onset Disease*

LTA : *acide lipotéichoïque*

MALDI-TOF : *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*

MLS : *Macrolides, Lincosamides et Streptogramines*

MLST : *Multi Locus Sequence Typing*

NaCl : *chlorure de sodium*

NGS : *Next Generation Sequencing*

pb : *paire de bases*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

pheS : *phénylalanine ARNt sythétase*

PI : *pilus island*

RepB : *Replication protein B*

RnZ : *Ribonuclease Z*

ScpB : *Group B streptococcal C5a peptidase*

sdhA : *sérine deshydratase*

SfbA : *Streptococcal fibronectin binding protein A*

ST : *Sequence Type*

Taq : *Thermus aquaticus*

TFE : *travail de fin d'études*

tkt : *transkétolase*

Tm : *melting temperature ou température de fusion*

WGS : *Whole Genome Sequencing*

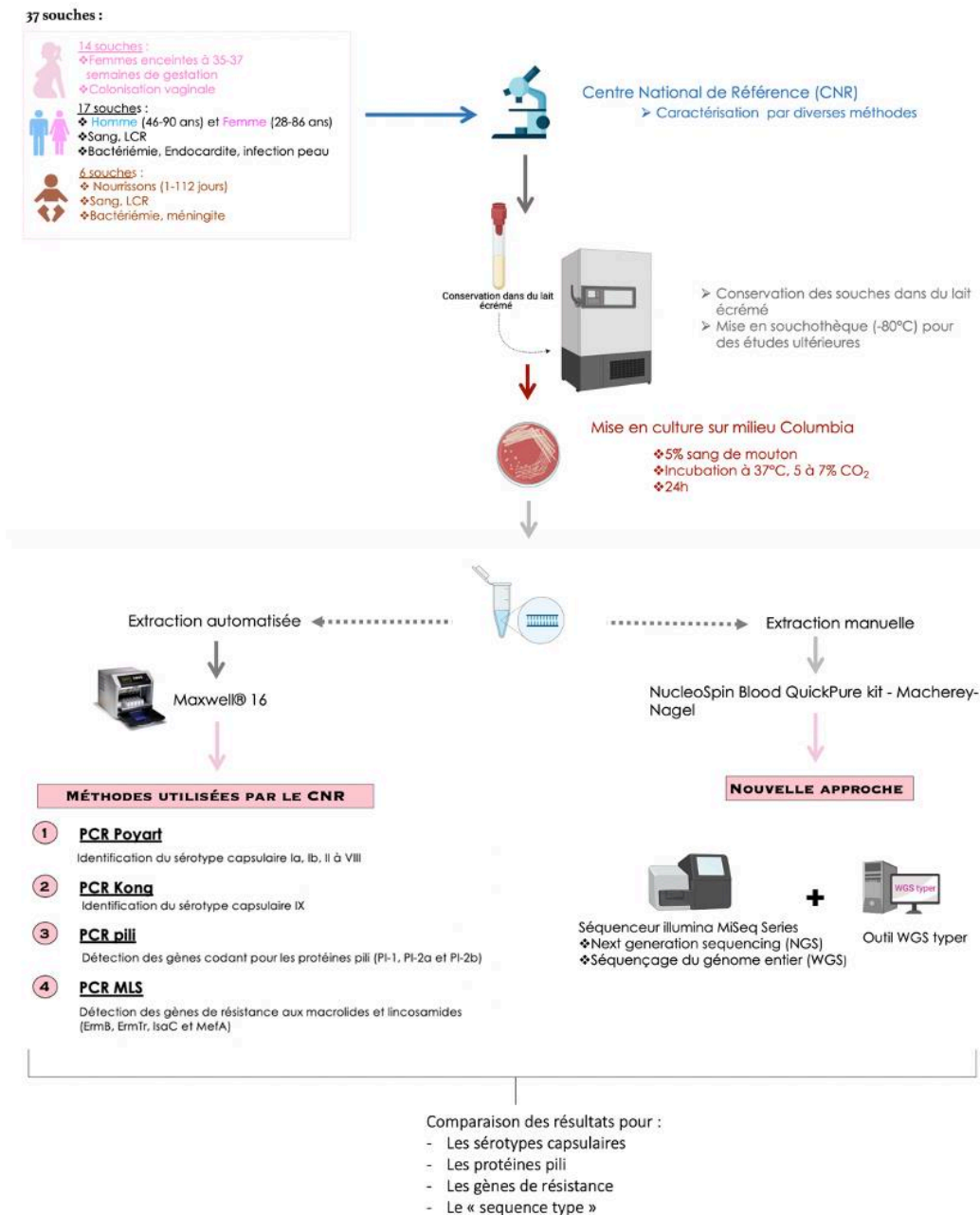
L'objectif

Ce travail de fin d'études a été réalisé dans le service de Microbiologie Clinique du CHU de Liège au sein du Centre National de Référence (CNR) pour le *Streptococcus agalactiae*.

Il s'inscrit dans le cadre de l'évaluation d'une nouvelle méthode de typage basée sur le séquençage à haut débit, ou « Next Generation Sequencing » (NGS), en particulier le séquençage du génome entier, nommé « whole genome sequencing » (WGS). Celui-ci est appliqué à l'étude du Streptocoque du groupe B (GBS). L'étude du génome bactérien, une approche employée davantage dans les laboratoires, fournit à la fois une caractérisation complète de la souche et une analyse scientifique approfondie. Le but du travail consiste ainsi pour le GBS à valider ce type de séquençage couplé à un outil bioinformatique, développé spécifiquement à la demande du laboratoire par la firme Hedera22. L'évaluation de la nouvelle approche se base sur une comparaison avec les méthodes actuellement utilisées par le laboratoire. Des résultats concluants aboutiraient de cette façon à un remplacement des méthodes de caractérisation actuelles (PCR, MLST, agglutination, ...) par une seule technique basée sur le séquençage.

Cette comparaison repose sur une évaluation de la fiabilité de plusieurs critères de caractérisation tels que la définition du type capsulaire, la détermination des gènes de résistance aux antibiotiques et l'expression des protéines de pili. De plus, le WGS apporte également des informations complémentaires sur le « sequence type » du GBS et les autres gènes impliqués dans la virulence de la bactérie. Ceux-ci seront discutés dans le cadre de ce TFE.

La stratégie expérimentale



Les souches utilisées dans ce TFE ont fait l'objet d'une première caractérisation à leur arrivée au CNR (culture, Maldi-Tof, antibiogramme, sérotypage, ...). Dans un premier temps, le travail a débuté par le choix des souches à utiliser ainsi qu'à leur mise en culture sur un milieu Columbia dans le but d'en extraire l'ADN. Dans un second temps, les paramètres obtenus par les deux approches (les techniques du CNR, exclusivement composées de PCR et le WGS) tels que la détermination du sérotype, les protéines de pili, les profils de résistance aux antibiotiques ont été comparés.

I. L'introduction

1. TAXONOMIE

Le Streptocoque du groupe B, également appelé *Streptococcus agalactiae* ou Group B Streptococcus (GBS) est une bactérie cocci à gram positif, appartenant à la famille des Streptococcaceae et rattachée au genre Streptococcus [1] .

1.1. LA FAMILLE DES STREPTOCOCCACEAES

Les Streptococcaceaes font partie d'une vaste famille de bactéries, présentant néanmoins des caractéristiques morphologiques, structurales et métaboliques communes. Ces bactéries, de forme ovoïde et disposées par paires ou en chaînette, sont des cocci à gram positif, encapsulées, immobiles et non sporulées [2]. Elles réalisent la fermentation lactique à partir du glucose en guise de respiration afin de favoriser leur croissance. En effet, les Streptococcaceaes trouvent l'énergie nécessaire à leur métabolisme au travers de ce processus. Ainsi, elles ne nécessitent pas la présence d'oxygène pour se développer, ce dernier n'étant pas létal à leur croissance. C'est pourquoi, elles sont classés comme aéro-anaérobie facultatif. [3]

1.2. LE GENRE STREPTOCOCCUS

La famille des Streptococcaceaes comporte plusieurs genres dont le plus courant est le Streptococcus [4]. Les streptocoques sont classifiés sur base de trois critères principaux [5] :

1- Les propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques

Tableau 1 : les caractéristiques principales des streptocoques [6, 7]

Forme	Cocci organisés en diplocoques ou chaînette
La taille du génome	1 996 151 bp
La coloration de Gram	Gram + : présence d'une paroi épaisse et riche en peptidoglycane. Les colonies prennent une couleur violette.
Le type de métabolisme	Aéro-anaérobie facultatif
Les tests d'identification	❖ Catalase négative ❖ Cytochrome oxydase négative
La température optimale	Les Streptocoques sont mésophiles, c'est-à-dire qu'ils ont besoin d'une température de 37°C pour leur multiplication.

2- La classification de Lancefield

La classification de Lancefield, apparue en 1930 par Rebecca Lancefield, permet de classer les streptocoques en fonction des carbohydrates présents à la surface des bactéries. Autrement dit, elle est basée sur la structure antigénique du polyside C, composant de la paroi bactérienne. Par conséquent, les streptocoques sont divisés en 17 sérogroupes nommés de A à T sur base de cette classification. Les streptocoques ne possédant pas l'antigène protéique C sont dits « non groupables ». [8, 9, 10]

En pratique, le groupe de Lancefield est déterminé par la méthode d'agglutination au latex qui utilise des particules de latex, lesquelles sont sensibilisées par des anticorps dirigés contre les antigènes de groupe. La présence de l'antigène d'intérêt conduit à une agglutination des particules de latex, visible à l'œil nu. Dans le cas contraire, le réactif latex reste en suspension et aucune agglutination n'est observée. [11]

3- Le type d'hémolyse [12]

La production d'hémolysine par certains streptocoques permet la formation d'une hémolyse, c'est-à-dire une destruction des globules rouges, qui peut être complète ou partielle. Il existe 3 types d'hémolyse:

- Hémolyse complète ou β : la présence d'une zone claire (ou halo blanchâtre) autour de la colonie permet de mettre en évidence les streptocoques β hémolytiques.
- Hémolyse incomplète ou α : la présence d'une zone verdâtre autour de la colonie permet de mettre en évidence les streptocoques α hémolytiques.
- Hémolyse γ : l'absence d'hémolyse se manifestant par des colonies inchangées, permet de mettre en évidence les streptocoques non hémolytiques.

Les streptocoques du groupe B (GBS) présentent une hémolyse β , ils sont donc β -hémolytiques.

2. L'ESPÈCE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Le *Streptococcus agalactiae* est l'unique espèce de la famille des Streptococcaceae et du genre *Streptococcus*, classifié groupe B selon la classification de Lancefield. [13].

2.1. L'HISTORIQUE

Découvert à la fin du 19^e siècle par le vétérinaire Edmond Nocard, le *Streptococcus agalactiae* était également nommé « Streptococcus de la mammite » suite à son implication dans les

mammites bovines [14]. Cette inflammation des mamelons causée par le streptocoque du groupe B se manifeste principalement par une absence de lait chez les vaches. Par ailleurs, le nom donné à l'espèce « *agalactiae* » provient du latin et fait référence au symptôme principal de cette infection bactérienne (*agalactiae* signifie absence de lait). Cependant, à la fin du 20^e siècle, une émergence de méningites et de septicémies chez les nouveau-nés a permis de mettre en évidence la présence de cette bactérie chez l'humain [15]. L'infection au *Streptococcus agalactiae* a donc des conséquences en pathologie humaine et animale.

2.2. GÉNÉRALITÉS

Les GBS sont des pathogènes opportunistes présents naturellement dans le tractus intestinal et génital des humains sains [16]. Morphologiquement, ces germes sont des cocci à Gram positif de taille moyenne, comprise entre 0,2 et 1 μm [17]. Un coccus peut être isolé, lié par paires (diplocoque) ou assemblé à plusieurs cocci pour former des chaînes de coques qui peuvent être de longueur variable (fig.1). De plus, la paroi bactérienne est entourée par une capsule de nature polysaccharidique. La diversité des polysaccharides permet de distinguer les différents sérotypes et de souligner le typage des souches de *Streptococcus agalactiae*. Actuellement, 10 antigènes polysaccharidiques de capsule ont été mis en évidence. Sur base du polysaccharide présent, un sérotype est accordé à une souche bactérienne (Ia, Ib, II à IX). [18]

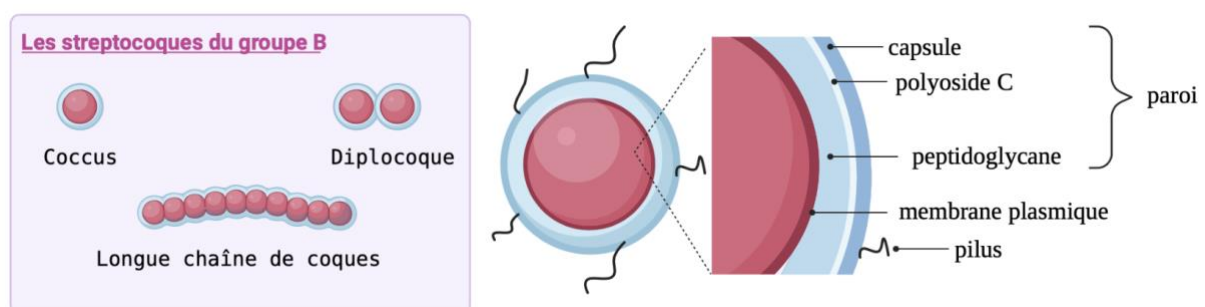


Figure 1 : représentation schématique des caractéristiques morphologiques des GBS [19]

En ce qui concerne les activités biochimiques de ces bactéries, elles se distinguent des autres bactéries gram positives, telles que les Staphylocoques par l'absence de catalase et cytochrome oxydase lors des tests d'identification [20]. Par ailleurs, elles sont positives au CAMP test, lequel

permet de distinguer l'espèce *Streptococcus agalactiae* des autres espèces de streptococcus β -hémolytiques. Ce test d'identification se base sur une exacerbation de l'hémolyse du

Streptocoque agalactiae par une action synergique de celui-ci avec l'hémolysine sécrétée par les Staphylocoques aureus (sphingomyélinase) [21].

D'un point de vue nutritionnel, les GBS sont des bactéries exigeantes qui ne se cultivent pas facilement sur les milieux de culture usuels de laboratoire. Elles nécessitent des géloses riches en sang et en facteurs de croissance, à l'exemple du glucose ou des peptones variées. [22]

2.3. LE PORTAGE ET LA TRANSMISSION

Les GBS sont des bactéries retrouvées fréquemment (jusqu'à 50%) dans la flore commensale du tractus gastro-intestinal et génital des porteurs sains [23]. La peau et la gorge sont également des lieux d'habitation de ces germes, lesquels s'hébergent dans notre organisme et sont inoffensifs dans la plupart des cas [24]. Ils ne mènent donc à aucune infection. Cependant, les GBS peuvent devenir pathogènes et conduire à des infections relativement invasives. Il s'agit de bactéries ne causant pas de maladie chez les sujets sains, mais pouvant provoquer des infections chez ceux qui présentent un avantage sélectif à leur pathogénicité, comme une immunodépression, un diabète ou un cancer [25, 26, 27]. Elles sont donc qualifiées de bactéries opportunistes.

Le *Streptococcus agalactiae* colonise les muqueuses de l'hôte de façon dynamique, c'est-à-dire que sa présence peut être transitoire, intermittente ou chronique [16]. Cette caractéristique est à prendre compte lors des examens bactériologiques. De fait, le prélèvement de l'échantillon peut engendrer un résultat faussé s'il n'est pas effectué à un moment prédictif de la colonisation.

Le *Streptococcus agalactiae* est transmissible d'un hôte à l'autre via plusieurs voies de transmission [28, 29]:

- ❖ **Transmission d'un individu à l'autre** : à l'heure actuelle, le mode de transmission n'est pas encore réellement connu, mais il semblerait que les relations sexuelles jouent un rôle dans la propagation du GBS. Le contact direct par la main infectée est également un moyen de contamination.
- ❖ **Transmission maternelle** : environ 60% de nourrissons nés de mère colonisée contractent une infection à GBS [30]. La transmission peut se faire de deux façons :

- Transmission verticale : le nouveau-né se contamine *in utero* par la voie ascendante ou par ingestion de liquide amniotique contaminé lors de l'accouchement.
- Transmission horizontale : le nouveau-né se contamine de manière nosocomiale ou par le lait maternel contaminé.

3. LA VIRULENCE

3.1. LES ÉTAPES DE L'INFECTION

L'infection à *Streptococcus agalactiae* comprend 4 étapes [31] :

- 1) **Introduction de la bactérie dans l'organisme** : la bactérie s'introduit dans l'organisme par la voie pulmonaire ou intestinale.
- 2) **Adhésion et colonisation des cellules épithéliales** : le pH acide favorise l'adhésion de la bactérie à l'épithélium et la formation de biofilms par la liaison à certaines protéines de la matrice extracellulaire, telles que la fibronectine, le fibrinogène et la laminine. Cette liaison est favorisée par la présence de protéines bactériennes de surface hydrophobes (adhésines) qui possèdent une affinité pour les protéines de surface cellulaire, comme les intégrines. Le pH acide est notamment présent au niveau du vagin de la femme (pH 4-4,5).
- 3) **Invasion et traversée des barrières de l'hôte** : l'envahissement des cellules et tissus de l'hôte se fait par la translocation d'une vacuole comportant la bactérie au travers de l'épithélium. Ce processus va ainsi favoriser le passage de la bactérie au travers des barrières naturelles de l'organisme, comme la barrière hémato-encéphalique.
- 4) **Évasion et échappement aux mécanismes de défense de l'hôte** : le processus d'installation des GBS est encouragé par la capacité de la bactérie à résister aux défenses immunitaires. Cette résistance est favorisée par la présence de nombreux phénomènes, tels que la résistance aux peptides antimicrobiens, l'interférence avec le processus d'opsonisation, la résistance au processus de phagocytose et la diminution de l'expression des épitopes antigéniques, empêchant la liaison des anticorps de l'hôte.

3.2. LES FACTEURS DE VIRULENCE

Le *S. agalactiae* se caractérise par différents facteurs de virulence lui permettant d'adhérer aux cellules de l'organisme, de disséminer l'infection, mais aussi de déclencher la réponse immunitaire et d'échapper à celle-ci. Ces composants peuvent être classés en 2 groupes en

fonction de leur nature : facteurs de virulence de nature protéique, également appelés facteurs d'adhésion ou adhésines et des facteurs de virulence de nature non protéique.

3.2.1. LES FACTEURS DE VIRULENCE DE NATURE NON PROTÉIQUE

▪ La capsule (fig. 1)

La paroi des *Streptococcus agalactiae* est entourée par une capsule de nature polysaccharidique qui définit le sérotype de la souche en fonction de l'arrangement des polysaccharides capsulaires (CPS). Parmi les CPS, l'acide sialique, le glucose et le galactose sont des sucres retrouvés dans tous les sérotypes. Le N-acetylglucosamine et le rhamnose sont toutefois spécifiques à certains sérotypes. Actuellement, dix sérotypes (Ia, Ib et II à IX) ont été identifiés sur base des antigènes capsulaires présents. L'acide sialique, composant principal des capsules, joue un rôle extrêmement important dans la pathogénicité des GBS. En effet, une teneur élevée en acide sialique empêche l'activation de la cascade du complément et conduit à une activité phagocytaire non optimale. Ceci a pour conséquence une résistance des GBS aux défenses immunitaires de l'organisme. [32, 33, 34] Les GBS de sérotype III sont fortement impliqués dans les maladies invasives et cela pourrait s'expliquer par une capsule riche en acide sialique. Parmi les différents sérotypes, ceux classés Ia et III ont une prévalence élevée dans les cas d'infections plus agressives.

Dans la pathogénicité des GBS, la capsule constitue le facteur de virulence majeur qui accentue, à un plus haut degré, le pouvoir invasif de la bactérie [35].

Les rôles de la capsule [36] :

- ❖ Protéger la bactérie des facteurs environnementaux.
- ❖ Permettre à la bactérie d'échapper au système immunitaire de l'hôte par une intrusion dans la cascade du complément, médié notamment par l'acide sialique.
- ❖ La résistance à la phagocytose, processus nécessaire à l'élimination de la bactérie dans l'organisme de l'hôte.

En ce qui concerne la distribution des sérotypes au sein de la population, la prévalence diffère en fonction de la localisation géographique. Les sérotypes Ia, Ib, II, III et V sont prédominants en Europe et aux USA. En revanche, au Japon les infections à GBS sont principalement reliées aux sérotypes VI et VIII. [37]

▪ L'acide lipotéichoïque (LTA) [38]

Le LTA, un composant de la paroi des bactéries, est un acide téichoïque nécessaire à l'attachement du peptidoglycane à la membrane bactérienne. Cela s'opère par une liaison covalente avec les lipides membranaires. L'épaisseur de la paroi est majoritairement déterminée par la quantité de peptidoglycane. Ce dernier est le critère de base de la coloration de gram. Les bactéries à gram positif possèdent une paroi épaisse et riche en peptidoglycane. En plus du rôle de maintien de la structure de la paroi, les LTA influencent la sensibilité aux agents antimicrobiens en empêchant leur pénétration dans la bactérie. De plus, ils participent également à l'adhésion de la bactérie.

▪ Les cytotoxines

Les cytotoxines sont des toxines produites par la bactérie dans le but d'altérer l'intégrité des cellules, notamment en provoquant leur lyse. La destruction des cellules de l'hôte favorise le passage de la bactérie et donc sa propagation dans l'organisme. La principale cytotoxine des GBS est la β -hémolysine codée par le gène CylE et CylB, faisant partie de l'opéron cyl (séquence de 12 gènes codant). Cette hémolysine est responsable de l'hémolyse complète (β -hémolyse) des globules rouges *in vitro*. Outre son implication dans l'hémolyse, elle intervient dans l'invasion de la bactérie par son activité toxique sur les cellules (formation de pores dans la bicouche phospholipidique et mise en place d'une inflammation locale). [39, 40]

3.2.2. LES FACTEURS DE VIRULENCE DE NATURE PROTÉIQUE

Bien que les facteurs de virulence de nature protéique ont des rôles diversifiés, ils sont majoritairement impliqués dans l'invasion de la bactérie au sein de l'organisme. (Fig. 2)

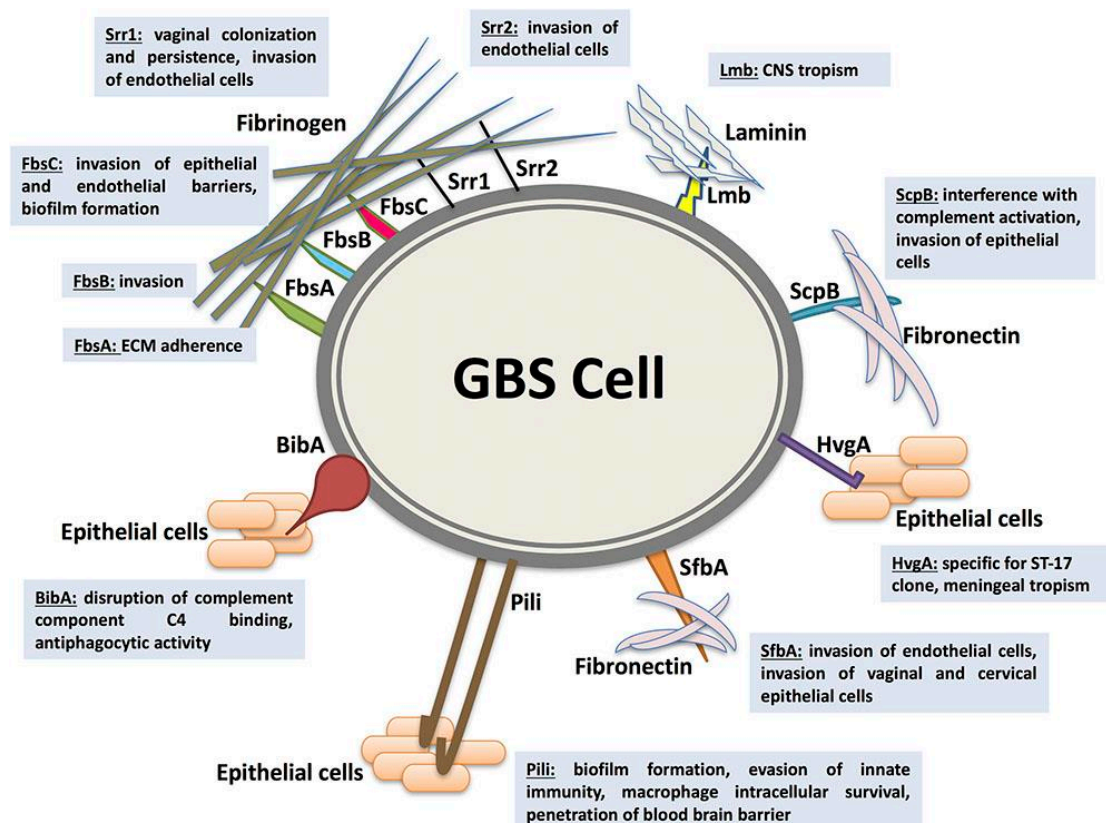


Figure 2 : représentation schématique des facteurs protéiques impliqués dans la virulence du GBS [37]

▪ Les pili (fig. 1) [39, 41, 42, 43]

Les pili (pilus au singulier) sont des structures protéiques filamenteuses ancrées dans la paroi bactérienne. Ils sont formés par la polymérisation de trois protéines de structures principales nommées pilines qui ont notamment un rôle dans l'ancrage du pilus au niveau de la paroi. Actuellement 3 gènes codant pour les protéines de pili (pilus island) ont été identifiés chez le *Streptococcus agalactiae* : PI-1, PI-2a et PI-2b¹. Ces gènes peuvent être hébergés seuls ou en combinaison, à l'exception du PI-2a et PI-2b qui ne seront jamais présents en parallèle au sein d'une même souche. De taille relativement longue, les pili sont les premiers éléments à entrer en contact avec les cellules de l'hôte. C'est ainsi que ces facteurs jouent un rôle considérable dans le processus pathologique des GBS.

La protéine PI-1 accorde la capacité de résistance aux défenses immunitaires innées, tandis que PI-2a joue un rôle dans l'adhérence des GBS aux cellules de l'hôte, ainsi qu'à la formation de

¹ PI-2a et PI-2b correspondent au même gène mais avec des variations alléliques.

biofilms. Quant à PI-2b, il favorise la survie du pathogène à l'intérieur des macrophages et le processus d'invasion du pathogène, notamment en contribuant au passage de la BHE.

- **La famille des protéines α like et β like** [44, 45]

La famille des protéines α like et β like comprend les protéines suivantes : α -C, Rib, Alp1, Alp2, Alp3 et Alp4.

Les protéines α like jouent un rôle dans l'invasion des épithéliums de l'organisme, alors que les protéines β like interviennent plutôt dans l'échappement de la réponse immunitaire. Contrairement aux protéines α like, les protéines β like sont sensibles à la trypsine, une peptidase pancréatique nécessaire à la digestion des protéines.

- **La streptococcal C5a peptidase du groupe B (ScpB)** [46]

La protéine ScpB est une sérine protéase qui clive au niveau du composant C5a de la cascade du complément. Par conséquent, elle contribue à l'inhibition de la réponse immunitaire innée par le blocage de l'activation du complément. Ce dernier participe à la défense de l'organisme contre l'infection, par une coopération de plusieurs enzymes dont la protéase C5a.

- **La streptococcal fibronectin binding protein A (SfbA)** [47]

Impliquée dans la liaison avec la fibronectine, un composant de la matrice extracellulaire, la SfbA participe à la colonisation vaginale et à l'attaque des cellules endothéliales du cerveau.

- **Le GBS immunogenic bacterial adhesin (BibA)** [48]

La protéine BibA interfère avec la cascade du complément, notamment au niveau de la protéine C4. Cette interférence a pour conséquence une résistance à la phagocytose du pathogène. La protéine BibA favorise également l'adhérence des GBS aux cellules épithéliales.

- **L'hypervirulent GBS adhesin (HvgA)** [49]

Spécifique du clone ST-17, HvgA est une protéine de surface présente au niveau de la paroi de la bactérie. Elle joue un rôle considérable dans la virulence du clone ST-17 qui se manifeste principalement par des méningites chez les nouveau-nés. En effet, la flore intestinale n'étant pas encore mature, HvgA favorise le passage des barrières physiologiques intestinales et hémato-encéphalique. Ce franchissement est permis par la forte adhérence des GBS aux cellules épithéliales intestinales et endothéliales des capillaires. Elle permet aussi la

dissémination du pathogène au travers du sang humain grâce à sa résistance à la phagocytose par les neutrophiles.

- **Hyaluronate lyase (HylB) [50]**

Le gène HylB code pour une hyaluronidase, une hydrolase cruciale pour la survie intracellulaire de la bactérie au sein du macrophage. Sa capacité de dégradation de l'acide hyaluronique en tant que composant de la matrice extracellulaire fournit une source de carbone, utilisée comme nutriment pour la croissance de la bactérie.

- **Le gène Sar5 [51]**

Le gène Sar5 code pour une protéine de surface nommée R5 ou BPS qui protège la bactérie de l'immunité de l'hôte, permettant ainsi sa persistance dans l'organisme.

- **Ribonuclease Z (RnZ) [52]**

La ribonucléase Z est une phosphodiesterase impliquée dans la maturation de l'ARN de transfert (ARNt) dont le rôle est fondamental pour la traduction des gènes en protéines.

- **Replication protein B (RepB) [53]**

La protéine de réplication B, codée par le plasmide est une protéine impliquée dans sa réplication du celui-ci grâce à son activité d'hélicase 5'-3'.

3.2.3. LE CLONE ST-17

Le Multi Locus Sequence Typing (MLST) est une technique de typage moléculaire basée sur le séquençage de sept gènes ubiquitaires d'environ 500 paires de bases (adhP, atr, glcK, glnA, pheS, sdhA et tkt) [54]. Chaque gène possède plusieurs allèles suite à des variations de séquences. Ainsi, sur base du profil allélique des gènes d'intérêts, un « sequence type » (ST) est déterminé pour la souche traitée. La méthode MLST permet une caractérisation des souches GBS et l'obtention de données utiles lors des études épidémiologiques, mais aussi la surveillance des infections aux GBS. En pratique, chaque séquence nucléotidique obtenue par le séquençage Sanger, est encodée dans le programme en ligne qui détermine le numéro de l'allèle du gène analysé. La combinaison des numéros alléliques des 7 gènes étudiés, identifie le « sequence type » (ST) de la souche étudiée. Parmi les ST identifiés jusqu'à présent, le ST-17 est le clone hypervirulent, fortement lié au sérotype III. Il est majoritairement impliqué dans les souches à tropisme méningé chez les nouveau-nés. Le clone ST-17 est un élément considérable à identifier chez les mères enceintes afin d'assurer un bon suivi en cas de présence. Cette

surveillance permettra de réagir rapidement avec notamment une prophylaxie efficace pour éviter la transmission du pathogène au nouveau-né. [55]

4. L'INFECTION À STREPTOCOQUE DU GROUPE B

Depuis son émergence dans les années septante, l'infection au streptocoque du groupe B est la première cause d'infection néonatale invasive dans les pays industrialisés et demeure un problème de santé publique.

4.1. L'INFECTION DU NOUVEAU-NÉ

En pathologie humaine, l'infection au GBS est classée parmi les maladies prioritaires dans le service de pédiatrie, de par son implication dans les infections néonatales invasives. En Belgique, l'infection au streptocoque du groupe B représente la première cause d'infection sévère chez les nouveau-nés. Cliniquement, les infections par ce germe se manifestent principalement par des septicémies, des méningites et des pneumonies [14]. Toute la dangerosité de ce pathogène réside dans sa capacité à se disséminer dans l'organisme et particulièrement à atteindre le système nerveux. Cela peut ainsi conduire à des invalidités et des séquelles neurologiques chez le nourrisson, voire au décès de celui-ci [56].

L'infection au GBS se distingue par deux syndromes : l'infection précoce ou « Early Onset Disease » (EOD) se présentant durant la première semaine de vie du nourrisson, et l'infection tardive ou Late Onset Disease (LOD) touchant les nourrissons âgés de 1 semaine à 3 mois. [57] Le tableau 2 expose un comparatif des deux types d'infections.

Tableau 2 : Comparaison des infections précoces (EOD) et infections tardives (LOD) [58]

	<u>Infection précoce</u> “Early Onset Disease” (EOD)	<u>Infection tardive</u> “Late Onset Disease” (LOD)
Apparition des symptômes	0 à 7 jours après la naissance	1 semaine à 3 mois après la naissance
Transmission	Transmission verticale en <i>intrapartum</i> ou <i>in utero</i> par la mère colonisée	Transmission verticale en <i>intrapartum</i> par la mère colonisée (50%) Transmission horizontale acquise de façon nosocomiale, en post-partum ou dans la communauté
Porte d’entrée	Inhalation de liquide contaminé menant à des pneumonies et une dissémination sanguine	Probablement intestinale
Présentation clinique	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Détresse respiratoire (pneumonie) ❖ Bactériémie et choc septique ❖ Méningite dans 5 à 15% des cas 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Méningite (25 à 75%) pouvant menant à des séquelles neurologiques dans 30 à 50% des cas ❖ Fièvre ❖ Bactériémie
Sérotypes capsulaires	Tous les sérotypes	Tous les sérotypes mais avec une incidence élevée pour le sérotype III
Incidence	0,3 à 3 pour 1000 naissances	0,5 pour 1000 naissances
Mortalité	< 10%	0 à 6%

4.2. L’infection de la femme enceinte

Chez la femme enceinte, la bactérie retrouvée dans la flore vaginale est inoffensive pour sa santé. En général, le risque majeur repose essentiellement sur le fœtus qu’elle porte, avec des risques de malformation lors de la gestation ou des infections invasives. Néanmoins, la femme enceinte n’est pas à l’abri de développer certaines complications. La colonisation vaginale est en effet un terrain favorable à la prolifération du germe vers des régions localisées de l’appareil uro-génital. La présence du GBS chez la femme enceinte peut mener à diverses infections : chorioamnionite, endométrite, infection des plaies en post-partum, méningites, endocardite, ostéomyélites et sepsis. [59, 60]

4.3. L'INFECTION DE L'ADULTE

L'infection au streptocoque du groupe B a également des effets chez les adultes, en particulier ceux de plus de 65 ans. Le pouvoir invasif du GBS s'explique principalement par une diminution des défenses immunitaires, empêchant ainsi de lutter efficacement contre le pathogène. Le tableau des manifestations cliniques comporte des infections de la peau et tissus mous, des infections des voies respiratoires, des endocardites, des infections urinaires, des bactériémies ou encore des méningites. [59, 61]

La présence de comorbidité est également une caractéristique clé de la pathogénicité des GBS chez les adultes. En effet, ces patients avec des facteurs prédisposants comme un cancer, une immunodépression ou un diabète sont plus fragiles aux infections bactériennes.

4.4. LES FACTEURS DE RISQUE

Dans le cadre des infections à GBS, de nombreux facteurs de risque augmentent la probabilité de développer une forme pathologique de l'infection pouvant mener au décès du patient. L'âge correspond au facteur de risque majeur de ce pathogène. En effet, les nouveau-nés, les adultes avec des comorbidités et les personnes de plus de 65 ans sont les plus touchés par les infections à streptocoque de groupe B. Les principaux facteurs favorisant l'apparition de symptômes sévères sont repris dans le tableau 3. [62] [63] [64]

Tableau 3 : tableau comprenant les facteurs de risque pour l'adulte, la femme enceinte et le nourrisson

Les facteurs de risque pour l'adulte et la femme enceinte	Les facteurs de risque pour le nourrisson
<ul style="list-style-type: none">❖ L'ethnicité : la population africaine est plus vulnérable aux infections à GBS❖ Les comorbidités : cancer, immunodépression, diabète ...❖ Le surpoids et l'obésité	<ul style="list-style-type: none">❖ La colonisation vaginale chez la mère enceinte❖ La présence de fièvre en intrapartum (> à 38°C) et chorioamniotite❖ La rupture prématurée de la poche des eaux❖ Délai de plus de 18 heures entre la rupture des membranes et l'accouchement❖ L'accouchement prématuré avant 37 semaines de gestation❖ Les antécédents familiaux : un enfant atteint au préalable de la forme précoce de l'infection

5. DIAGNOSTIC, TRAITEMENTS ET PRÉVENTION

5.1. MICROBIOLOGIE CLINIQUE : LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE

Le laboratoire de microbiologie, faisant partie du département de biologie clinique, est chargé des activités d'analyses médicales qui aident au diagnostic et au suivi des maladies infectieuses. L'objectif est de suivre les échantillons biologiques depuis le prélèvement jusqu'à l'interprétation finale des résultats envoyés au clinicien. Les activités du laboratoire se résument ainsi à l'identification du pathogène et à l'étude de résistances. Les infections à streptocoque du groupe B constituent une analyse de routine, réalisée de façon journalière au sein du laboratoire de bactériologie.

5.1.1. LES MÉTHODES DE DIAGNOSTIC

Malgré l'avancée majeure des techniques de biologie moléculaire et de spectrométrie de masse, le diagnostic de l'infection repose essentiellement sur les méthodes phénotypiques [65]. Le type d'échantillon dépend de la symptomatologie ou du contexte de l'analyse. Le diagnostic se fait principalement à partir de liquide biologique tel que le sang ou le liquide céphalo-rachidien.

5.1.1.1. LA CULTURE BACTÉRIENNE

La culture microbienne est la méthode de référence pour le diagnostic des streptocoques du groupe B. Contenant les nutriments et les facteurs de croissance nécessaires à leur multiplication, le milieu de culture favorise ainsi la croissance in vitro des germes dans le but d'acquérir des colonies pures pour faciliter l'identification bactérienne. (fig.3)

Plusieurs milieux de culture sont envisageables dans le cas du diagnostic d'une infection à GBS :

- 1) La **gélose Columbia** avec 5% de sang de mouton est un milieu sélectif qui permet la mise en évidence des réactions hémolytiques des germes exigeants, comme c'est le cas pour les streptocoques. Ce milieu de culture peut être rendu différentiel par l'ajout d'une combinaison d'antibiotiques ayant pour effet d'inhiber la croissance des bactéries Gram négatifs. Ces deux antibiotiques sont l'acide nalidixique et la colistine. Le milieu de culture CNA permet ainsi d'isoler des bactéries Gram positif aérobies et anaérobies. [66, 67]
- 2) Le **milieu Granada** est un milieu de culture sélectif, utilisé pour la détection directe des infections à GBS. La composition particulière de la gélose Granada et son incubation en

anaérobiose favorisent davantage la production d'un pigment orange-rouge (granadène) par les *Streptococcus agalactiae*. Les colonies apparaissent ainsi orange/saumon. [68]

- 3) Le **milieu Strep B select** est un milieu chromogène qui permet la mise en évidence de trois espèces bactériennes (GBS, entérocoques et lactobacilles) sur base de l'activité enzymatique. Ces dernières sont mises en évidence grâce à l'hydrolyse des substrats chromogènes par les enzymes bactériennes, conduisant à la formation d'un chromophore visible à l'œil nu. Les streptocoques du groupe B apparaissent alors bleu turquoise, contrairement aux entérocoques et lactobacilles qui ont des colonies rosées. [69]
- 4) Les **bouillons Lim** sont des milieux d'enrichissement sélectif des Streptocoques du groupe B. En raison de son contenu en bouillon de Todd Hewitt auquel sont ajoutés la colistine et l'acide nalidixique, les bouillons Lim inhibent la croissance des bactéries Gram négatives. Cela favorise ainsi la croissance des GBS. [70]

La culture bactérienne est un examen de référence dans le cadre de l'infection au *Streptococcus agalactiae*. Outre son rôle dans l'identification de l'étiologie de la bactérie, la culture est une étape nécessaire à la réalisation des différents tests ultérieurs comme l'antibiogramme. Toutes les méthodes de diagnostic des GBS passent par l'étape clé de la culture bactérienne.

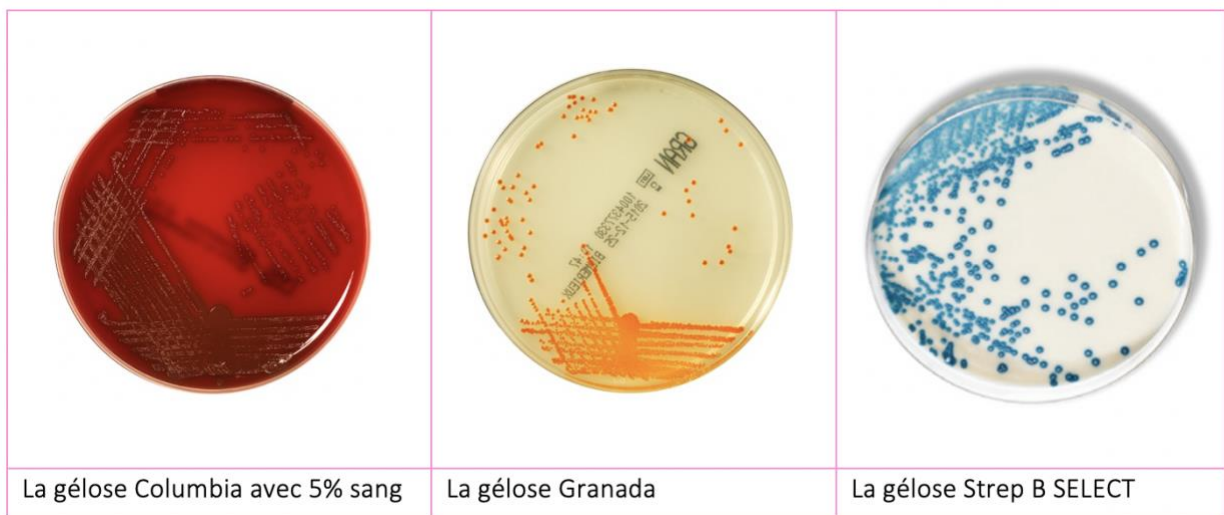


Figure 3 : les milieux de culture pour les GBS [71, 72, 73]

5.1.1.2. LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE MALDI-TOF

La spectrométrie de masse de type Maldi-Tof (en anglais matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) est une méthode de diagnostic faisant partie intégrante de la routine en microbiologie. Utilisée de façon journalière, elle permet l'identification des bactéries et des levures. À partir d'une culture pure, la spectrométrie de masse Maldi-Tof pose en quelques dizaines de minutes le diagnostic de l'infection sur base d'une comparaison du spectre obtenue pour la souche étudiée avec une librairie de spectres de référence. En pratique, la bactérie à identifier, recouverte d'une matrice organique, est déposée sur une cible frappée par un faisceau de laser. Les molécules de la matrice absorbent l'énergie transmise par le laser, s'excitent et s'ionisent. L'ionisation de la matrice est transférée à l'échantillon qui génère des ions correspondants à des fragments protéiques du micro-organisme. Les molécules ionisées de l'échantillon sont propulsées dans le tube de vol afin d'être séparées en fonction de leur rapport masse sur charge. Une fois qu'elles ont atteint le détecteur, l'appareil fournit un profil spectral qui est comparé aux spectres de référence d'une base de données. Chaque résultat est accompagné d'un score d'appariement qui témoigne de la fiabilité de l'identification : plus le score est élevé, meilleure est l'identification du genre et de l'espèce microbienne. Chaque pic du spectre correspond à une protéine spécifique du micro-organisme. Son intensité est proportionnelle à la quantité de fragments protéiques ionisés. [74, 75]

5.1.1.3. LES TESTS ANTIGÉNIQUES

La technique de l'agglutination sur les billes de latex a pour objectif de déterminer le polyside C, composant capsulaire des GBS. Cette technique permet ainsi de poser le diagnostic des streptocoques faisant partie du groupe B selon la classification de Lancefield. Pour cela, des billes de latex sont coatées par des anticorps dirigés contre l'antigène C. La présence de ce dernier conduit à une agglutination avec des anticorps anti-polyside C, visible à l'œil nu. [11]

5.1.1.4. LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Les techniques de biologie moléculaire sont depuis quelques années, omniprésentes dans le domaine du diagnostic, en particulier en microbiologie. La biologie moléculaire permet l'obtention d'une analyse sensible et spécifique par une détection des gènes impliqués dans la virulence du micro-organisme. Néanmoins, elle ne constitue pas une technique de routine pour la détection d'une infection à GBS. Il s'agit en effet d'une alternative dans le cas où l'identification du pathogène est rendue difficile par les méthodes de base.

De plus, la biologie moléculaire permet l'étude du typage moléculaire et la mise en évidence de nouvelles souches résistantes.

La technique de biologie moléculaire la plus employée au sein des laboratoires de microbiologie est la PCR ou Polymerase Chain Reaction. Il s'agit d'une technique d'amplification génique ciblée *in vitro* qui permet d'obtenir, à partir d'une faible quantité d'un fragment d'ADN, un nombre considérable de copies identiques. La séquence cible se multiplie de façon exponentielle lors de l'amplification en chaîne par la polymérase. Le fonctionnement de la PCR se base sur une répétition successive de plusieurs cycles, chacun caractérisé par trois étapes communes. Le cycle débute par une dénaturation des deux brins d'ADN, favorisée par une température élevée qui hydrolyse les liaisons hydrogènes nécessaires au maintien de la double hélice. L'étape intermédiaire consiste en l'hybridation du couple d'amorces à chaque extrémité de la séquence à amplifier. Cette liaison est accordée grâce à la complémentarité des primers qui peuvent ainsi s'apparier à la séquence d'intérêt. La deuxième étape nécessite une baisse de la température entre 50-60°C afin de promouvoir l'hybridation des amorces (Température dépendante des amorces utilisées). Le cycle se termine par l'étape d'élongation à 74°C où l'enzyme nommée la Taq polymérase se charge de l'incorporation des dNTP à l'extrémité 3' des amorces. À la fin d'un cycle, la quantité d'ADN a doublé et sert de matrice pour le prochain cycle. (fig. 4) [76, 77]

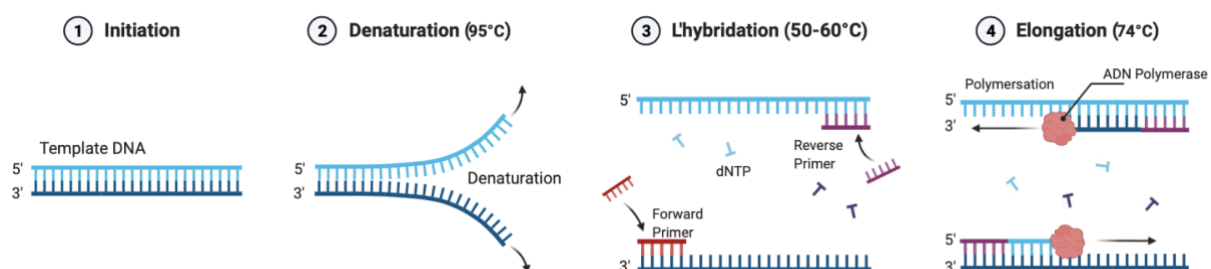


Figure 4 : schéma global d'un cycle de la PCR [19]

5.2. MICROBIOLOGIE CLINIQUE : CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE (CNR)

Le laboratoire de Microbiologie du CHU de Liège est le Centre National de Référence belge pour les infections à *Streptococcus agalactiae*. Accordé par Sciensano, ce titre permet de centrer les activités du laboratoire dans le but d'améliorer les stratégies de prévention, de développer de nouvelles méthodes de diagnostic et de participer à la surveillance épidémiologique de

l'infection. [78] À la différence du laboratoire de routine, le CNR pousse plus loin son expertise scientifique, notamment par le biais des techniques de biologie moléculaire. Afin de mener à bien ses missions, le CNR reçoit des souches de *Streptococcus agalactiae* en provenance des laboratoires belges et luxembourgeois de façon à élargir les connaissances sur le sujet. Ces souches sont caractérisées par des méthodes de base telles que le Maldi-Tof, la culture bactérienne, la méthode d'agglutination au latex et différentes méthodes de PCR.

5.3. LES ANTIBIOTIQUES UTILISÉS POUR TRAITER LES INFECTIONS À GBS.

Le traitement de référence des infections à *Streptococcus agalactiae* repose sur l'administration de la pénicilline G, un antibiotique de la famille des β -lactames. Dans le cas où ce dernier n'est pas disponible, l'ampicilline peut être utilisée même si elle présente un risque plus élevé de résistance à l'antibiotique dû à son spectre d'hôte plus large. Malgré l'efficacité de ces β -lactamates, le patient peut acquérir des résistances aux antibiotiques de premier choix, rendant alors l'infection particulièrement difficile à traiter. C'est pourquoi des méthodes testant la sensibilité aux antibiotiques doivent être réalisées avant toute administration. La méthode de référence reste la réalisation d'un antibiogramme qui permet de tester la sensibilité et la résistance de la bactérie face à plusieurs antibiotiques. De plus, elle donne également une indication sur la concentration minimale inhibitrice, c'est-à-dire la concentration à laquelle l'antibiotique inhibe la croissance bactérienne. Pour les patients allergiques aux β -lactames avec un faible risque de choc anaphylactique, il est recommandé d'utiliser la céfazoline, une céphalosporine. Dans le cas contraire où le patient allergique aux β -lactames possède un risque élevé de choc anaphylactique, il est alors préférable d'utiliser la clindamycine. La vancomycine est l'antibiotique de dernier choix lorsque la souche présente une résistance à la clindamycine ou une sensibilité inconnue. [79, 80, 81]

5.4. LES GÈNES DE RÉSISTANCE.

Un gène de résistance est défini par la traduction d'une séquence nucléique en une enzyme ou toute autre substance qui confère à la bactérie la capacité de résistance à un antibiotique. Elle développe ainsi l'aptitude de survivre malgré une exposition à un antibiotique dont le rôle est de stopper la croissance bactérienne en la tuant [82]. Le tableau 4 liste les gènes de résistance présents chez le GBS, ainsi que les antibiotiques ciblés.

Tableau 4 : les gènes de résistance présents chez les GBS

	Macrolides	Lincosamides	Tétracycline	Pénicilline	Aminoglycosides
ErmB	X	X			
ErmTr	X	X			
LsaC		X			
MefA	X				
ErmC	X				
Tet, TetK, TetM et TetO			X		
LnuB		X			
MreA	X				
PBP2x WT (wild type)				X	
Aad-6					X
AphA-3					X

5.5. LES RECOMMANDATIONS PRÉVENTIVES POUR LES NOUVEAU-NÉS

L'infection néonatale causée par le GBS est une cause majeure de morbidité et de mortalité. En raison de la gravité de ces infections, les organisations mondiales de la santé, comme le CDC, ont mis en place des stratégies préventives afin de prévenir et réduire la transmission de ce streptocoque. La prise en charge des nourrissons atteints d'une infection à GBS doit être très rigoureuse afin de limiter les séquelles provoquées par ce pathogène. De plus, les symptômes cliniques, comme une sepsis, ne sont pas évocateurs d'une infection à GBS, ce qui complique davantage le diagnostic de l'infection. Par conséquent, les moyens de prévention permettant d'améliorer le dépistage et d'empêcher l'aggravation de l'infection sont les solutions les plus favorables.

Actuellement, l'antibioprophylaxie *intrapartum* est la stratégie qui permet de détourner ce problème de santé publique. Elle consiste à administrer un antibiotique à la femme enceinte colonisée par le GBS dans le but de réduire le risque de contamination du nouveau-né par voie ascendante ou lors de l'accouchement. Depuis les premières recommandations apparues dans les années nonante, le taux d'apparition des EOD a considérablement chuté dans de nombreux pays. Selon les données de l'Active Bacterial Care (ABC) l'incidence des infections précoces à

GBS, pour 1000 naissances, a diminué de 80% depuis l'apparition des guidelines du CDC. En revanche, l'incidence pour les infections contractées tardivement reste inchangée. [83]

5.6. LES RECOMMANDATIONS DU CDC [83]

Les centres pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) forment l'agence nationale américaine pour la protection de la santé publique. Les membres de cette organisation analysent les problèmes de santé et en tirent les informations nécessaires pour la mise en place des préventions. En 1996, le CDC s'appuie sur le sujet des maladies néonatales invasives causées par le streptocoque du groupe B, en proposant deux stratégies pour le dépistage. La première stratégie repose sur les facteurs de risque, cités au point 4.4.. L'administration *intrapartum* d'antibiotiques est conseillée aux femmes enceintes présentant un facteur de risque, notamment la présence de fièvre pendant l'accouchement, une bactériurie ou chorioamnionite pendant la grossesse et une prématurité à moins de 37 semaines de gestation. Cette stratégie ne nécessite pas d'analyses médicales pour l'administration d'une prophylaxie. La seconde stratégie est fondée sur un dépistage universel chez toutes les femmes enceintes à la 37^e semaine de gestation. Ce timing correspond au moment le plus prédictif de la colonisation vaginale par le GBS. Un examen bactériologique positif conduit à la mise en place d'une antibioprophylaxie lors de l'accouchement. Des spécialistes scientifiques se sont penchés sur la question et préconisent le dépistage universel qui semble plus efficace et moins contraignant. En effet, les conditions d'une prise d'antibiotique ne sont pas à négliger. Une consommation inadéquate ou inadaptée peut impacter la flore microbienne de la maman et du bébé, mais aussi influencer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

5.7. LES RECOMMANDATIONS BELGES

En 2003, dans le but de prévenir les infections néonatales invasives, le Conseil Supérieur d'Hygiène (CSH) a mis en place une stratégie préventive basée sur l'administration *intrapartum* d'antibiotiques (antibioprophylaxie *intrapartum*) chez les femmes enceintes, à risque de transmettre le GBS au nouveau-né. [84] (Fig. 5)

Les conditions qui mènent à l'administration d'une prophylaxie *intra-partum*, par voie intraveineuse sont :

- ❖ La femme enceinte est positive lors de l'examen bactériologique du dépistage. Ce dernier consiste en une mise en culture d'un prélèvement recto-vaginal, réalisé entre la 35^e et 37^e semaine de gestation.
- ❖ La femme enceinte a eu précédemment un enfant atteint d'une forme invasive de l'infection à GBS.
- ❖ La femme enceinte présente des signes de bactériurie à GBS lors de sa grossesse.
- ❖ La femme enceinte accouche prématurément à moins de 37 semaines de gestation.
- ❖ Lorsque le résultat du dépistage est inconnu ou incomplet, IAP est administré si la femme enceinte présente une fièvre *intra-partum* de plus de 38°C ou un délai de plus de 18 heures entre la rupture des membranes et l'accouchement. Ce dernier conduit ainsi à un risque plus élevé de contraction de l'infection pour le bébé au vu d'une exposition prolongée.

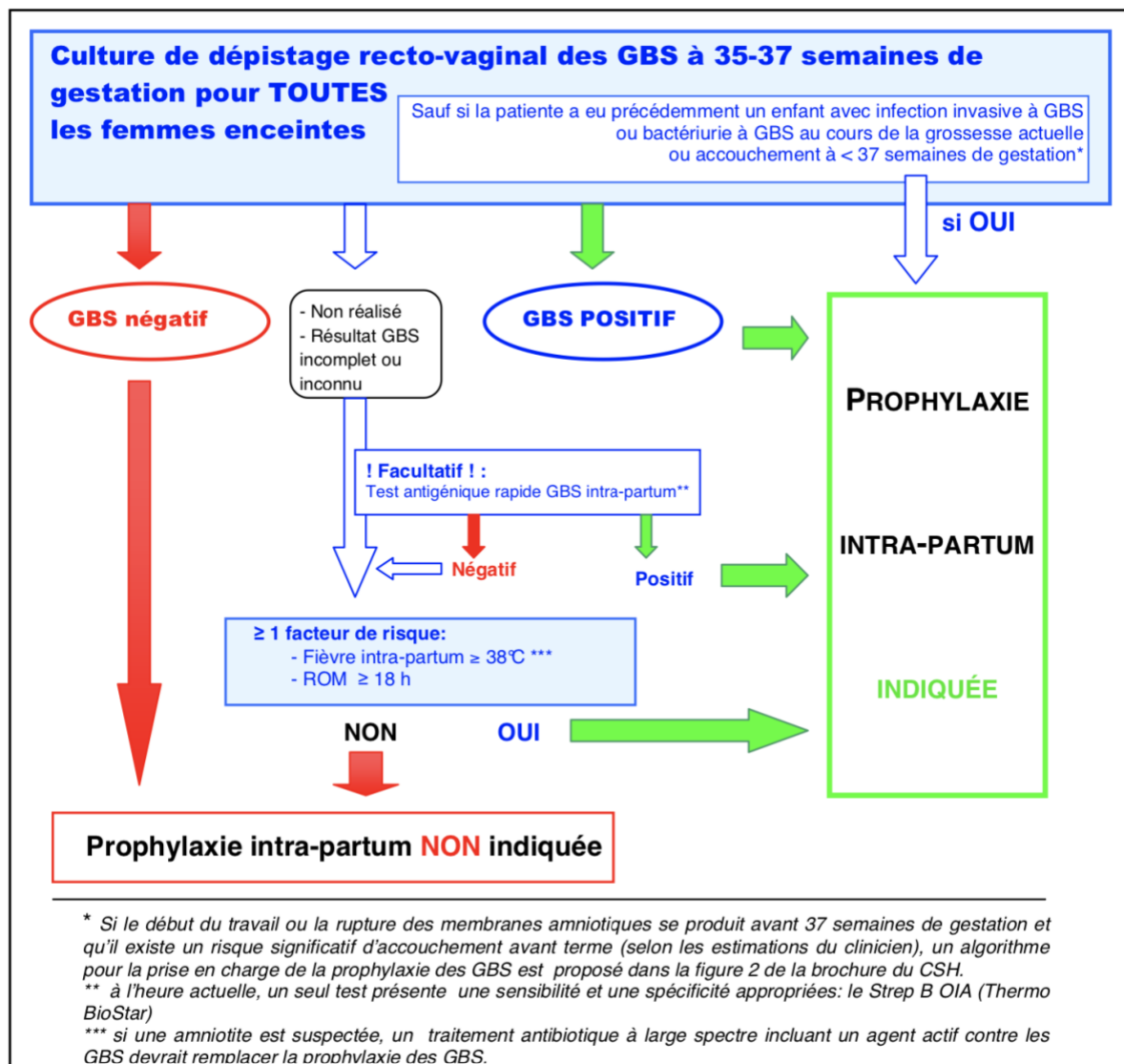


Figure 5 : schéma de la stratégie de prévention émise par le CSH [84]

5.8. LA VACCINATION

Malgré les stratégies de prévention, l'infection à GBS demeure la cause principale des infections néonatales invasives. Les inconvénients liés à l'utilisation d'une antibioprophylaxie chez la femme enceinte empêchent l'éradication de l'infection. Cette démarche mise en place par les organisations de la santé n'est pas efficace à 100% sur les formes précoces de l'infection, voire sans effet sur l'infection contractée tardivement. L'alternative envisageable est l'immunoprophylaxie active ou la vaccination chez la femme enceinte. L'avantage de cette nouvelle approche est double. [85] D'une part, elle protège la femme enceinte de toute complication due à la colonisation vaginale par le GBS. D'autre part, elle favorise l'immunisation passive, c'est-à-dire le transfert des anticorps maternels au fœtus durant principalement le troisième trimestre de grossesse. [86]

La vaccination représente ainsi un moyen prophylactique prometteur pour le combat des infections à streptocoques du groupe B tant au niveau des EOD que des LOD. Elle serait aussi une alternative pour prévenir les infections invasives chez les adultes vulnérables.

Actuellement, aucun vaccin n'est commercialisé au vu de la difficulté à mettre en place un produit universel. En effet, la distribution des sérotypes capsulaires varie selon la géographie dans le monde, ce qui complique le développement d'un vaccin global ciblant les polysaccharides capsulaires. [87] Une seconde stratégie, basée sur l'utilisation d'un vaccin ciblant simultanément les trois types de protéines pili, semble favoriser une couverture vaccinale plus large et ainsi une protection à grande échelle [88]. Pour l'instant, de nombreux candidats vaccins sont en cours de développement.

6. LE SÉQUENÇAGE DU GÉNOME

Apparu dans les années septante, le séquençage est une avancée technologique qui consiste à identifier l'ordre d'enchaînement des nucléotides prenant part à la structure de l'ADN. En effet, cette structure est constituée d'une longue chaîne en double hélice caractérisée par une succession variable de quatre nucléotides : l'adénine, la thymine, la cytosine et la guanine. Ils sont respectivement symbolisés par les lettres A, T, C et G. Ce code renferme toute l'information génétique nécessaire au fonctionnement et au développement de l'hôte. L'intérêt principal du séquençage repose sur l'étude des gènes composant le génome dans le but d'y déterminer son influence dans l'apparition d'une pathologie. Utile pour mettre en

évidence la présence de mutations sur les gènes, le séquençage sert également à déterminer la fonction protéique, grâce à la traduction *in silico* du gène en séquence protéique. La médecine génomique contribue à la mise en place d'une médecine personnalisée. De nos jours, elle constitue un outil davantage utilisé en pratique médicale hospitalière pour le diagnostic, le traitement ainsi que la prévention de certaines maladies comme le cancer. Dans le domaine de la microbiologie médicale, elle représente un enjeu de taille pour l'étude des maladies infectieuses. Dans un premier temps, le séquençage du génome bactérien permet l'identification de la souche impliquée dans l'infection. Au-delà de cette pratique identitaire, la connaissance du génome a un intérêt dans la détection des gènes codant pour les facteurs de virulence et les gènes de résistance aux antibiotiques. En outre, il favorise aussi la mise en évidence des mutations qui confèrent une résistance à un antibiotique. Ces champs d'application liés à l'utilisation de la séquence génomique contribuent à l'investigation des épidémies et des recherches scientifiques attachées à l'évolution de l'infection. En d'autres termes, le séquençage du génome se résume à un décryptage de la carte d'identité biologique de l'agent infectieux. Historiquement, les premières méthodes de séquençage de l'ADN sont apparues à la fin des années 1970 avec la technique de Frederick Sanger qui fut la plus employée. [89, 90]

Historiquement, les premières méthodes de séquençage de l'ADN sont apparues à la fin des années 1970 avec la technique de Frederick Sanger qui fut la plus employée. [89, 90]

6.1. LA MÉTHODE DE SANGER

Le principe de la méthode employée par le biochimiste britannique Frederick Sanger repose sur le processus de réplication de l'ADN fondé sur la complémentarité des bases. La particularité de cette technique s'appuie sur l'utilisation de 2',3'-didéoxynucléotides (ddNTP) qui sont des désoxyribonucléotides modifiées possédant un atome d'hydrogène sur le carbone 3' du ribose. L'absence du groupement hydroxyde (OH) sur ce carbone empêche la formation d'une liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant. Ainsi, ils sont capables de s'incorporer dans le brin en synthèse mais à chaque incorporation de ddNTP, l'élongation de la chaîne est stoppée. [89](Fig. 6)

En pratique, quatre réactions doivent avoir lieu. Chaque tube réactionnel est dédié à un type de nucléotide. Une faible proportion des quatre ddNTP marqués spécifiquement par un

fluorochrome sont ajoutés aux différents mélanges. À la fin de la méthode, les fragments générés, de tailles différentes, migrent par électrophorèse capillaire qui les sépare en fonction de leur taille. Après l'excitation des fluorochromes par un laser, la séquence en 5' vers 3' pourra être déterminée sur base des couleurs émises.

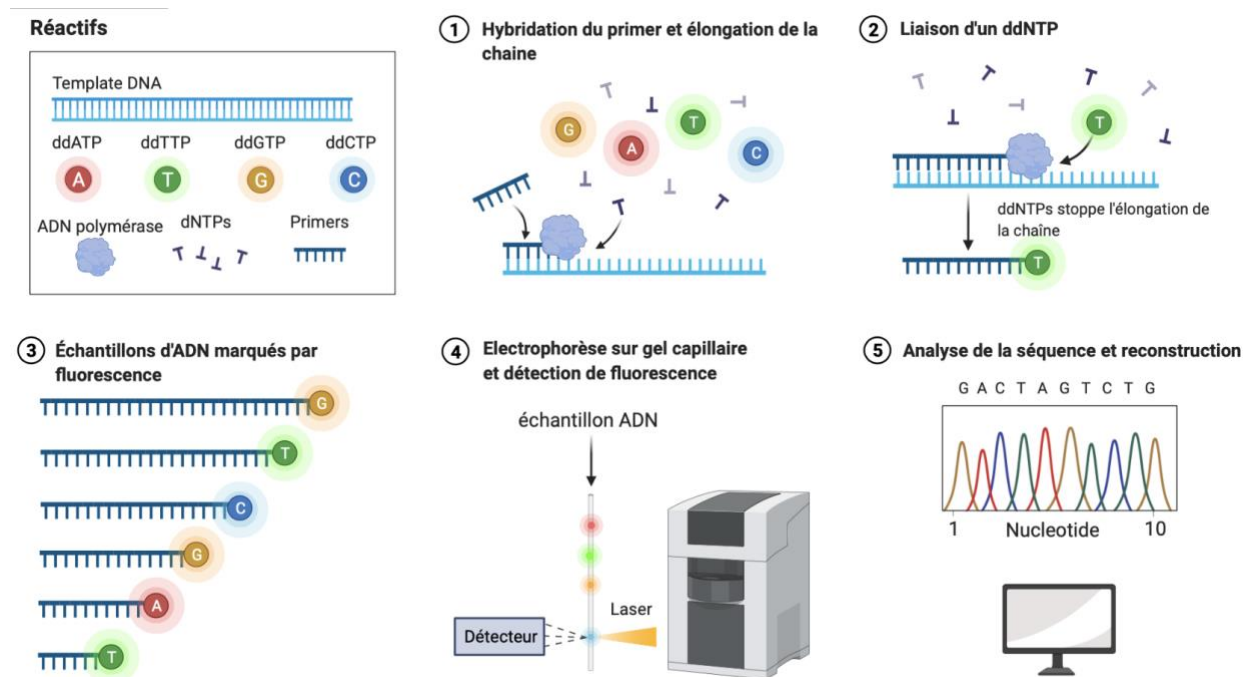


Figure 6 : principe général de la méthode de Sanger [19]

6.2. LE SÉQUENÇAGE À HAUT DÉBIT OU NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

Le Next Generation Sequencing (NGS) est un séquençage à haut débit de deuxième génération qui permet de séquencer simultanément le génome bactérien de plusieurs échantillons. La technique comprend quatre grandes étapes [91] (Fig. 7) :

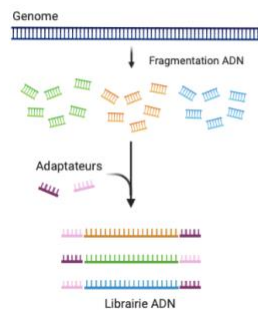
- 1) La première étape consiste à préparer la librairie. Une fragmentation aléatoire de l'ADN génomique conduit à la formation de nombreux petits fragments de 150-300 pb, auxquels sont attachés des adaptateurs à leurs extrémités 3' et 5'. Pour fractionner l'ADN, deux méthodes sont possibles. La première repose sur la fragmentation par sonication en envoyant des ultrasons sur l'ADN. La seconde stratégie fait intervenir des enzymes de restriction qui coupent au niveau de séquences spécifiques de l'ADN.

- 2) L'amplification des fragments par PCR. La banque de fragments générés est placée sur une « flow cell » sur laquelle se trouvent des séquences complémentaires aux adaptateurs. Ceux-ci, servant de point de départ à la PCR, favorisent ainsi l'enrichissement des fragments et la formation des clusters de brins identiques.
- 3) L'étape suivante est le séquençage par synthèse qui nécessite des nucléotides couplés spécifiquement à un fluorochrome. Le premier cycle débute par l'ajout d'un nucléotide par l'ADN polymérase. Après l'excitation par un laser, la fluorescence émise est récupérée sous forme d'une photo prise par le séquenceur. C'est ainsi que la première base du fragment est lue. Plusieurs cycles sont nécessaires afin de déterminer l'enchaînement des nucléotides de tous les fragments. Le nombre de cycles dépend de la taille des fragments générés puisque qu'un seul nucléotide est ajouté par cycle. Ce processus est effectué en parallèle pour toutes les séquences amplifiées. En résumé, la synthèse du fragment se fait en prenant une photo à chaque nucléotide (A, T, C, G) incorporé qui est couplé à un fluorochrome.
- 4) L'assemblage des séquences est l'étape finale. Le séquenceur fournit à la fin du run un fichier FastQ contenant les séquences de tous les fragments d'ADN avec le « Q score ». Ce dernier est un score de qualité qui évalue la fidélité du séquençage. De plus, des paramètres comme la couverture² et la profondeur³ de séquençage, sont également fournis. L'alignement des séquences nécessite l'action de la bioinformatique afin de générer la séquence entière du génome. Pour aligner toutes les pièces du puzzle, deux méthodes sont envisageables. La première, principalement employée pour le séquençage du génome humain, consiste à aligner les séquences à partir d'un génome de référence. Cependant, dans le cas où le génome de l'organisme séquencé est inconnu, la méthode de l'assemblage *de novo* est appliquée. Elle se base sur le chevauchement des séquences.

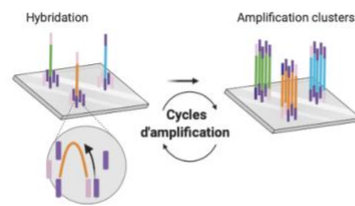
² La couverture de séquençage correspond au pourcentage de nucléotides séquencés par rapport à ceux ciblés.

³ La profondeur donne une indication sur le nombre de séquences obtenues pour une position donnée.

① Préparation de la librairie

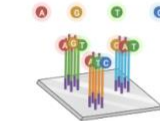


② Amplification par PCR



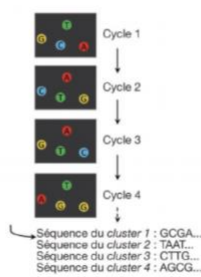
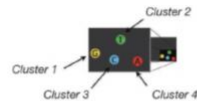
③ Séquençage par synthèse

Nucléotides couplés à un fluorochrome



Cycles de séquençage

Collecte des données



④ Alignement et analyse des données

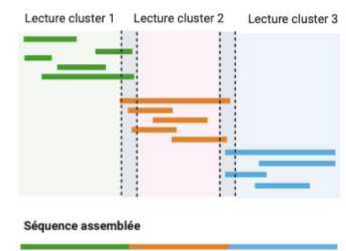


Figure 7 : principe général du NGS [19]

II. Matériel et méthodes

1. LES SOUCHES CLINIQUES DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Afin de mener à bien l'objectif de ce travail de fin d'études, 37 souches de GBS ont été sélectionnées dans la collection du CNR. Celles-ci, conservées dans du lait écrémé à -80°C, provenaient de deux études réalisées en 2018, une dans le cadre d'une surveillance épidémiologique pour les souches de colonisation vaginale, et l'autre pour une analyse approfondie de cas d'infections invasives. À leur arrivée au CNR, les souches sont analysées par diverses méthodes (caractérisation par culture, Maldi-Tof, antibiogramme...), puis mises en souchothèque pour des études ultérieures. Dans le cadre de ce travail, aucun critère de sélection strict n'a été pris en compte en ce qui concerne le choix des souches. Le mot d'ordre reposait sur une diversité des profils d'infection et la présence de divers facteurs tels que les gènes de résistance ou des profils de protéines pili.

1.1. LES CARACTERISTIQUES DES SOUCHES

Parmi les 37 souches participant à l'étude,

- 14 souches provenaient de la colonisation vaginale chez des femmes enceintes à 35-37 semaines de gestation
- 5 souches provenaient d'hommes âgés de 46 à 90 ans et 10 souches de femmes âgées de 28 à 86 ans. Ces souches étaient à l'origine de bactériémies, endocardites et des infections de la peau. Elles ont été isolées à partir de sang ou LCR.
- 6 souches provenaient de nourrissons âgés de 1 à 112 jours. Ces bébés présentaient des manifestations cliniques caractéristiques des EOD et LOD, comme une bactériémie ou méningite. Les souches ont été isolées à partir du sang ou LCR.

Le tableau reprenant les caractéristiques des souches utilisées est disponible en annexe 1.

1.1. LA MISE EN CULTURE

L'ensemencement des souches à partir du lait congelé est réalisé sur une gélose Columbia avec 5% de sang de mouton, à l'aide de la méthode des stries. Celle-ci permet d'isoler des colonies distinctes à partir d'un inoculum prélevé de l'échantillon clinique. L'étalement de l'inoculum par des mouvements de va-et-vient, suivi de stries parallèles dilue progressivement l'échantillon par un épuisement mécanique. Étant au départ nombreuses et confluentes, l'analyse des colonies est rendue difficile sans cette méthode. La culture microbienne a également pour avantage de permettre le repiquage des souches bactériennes pour avoir des cultures fraîches avant la réalisation d'une méthode.

1.1.1. MODE OPERATOIRE

Matériel et équipements :

- Gélose Columbia avec 5% de sang de mouton, Biomérieux SB (réf. 43049)
- Oèses stériles calibrées à 1 µL, VWR (réf. 612-9356P)
- Écouvillons Classiq Swabs™, COPAN Italia SpA (réf. SOC-CO132020)
- Le DensiCHEK plus, Biomérieux (réf. 21250)
- Tubes en verre de 5 mL, 75 x 12 mm, PS, Sarstedt Ag&Co.KG, Germany
- Bouchons : Capes à ailettes PEBD, diamètre 10 mm, Gosselin, France
- Incubateur à 35°C contenant 5 à 7% de CO₂

Les(s) réactif(s) :

- Solution saline stérile (NaCl 0,45%, pH 4,5-7,0), Biomérieux SA (Réf. V1204)

Après avoir décongelé les souches stockées à -80°C dans la souchothèque, l'inoculum prélevé à l'aide d'une oèse de 1 µL est déposé par la méthode des stries (Fig. 8). La dernière étape de l'inoculation consiste à incuber la boîte de pétri couvercle vers le bas à 35°C dans un incubateur contenant 5 à 7% de CO₂, pendant 18 à 24 heures.

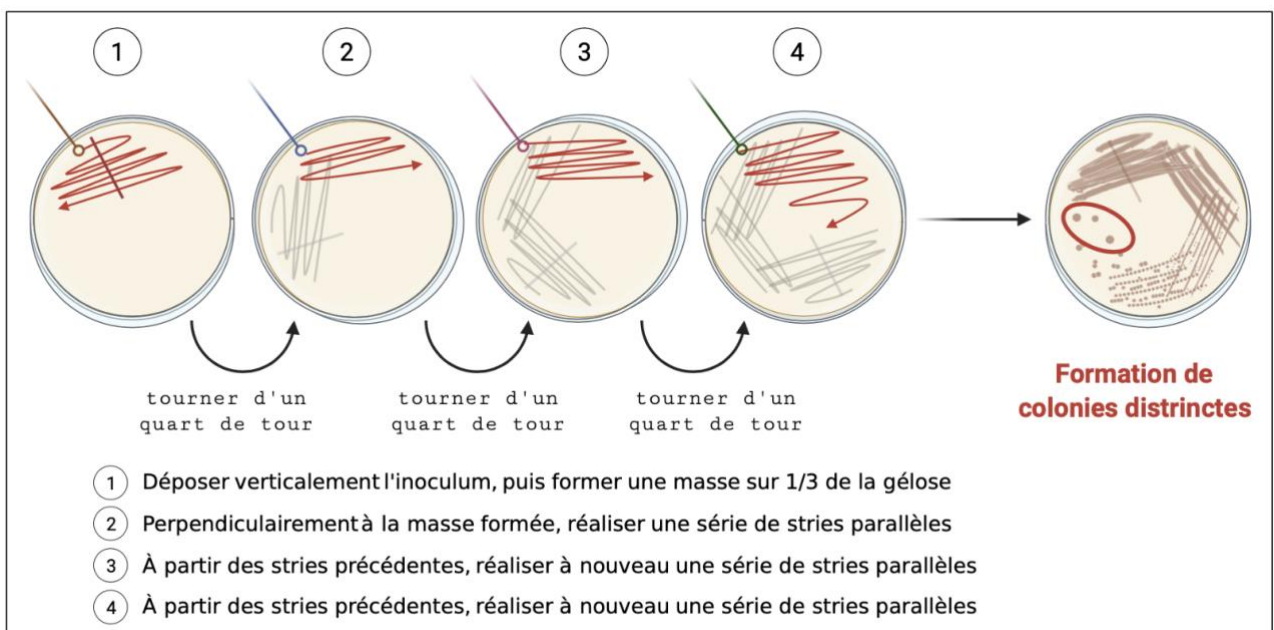


Figure 8 : le principe de la méthode des stries

2. LES PCR CONVENTIONNELLES

2.1. L'EXTRACTION DE L'ADN AUTOMATISEE

2.1.1. LE PRINCIPE [92, 93, 94]

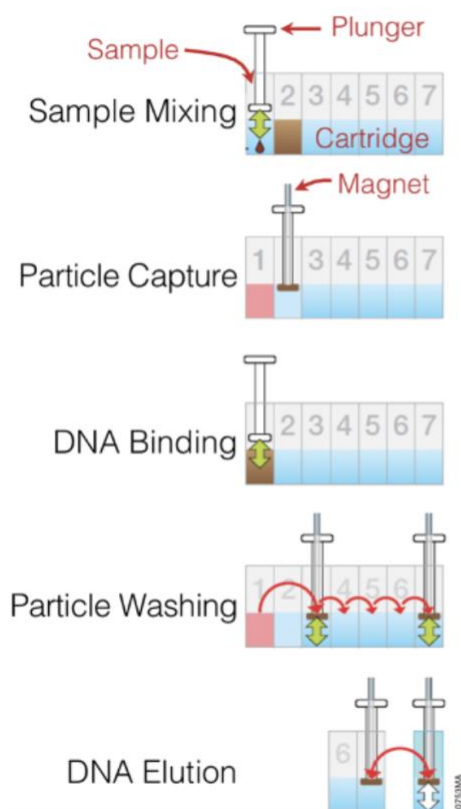
L'extraction de l'ADN permet d'isoler les molécules d'ADN contenues dans un micro-organisme, une cellule ou un tissu. Il s'agit d'une étape essentielle dans l'étude du génome qui comporte l'ensemble du matériel génétique. Dans le cas des méthodes utilisées par le CNR, l'extraction est effectuée de manière automatisée grâce à l'automate Maxwell®16, provenant de la firme Promega. Cet automate permet d'extraire l'ADN génomique de 16 échantillons simultanément, à partir d'une suspension bactérienne. Des cartouches pré-remplies des réactifs combinés à l'action mécanique de pistons constitue la base du fonctionnement de l'appareil. (Fig.9)

Globalement, l'extraction se résume en quatre grandes étapes :

- 1) La lyse cellulaire. L'utilisation d'un agent chaotropique, ainsi qu'un détergeant favorise la destruction de la membrane cytoplasmique et la paroi bactérienne, ce qui contribue à la libération du contenu de la bactérie dont l'ADN génomique.
- 2) La purification de l'ADN est réalisée grâce à des particules magnétiques recouvertes de silice fonctionnalisée. Cette dernière chargée positivement, offre un site de liaison aux molécules d'ADN chargées négativement. Une fois l'ADN lié, il est séparé de la phase aqueuse à l'aide de tiges magnétiques qui attirent par une force d'attraction les billes magnétiques.
- 3) Le lavage des particules magnétiques. Afin d'éliminer les contaminants, tels que les protéines liées aux particules magnétiques, elles sont lavées successivement cinq fois dans un tampon de lavage.
- 4) L'élution de l'ADN extrait. Ce dernier est directement déposé grâce au système d'aimant dans un tampon d'élution contenant du NaCl. L'ion Na^+ ayant une plus grande affinité, entre en compétition avec la silice chargée positivement afin de décrocher l'ADN extrait.

L'automate Maxwell offre l'avantage d'extraire l'ADN de 16 échantillons à la fois pour une durée totale de 35 minutes. Avec des résultats constants entre les différents échantillons, l'ADN extrait est en quantité suffisante pour être directement utilisé pour des réactions de PCR.

Les étapes d'extraction du Maxwell



Vue d'ensemble de la cartouche

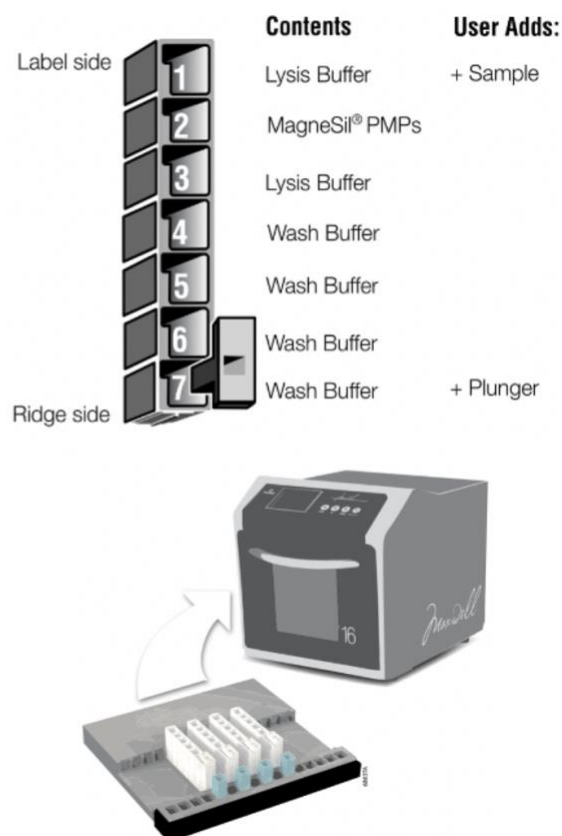


Figure 9 : illustration des étapes d'extraction et vue d'ensemble de la cartouche [92, 94]

2.1.2. LE MODE OPERATOIRE

Matériel et équipements :

- Le turbidimètre DensiCHECK plus, Biomérieux (réf. 21250)
- Écouvillons Classiq Swabs™, COPAN Italia SpA (réf. SOC-CO132020)
- Automate Maxwell®16, Promega (réf. AS1000)
- Kit de purification d'ADN Maxwell®16 Cell DNA, Promega (réf. AS1020).
- Vortex VWR International (réf. 444-1372)
- Microtubes 1,5 mL Sarstedt AG&Co. KG
- Micropipette L1000 (100-1000 µL), Rainin, Pipet-Lite
- Tips 1000 µL: Rainin, Bioclean Ultra™, LR, Filter Sterilized, Mettler Toledo

Le(s) réactif(s) :

- Solution saline stérile (NaCl 0,45%, pH 4,5-7,0), Biomérieux SA (réf. V1204)

Les échantillons utilisés : les 37 échantillons de ce TFE

Le(s) contrôle(s) : un contrôle négatif, contenant uniquement la solution saline afin de s'assurer de l'absence de contamination. Ce contrôle sera vérifié lors de l'étape d'amplification par PCR.

Avant l'extraction proprement dite, une suspension bactérienne à partir d'une culture fraîche est réalisée. Pour cela, les colonies isolées sur une gélose au sang sont mises en suspension

dans une solution saline jusqu'à l'obtention d'un liquide trouble avec une turbidité de minimum deux McFarland, mesurée au moyen du DensiCHECK plus. Ces colonies sont prélevées à l'aide d'un écouvillon. Après avoir vortexé l'échantillon, 400 µL de celui-ci sont déposés dans le premier compartiment de la cartouche. Une fois les échantillons déposés dans les cartouches, elles sont placées dans l'automate en veillant à bien suivre le mode de placement. Ensuite, 300 µL du tampon d'élution sont déposés dans la cupule bleue placée devant les cassettes. Celle-ci est destinée à accueillir l'ADN extrait lors du processus d'extraction. La dernière étape avant le lancement du run est le placement d'un plongeur dans le septième puit de la cassette. Le programme adéquat, une fois lancé, dure 35 minutes. Un volume de 300 µL d'ADN extrait est déposé dans des tubes destinés aux étapes d'amplification ultérieures. L'ADN extrait est conservé à -20 °C pour une meilleure stabilité du produit.

2.2. LA PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique de biologie moléculaire, nécessaire à l'amplification du matériel génétique in vitro.

Dans le cadre de ce travail de fin d'études, quatre types de réactions de PCR ciblant chacune des gènes spécifiques seront réalisés. Ces réactions d'amplification sont caractérisées par le principe de la PCR multiplex, c'est-à-dire que plusieurs cibles sont amplifiées simultanément en une seule réaction. Le tube réactionnel comporte ainsi tous les réactifs nécessaires à l'amplification des différents amplicons. À la différence de la PCR multiplex, la PCR simplex amplifie une cible à la fois avec un mix réactionnel comportant un seul couple d'amorces. La figure 10 illustre les différents types de PCR employés dans le cadre de ce TFE.

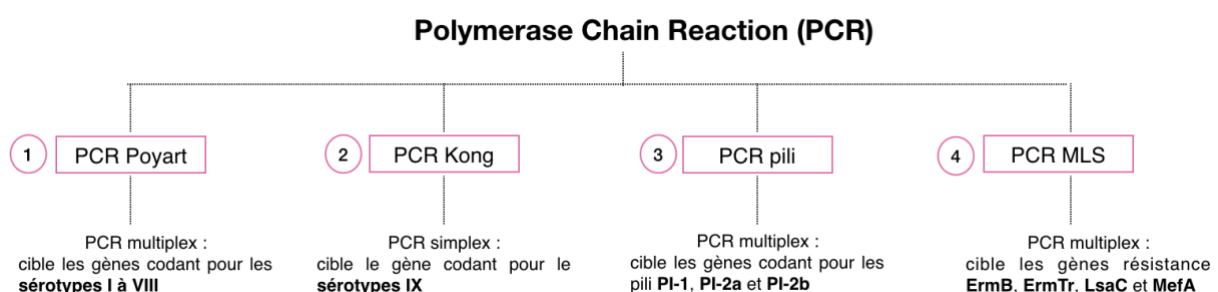


Figure 10 : les types de PCR réalisés dans le cadre de ce TFE

2.2.1. LA PCR POYART

2.2.1.1. LE MODE OPERATOIRE DE LA PCR POYART

Objectif : la PCR Poyart (basée sur la méthode de Poyart et al. 2007 [95]) a pour intérêt de cibler les gènes codant pour les sérotypes capsulaires Ia, Ib, II à VIII. En combinaison à cette méthode, la PCR établie sur base du protocole de Fanrong Kong sera utilisée afin de détecter le sérotype IX.

Les échantillons utilisés : les 37 échantillons cliniques de ce TFE

Les contrôles :

- Deux contrôles positifs de souche de référence de *S. agalactiae* provenant de l'étude européenne DEVANI
 - La souche EQA2-1 présente un sérotype II
 - La souche EQA2-11 présente un sérotype V
- Un contrôle négatif correspond à solution saline ayant subi l'étape d'extraction mais dans laquelle aucune colonie bactérienne n'a été ajoutée

Les contrôles sont essentiels pour valider le bon déroulement de la réaction.

Matériel et équipements :

- Micropipettes L10 (0,5-10 µL), L20 (2-20 µL), L100 (10-100 µL), L200 (20-200 µL) et L1000 (100-1000 µL) : Rainin, Pipet-Lite
- Tips 20 µL, 200 µL et 1000 µL, Rainin, Bioclean Ultra™, LR, Filter Sterilized, Mettler Toledo
- Tubes pour PCR: Multiply® µStrip Pro Farbmix/mix.colour, Sarstedt AG&Co, 0,2 mL
- Tubes pour réaction : Greiner Bio-One GmbH, 1,5 - 2 mL (réf. 616201)
- Portoir pour les tubes PCR
- Vortex VWR International (réf. 444-1372)
- Thermocycler: Veriti 96 puits, Applied biosystem by Thermo Fisher Scientific (réf. 4375786)
- Minicentrifugeuse: The Butterfly™ Rotor Patent Pending. (réf. T465.1)

Les réactifs :

- 2x Qiagen multiplex PCR master mix (Réf: 206143) contient:
 - L'ADN polymerase HotStarTaq
 - dNTPs
 - Un tampon contenant du K⁺, NH₄⁺ et le facteur MP qui augmentent la concentration locale des primers
- Eau stérile
- Les amorces ou primers reverse et forward, Integrated DNA Technologies (IDT), 100 µM dans un tampon IDTE (Cf. Tableau 5)

Tableau 5 : liste des amorces utilisées pour la PCR Poyart avec les caractéristiques

Amorce	Séquence nucléotidique (5' vers 3')	Gène	Taille (pb)	Tm (°C)
Ia F	GGTCAGACTGGATTAATGGTATGC	cps1aH	521 & 1826	58
Ia R	GTAGAAATAGCCTATATACGTTGAATGC			55
Ib F	TAAACGAGAATGGAATATCACAAACC	cps1bJ	770	55
Ib R	GAATTAACCTCAATCCCTAAACAATATCG	cps1bK		54
II F	GCTTCAGTAAGTATTGTAAGACGATAG	cps2K	397	55
II R	TTCTCTAGGAAATCAAATAATTCTATAGGG			54
III F	TCCGTACTACAACAGACTCATCC			58

III R	AGTAACCGTCCATACATTCTATAAGC	cps1a/2/3I	1826	56
IV F	GGTGGTAATCCTAAGAGTGAAGTGT	cps4N	578	58
IV R	CCTCCCCAATTCGTCCATAATGGT			62
V F	GAGGCCAATCAGTTGCACGTAA	cps5O	701	61
V R	AACCTTCTCCTTCACACTAATCCT			58
VI F	GGACTTGAGATGGCAGAAGGTGAA	cps6I	487	62
VI R	CTGTCGGACTATCCTGATGAATCTC			59
VII F	CCTGGAGAGAACAAATGTCCAGAT	cps7M	371	59
VII R	GCTGGTCGTGATTTCTACACA			57
VIII F	AGGTCAACCACTATATAGCGA	cps8J	282	55
VIII R	TCTTCAAATTCGCTGACTT			54

Légende : F = forward ; R= reverse ; pb = paire de bases ; Tm = température de fusion

Les étapes préliminaires de la PCR Poyart:

Tableau 6 : préparation du 1^{er} mix primers 10x (volume final 500 µL)

Primers: Ia-R, Ia-F, Ib-R, Ib-F, II-R, II-F, III-R, III-F, IV-R, IV-F (100 µM)	20 µL/primer
Eau (H ₂ O)	300 µL

Tableau 7 : préparation du 2^e mix primers 10x (volume final 500 µL)

Primers: V-R, V-F, VI-R, VI-F, VII-R, VII-F, VIII-R, VIII-F (100 µM)	20 µL/primer
Eau (H ₂ O)	300 µL

Tableau 8 : préparation du mix réactionnel sur base du mix 1 et Mix 2

Réactifs	Volume pour une réaction
2x qiagen multiplex PCR master mix	20 µL
10x primer mix 1	2,5 µL
10x primer mix 2	2,5 µL
Eau (H ₂ O)	10 µL

Le volume pour une réaction sera multiplié par le nombre d'échantillons (n) plus le nombre de contrôles plus deux. Par sécurité, on prélève plus afin d'avoir suffisamment de volume pour réaliser le run. Par ailleurs, plusieurs run ont été lancés sur plusieurs jours au vu du nombre d'échantillons.

2.2.1.2. LE PROTOCOLE DE LA PCR POYART

Après avoir décongelé tous les réactifs (sauf la taq polymérase), préparer les mix requis pour la réalisation de la méthode (Cf. les étapes préliminaires tableaux 6-7-8). Veiller à bien homogénéiser chaque réactif. Une fois que les microtubes destinés à la PCR sont annotés, déposer 40 µL du mix réactionnel dans chaque tube. Puis, ajouter 10 µL de l'échantillon ou le contrôle dans le tube correspondant. Lorsque les tubes sont centrifugés quelques secondes, ils sont déposés dans le thermocycleur dans lequel le programme adéquat est lancé (Cf. Tableau

9). L'étape finale consiste à visualiser les résultats de l'amplification sur un gel d'électrophorèse composé de 2% d'agarose (cf. la section 2.3. dans matériels et méthodes).

Tableau 9 : les paramètres du programme de la PCR Poyart

Étape	Température	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation 1	95°C	15 minutes	1
Dénaturation 2	94°C	30 secondes	35
Hybridation	55°C	1 minute	
Élongation	72°C	2 minutes	
Conservation	4°C	/	/

2.2.1.3. L'INTERPRETATION DES RESULTATS POUR LA PCR POYART

La PCR Poyart, conçue à partir d'un modèle de PCR multiplex, a pour atout de détecter en une réaction les sérotypes I à VIII. Ceux-ci sont décelés à chaque souche après une analyse des amplicons sur un gel électrophorétique. L'interprétation des résultats se base sur la taille des fragments amplifiés. Ces derniers sont exposés dans le tableau des amorces utilisés pour la PCR Poyart (Cf. Tableau 5).

2.2.2. LA PCR KONG

2.2.2.1. LE MODE OPERATOIRE DE LA PCR KONG

Objectif : la PCR multiplex selon la méthode de Kong et al. [96], cible spécifiquement le sérotype capsulaire IX.

Les échantillons utilisés : les 37 échantillons cliniques de ce TFE

Les contrôles :

- Un contrôle positif de souche de référence de *S. agalactiae* provenant de l'étude européenne DEVANI : la souche EQA2-7 présente un sérotype IX
- Un contrôle négatif correspond à la solution saline ayant subi l'étape d'extraction mais dans laquelle aucune colonie bactérienne n'a été ajoutée

Les contrôles sont essentiels pour valider le bon déroulement de la réaction.

Équipements : Cf équipements de la PCR Poyart

Les réactifs :

- Eau stérile
- Applied Biosystem™ 10x PCR Buffer II sans de MgCl₂ (réf.2097257)
- Applied Biosystem™ solution de MgCl₂ (chlorure de magnésium) (réf.2135007)
- dNTP 25mM, Biolabs (réf. N0443S)
- Applied Biosystem™ AmpliTaq® DNA Polymerase 1000 units, 5 U/μL (réf.2094063)
- Primers IX-SI et IX-A, Integrated DNA Technologies (IDT), 100 μM dans un tampon IDTE 100 μM (Cf. tableau 10)

Tableau 10 : Liste des amorces utilisées pour la PCR Kong avec les caractéristiques

Amorce	Séquence nucléotidique (5' vers 3')	Gène	Taille (pb)	Tm (°C)
IX-S1	GTCAT TTA CAA CTT GTA GAC GGC	cpsH	346	56,2
IX-A	GCC ATA TCA GAG CAA ATA TGT CAT ATA TC			53,9

Légende : F = forward ; R= reverse ; pb = paire de bases ; Tm = température de fusion

Tableau 11 : les étapes préliminaires pour la préparation du mix réactionnel pour la PCR Kong

Réactifs	Volume pour une réaction
Tampon PE 10x	2,5 µL
MgCl ₂ (25mM)	2,5 µL
dNTP (25 mM)	0,2 µL
Primer IX-S1 (100 µM)	0,5 µL
Primer IX-A (100 µM)	0,5 µL
Amplitaq DNA polymerase (5U/µL)	0,125 µL
Eau (H ₂ O)	14,175 µL

Le volume pour une réaction sera multiplié par le nombre d'échantillons (n) plus le nombre de contrôles plus deux.

2.2.2.2. LE PROTOCOLE DE LA PCR KONG

Cf. le protocole de la PCR Poyart sauf pour les étapes préliminaires (tableau 11). Dans le cas de la PCR Kong, 20 µL du mix sont déposés dans les microtubes, suivis d'un ajout de 5 µL de l'ADN à amplifier. Le tableau 12 reprend les paramètres adéquats pour le programme au thermocycleur.

Tableau 12 : les paramètres du programme de la PCR Kong

Étape	Température	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation 1	95°C	15 minutes	1
Dénaturation 2	94°C	30 secondes	35
Hybridation	55°C	1 minute	
Élongation 1	72°C	2 minutes	
Élongation 2	72°C	7 minutes	1
Conservation	4°C	/	/

2.2.2.3. L'INTERPRETATION DES RESULTATS POUR LA PCR KONG

Cf. Tableau 10 qui comporte les amorces utilisées afin de connaître la taille des fragments amplifiés par ce type de PCR.

2.2.3. LA PCR PILI

2.2.3.1. LE MODE OPERATOIRE DE LA PCR PILI

Objectif : la PCR pili est une PCR multiplex qui sert à détecter les gènes codant pour les protéines pili (PI-1, PI-2a et PI-2b), ainsi qu'un gène ubiquitaire, l'alcool déshydrogénase (AdhP). Cette dernière est une protéine hautement conservée, présente en permanence dans tous les GBS et utilisée en tant que contrôle interne de la réaction PCR.

Les échantillons utilisés : les 37 échantillons cliniques de ce TFE

Les contrôles :

- Trois contrôles positifs de souche de référence de *S. agalactiae*:
 - La souche BEPW064 exprime les gènes PI-1 et PI-2a
 - La souche BEPW065 exprime les gènes PI-1 et PI-2b
 - La souche BEPW069 exprime le gène PI-2a
- Un contrôle négatif correspond à la solution saline ayant subi l'étape d'extraction mais dans laquelle aucune colonie bactérienne n'a été ajoutée
- Un contrôle de charge permet de s'assurer que l'échantillon a correctement été déposé dans le puit. Il s'agit d'un gène ubiquitaire, hautement conservé et exprimé en permanence dans toutes les souches bactériennes. Dans ce cas-ci, ce gène est celui codant pour l'alcool déshydrogénase.

Les contrôles sont essentiels pour valider le bon déroulement de la réaction.

Équipements : Cf équipements de la PCR Poyart

Les réactifs : Cf les réactifs de la PCR Kong sauf pour les primers (tableau 13)

Tableau 13 : liste des amorces utilisées pour la PCR pili avec les caractéristiques

Amorce	Séquence nucléotidique (5' vers 3')	Taille (pb)	Tm (°C)
AdhP F	ACG CAT TTT GGG TCA CGA	783	55
AdhP R	GTA TCC ACA GGC ACT TTT TCA AAC		54,5
PI-1 F	CTA CCA ACG GCC AAG CTA TTT ACC	394	57,8
PI-1 R	TAG CCG CTT TTT CAT TCT TTC TCC		55,7
PI-2a F	AAC TCC CTA TAT TTG CAG GTT CAA	243	54,3
PI-2a R	CGG GTG TAA CGA CTT TTA TCT GAT		54,8
PI-2b F	GGG GGT AGG CTT AAT GGC TTAT	519	56,6
PI-2b R	TCC GGT TTA ACT GTT CTG ATT TGA T		54,7

Légende : F = forward ; R= reverse ; pb = paire de bases ; Tm = température de fusion

Tableau 14 : les étapes préliminaires pour la préparation du mix réactionnel pour la PCR pili

Réactifs	Volume pour une réaction
Buffer II 10x	5 µL
MgCl ₂ (25mM)	7 µL
dNTP (25 mM)	0,4 µL
Primer adhP F (10 µM)	0,5 µL
Primer adhP R (10 µM)	0,5 µL
Primer PI-1 F (10 µM)	0,5 µL
Primer PI-1 R (10 µM)	0,5 µL
Primer PI-2a F (10 µM)	0,5 µL
Primer PI-2a R (10 µM)	0,5 µL
Primer PI-2b F (10 µM)	0,5 µL
Primer PI-2b R (10 µM)	0,5 µL
Amplitaq DNA polymerase (5U/µL)	0,25 µL
Eau (H ₂ O)	23,35 µL

Le volume pour une réaction sera multiplié par le nombre d'échantillons (n) plus le nombre de contrôles plus deux.

2.2.3.2. LE PROTOCOLE DE LA PCR PILI

Le protocole est similaire à celui de la PCR Poyart à l'exception de la préparation du mix réactionnel (Tableau 14)

Dans le cas de la PCR pili, la réaction dure 2 heures 8 minutes. Le tableau 15 reprend les paramètres du thermocycleur.

Tableau 15 : les paramètres du thermocycleur pour la PCR pili

Étape	Température	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation 1	94°C	10 minutes	1
Dénaturation 2	92°C	1 minute	35
Hybridation	53°C	1 minute	
Élongation 1	72°C	30 secondes	
Élongation 2	72°C	7 minutes	1
Conservation	4°C	/	/

2.2.3.3. L'INTERPRETATION DES RESULTATS POUR LA PCR PILI

Cf. Tableau 13 qui comporte les amorces utilisées afin de connaître la taille des fragments amplifiés par ce type de PCR.

2.2.4. LA PCR MLS

2.2.4.1. LE MODE OPERATOIRE DE LA PCR MLS

Objectif : La PCR MLS est une PCR multiplex qui cible quatre gènes de résistance aux macrolides et lincosamides (ErmB, ErmTr, MefA et LsaC). Le gène ubiquitaire AdhP sera également utilisé en tant que contrôle interne pour cette PCR

Les échantillons utilisés : les 37 échantillons cliniques de ce TFE

Les contrôles :

- Quatre contrôles positifs de souche de référence de *S. agalactiae*:
 - La souche B186 exprime le gène ErmB
 - La souche B1812 exprime le gène ErmTr
 - La souche B1827 exprime le gène MefA
 - La souche B18168 exprime le gène LsaC
- Un contrôle négatif correspond à la solution saline ayant subi l'étape d'extraction mais dans laquelle aucune colonie bactérienne n'a été ajoutée
- Un contrôle de charge permet de s'assurer que l'échantillon a correctement été déposé dans le puit. Il s'agit d'un gène ubiquitaire, hautement conservé et exprimé en permanence dans toutes les souches bactériennes. Dans ce cas-ci, ce gène est celui codant pour l'alcool déshydrogénase.

Les contrôles sont essentiels pour valider le bon déroulement de la réaction.

Équipements : Cf équipements de la PCR poyart

Les réactifs : Cf les réactifs de la PCR pili sauf pour les primers (tableau 16)

Tableau 16 : liste des amorces utilisées pour la PCR MLS avec les caractéristiques

Amorce	Séquence nucléotidique (5' vers 3')	Taille (pb)	Tm (°C)
AdhP F	ACG CAT TTT GGG TCA CGA	783	55
AdhP R	GTA TCC ACA GGC ACT TTT TCA AAC		54,5
LsaC F	GGC TAT GTZ AAA CCT GTA TTT G	429	49,5
LsaC R	ACT GAC AAT TTT TCT TCC GT		50
ErmTr F	TAA TAG AAA TTG GGT CAG GAA	299	48,6
ErmTr R	TTT AGC AAA TCC CCT CTC TA		50,3
MefA F	AGT ATC ATT AAT CAC TAG TCG	348	47,1
MefA R	TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG		49,6
ErmB F	GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA	640	47,9
ErmB R	AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TA		47,8

Légende : F = forward ; R= reverse ; pb = paire de bases ; Tm = température de fusion

Tableau 17 : les étapes préliminaires pour la préparation du mix réactionnel pour le PCR MLS

Réactifs	Volume pour une réaction
Buffer II 10x	5 µL
MgCl ₂ (25mM)	7 µL
dNTP (25 mM)	0,4 µL
Primer adhP F (10 µM)	0,5 µL
Primer adhP R (10 µM)	0,5 µL
Primer LsaC F (10 µM)	0,5 µL
Primer LsaC R (10 µM)	0,5 µL
Primer ErmTr F (10 µM)	0,5 µL
Primer ErmTr R (10 µM)	0,5 µL
Primer MefA F (10 µM)	0,5 µL
Primer MefA R (10 µM)	0,5 µL
Primer ErmB F (10 µM)	0,5 µL
Primer ErmB R (10 µM)	0,5 µL
Amplitaq DNA polymerase (5U/µl)	0,25 µL
Eau (H ₂ O)	23,35 µL

Le volume pour une réaction sera multiplié par le nombre d'échantillons (n) plus le nombre de contrôles plus deux.

2.2.4.2. LE PROTOCOLE DE LA PCR MLS

Le protocole est similaire à celui de la PCR Poyart à l'exception des étapes préliminaires (tableau 17).

Dans le cas de la PCR MLS, la réaction dure 2 heures 48 minutes. Le tableau 18 reprend les paramètres du thermocycleur pour la PCR MLS.

Tableau 18 : les paramètres du thermocycleur pour la PCR MLS

Étape	Température	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation 1	94°C	10 minutes	1
Dénaturation 2	92°C	1 minute	35
Hybridation	53°C	1 minute	
Élongation 1	72°C	30 secondes	
Élongation 2	72°C	7 minutes	1
Conservation	4°C	/	/

2.2.4.3. L'INTERPRETATION DES RESULTATS POUR LA PCR MLS

Cf. Tableau 16 qui comporte les amorces utilisées afin de connaître la taille des fragments amplifiés par la PCR MLS.

2.3. L'ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE.

Les segments d'ADN amplifiés par PCR sont visualisés grâce à une électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. Il s'agit d'une technique de séparation des fragments d'ADN en fonction de la taille de ceux-ci. En guise de référence, un marqueur de poids moléculaire composé de séquences d'acides nucléiques de taille connue, est utilisé afin d'estimer ceux des fragments d'intérêts.

2.3.1. LE PROTOCOLE POUR LA MIGRATION SUR UN GEL D'AGAROSE

Matériel et équipements :

- Micropipettes L10 (0,5-10 µL): Rainin, Pipet-Lite
- Tips 10 µL, Rainin, Bioclean Ultra™, LR, Filter Sterilized, Mettler Toledo
- Gel d'agarose 2%: bromure d'éthidium, 12 puits, Invitrogen G501802, Thermo Fisher Scientific
- Appareil d'électrophorèse (gel de 12 puits) : E-Gel Power Snap, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
- Caméra: Benchtop 2 UV™ Transilluminator, Biodoc-It™ Imaging System, Biorad
- Imprimante (Sony corporation)

Les réactifs :

- Eau stérile
- Marqueur de poids moléculaire : Quick-Load® 100 bp DNA Ladder (réf. NO467S), New England BioLabs® inc, 50 µL/mL

Après avoir placé le gel dans l'appareil, le peigne protégeant les puits est enlevé. Ensuite, 10 µL d'eau sont déposés dans les 12 puits avant d'y ajouter 10 µL des produits obtenus par PCR (chaque puit a une contenance de 20 µL). L'étape finale consiste à photographier le gel pour l'interprétation des bandes obtenues. Pour cela, il faut utiliser l'appareil UV relié à une caméra.

3. LE SÉQUENÇAGE À HAUT DÉBIT OU NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

3.1. L'EXTRACTION MANUELLE DE L'ADN

Le kit NucleoSpin Blood QuickPure kit de Macherey-Nagel (Réf. 740569.250) a été utilisé pour extraire l'ADN.

Composition du kit :

- Protéinase K
- Tampon de lyse BQ1 : Guanidine hydrochloride 50-66%
- Tampon de lavage BQ2
- Tampon d'éluion : 5 nM Tris/HCl, pH 8.5
- Tubes de collecte de 2 mL ou eppendorf
- Colonnes MB spin avec un filtre de silice
- Tubes collecteurs

Équipements à utiliser en plus du kit :

- Micropipettes L10, L200 et L1000, Rainin, Pipet-Lite
- Vortex VWR International
- Centrifugeuse Eppendorf 5415D Digital
- Bain à sec, Star lab
- Oèses VWR stériles calibrées à 1 µL
- Le DensiCHEK plus, Biomérieux
- Epprouvettes en verre 20 mL
- Bloc réfrigérant (-20°C à -1°C)

Réactifs à utiliser en plus du kit :

- Eau stérile
- Éthanol absolu 95-100%

Les étapes préliminaires :

- Dans un tube de 2 ml contenant des billes de verre de 0,5 mm de diamètre, ajouter 350 µl de solution de lyse et 10-20 µL d'une oèse de culture fraîche de 48 heures jusqu'à avoir une turbidité de minimum deux McFarland, mesurée au moyen du DensiCHECK plus.
- Faire passer le mélange cinq fois au vortex à 6000 vibrations/min pendant 1 minute. Entre chaque passage, le tube est refroidi dans un bloc réfrigérant pendant 1 min et puis chauffé à 70 °C au bain à sec (choc thermique).

Cette opération favorise la cassure de la capsule, la paroi et la membrane afin de libérer le contenu intracellulaire.

3.1.1. LE PROTOCOLE

- Préchauffer un bain à sec à 70 °C
- Préchauffer le tampon d'éluion à 70 °C

- Prélever 200 µL du lysat primaire (issu des étapes préliminaires), 25 µL de protéinase K et 200 µL de tampon de lyse BQ1. Homogénéiser le tout au vortex pendant 15 secondes. Puis incuber le mélange pendant 15 minutes à 70 °C
- Ajouter 200 µL d'éthanol absolu (96-100%) au lysat obtenu, passer 15 secondes au vortex puis à la centrifugation short-spin pendant 10 secondes jusqu'à 11,000xg afin d'accélérer la précipitation des protéines
- Récupérer délicatement le surnageant, puis l'appliquer dans la colonne chromatographique avec la membrane de silice. Il est important de ne pas toucher/prélever le culot
- Centrifuger à 11,000xg pendant 1 minute pour permettre l'absorption de l'ADN sur la membrane de silice et l'élimination des contaminants en même temps
- Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur et ajouter 350 µL de tampon de lavage BQ2. Centrifuger à 11,000xg pendant 3 minutes
- Placer de nouveau la colonne dans un nouveau tube collecteur et ajouter 200 µL de tampon de lavage BQ2. Centrifuger à 11,000xg pendant 1 minute
- Changer de tube collecteur et centrifuger à 11,000xg pendant 1 minute sans y ajouter du tampon de lavage
- Pour l'élution de l'ADN, placer la colonne contenant l'ADN dans un eppendorf destiné à accueillir l'ADN extrait, appliquer 50 µL de tampon d'élution préchauffé à 70°C dans la colonne séchée et laisser incuber 5 minutes à température ambiante. Puis centrifuger 1 minute à 11,000xg et récupérer l'ADN
- Congeler l'ADN recueilli à -20 °C pour une utilisation à court terme ou à -80 °C pour une durée indéterminée

3.2. LE MODE OPERATOIRE DU NGS

En pratique, les ADN extraits sont envoyés à la plateforme GIGA genomics où sera réalisé le séquençage NGS des échantillons. Les résultats sont envoyés au laboratoire sous forme de fichier FastQ qui seront analysés par la suite grâce au logiciel « WGS typer », développé par l'entreprise Hedera22 et spécialement conçu pour le laboratoire de Microbiologie.

3.3. LE LOGICIEL WGS TYPER

Les résultats du séquençage sont fournis sous forme d'un fichier fastQ qui nécessite l'utilisation d'un outil bioinformatique pour les analyser. Le logiciel « WGS typer » développé par l'entreprise Hedera22 permet de réaliser l'assemblage des séquences des différents fragments afin d'obtenir la séquence du génome de la bactérie GBS. À la suite de l'analyse du génome, les gènes impliqués dans la virulence et la résistance aux antibiotiques, ceux codant pour les pili et le type capsulaire, ainsi que le « sequence type » sont déterminés avec le pourcentage d'identité correspondant (Fig.11). Ces résultats sont fournis sur base d'une recherche d'homologie de séquence avec la base de données de l'outil, laquelle a été établie avec la séquence de référence de chaque marqueur en provenance de la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI). L'outil employé dans le cadre de ce TFE favorise de cette façon une étude plus aisée du typage des *Streptococcus agalactiae*. La figure 11 reprend les marqueurs ciblés par l'outil WGS typer

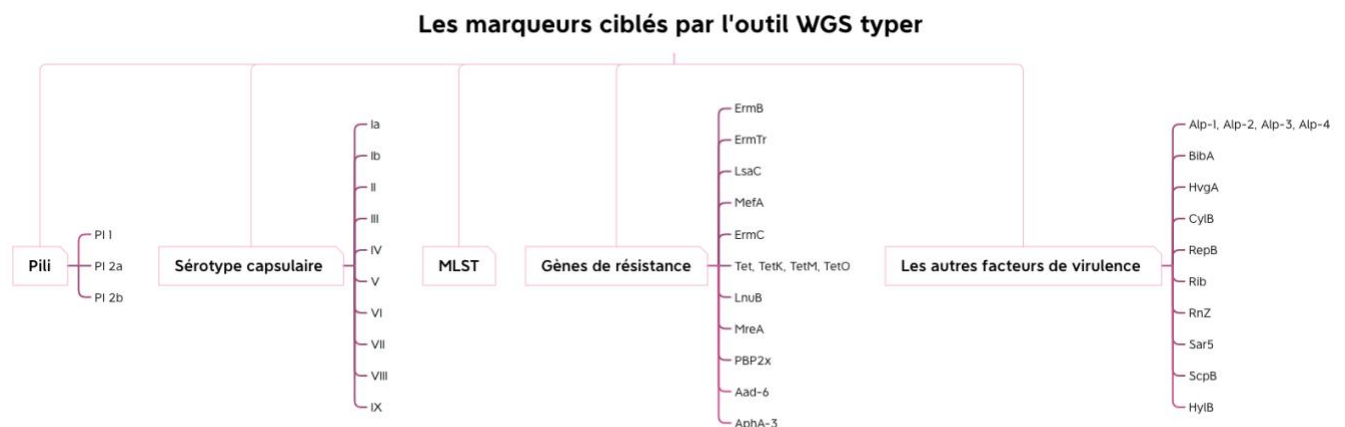


Figure 11 : diagramme illustrant les marqueurs ciblés par l'outil WGS Typer

Pour les marqueurs (autres que MLST et Serotype), le résultat peut être accompagné d'une mention :

- « no hit found » signifie qu'aucun alignement sur plus de 20% de la séquence cible avec 60% d'identité en acide aminé n'a été détecté
- « below thresholds » indique qu'aucun alignement ne dépasse 50% de couverture et 90% d'identité.
- « several hits » renseigne plusieurs alignements >50% couverture et >90% identité

Le mode opératoire pour l'utilisation du l'outil WGS typer est disponible à l'annexe 2.

III. Les résultats

L'objectif de ce travail est de comparer les deux approches expérimentales pour le génotypage capsulaire, la détermination des protéines pili, le profil de résistance aux macrolides-lincosamides-streptogramines (MLS) et le « sequence type » associés à la souche. De plus, la méthode du WGS associée à l'outil WGS typer fournit également des informations supplémentaires sur d'autres gènes de résistance ou facteurs impliqués dans la virulence des GBS.

1. LE GÉNOTYPAGE CAPSULAIRE

Le typage capsulaire des GBS est évalué entre la méthode de la PCR Poyart additionnée à la PCR Kong et le séquençage du génome entier couplé à l'outil bioinformatique. La figure 12 illustre la comparaison des résultats pour les dix sérotypes capsulaires, obtenus par les deux démarches. Parmi les 37 souches étudiées par PCR :

- 7 souches (18,9%) expriment le sérotype Ia
- 4 souches (10,8%) expriment respectivement le sérotype Ib et V
- 3 souches (8,1%) expriment respectivement le sérotype II et IV
- 11 souches (29,7%) expriment le sérotype III
- 2 souches (5,4%) expriment le sérotype IX.
- Les sérotypes VI, VII et VIII sont quant à eux mis en évidence dans une seule souche (2,7%).

Ces résultats, rapportés par les méthodes classiques de PCR, sont confirmés par le WGS, aucune discordance entre les deux méthodes n'a été mise en évidence.

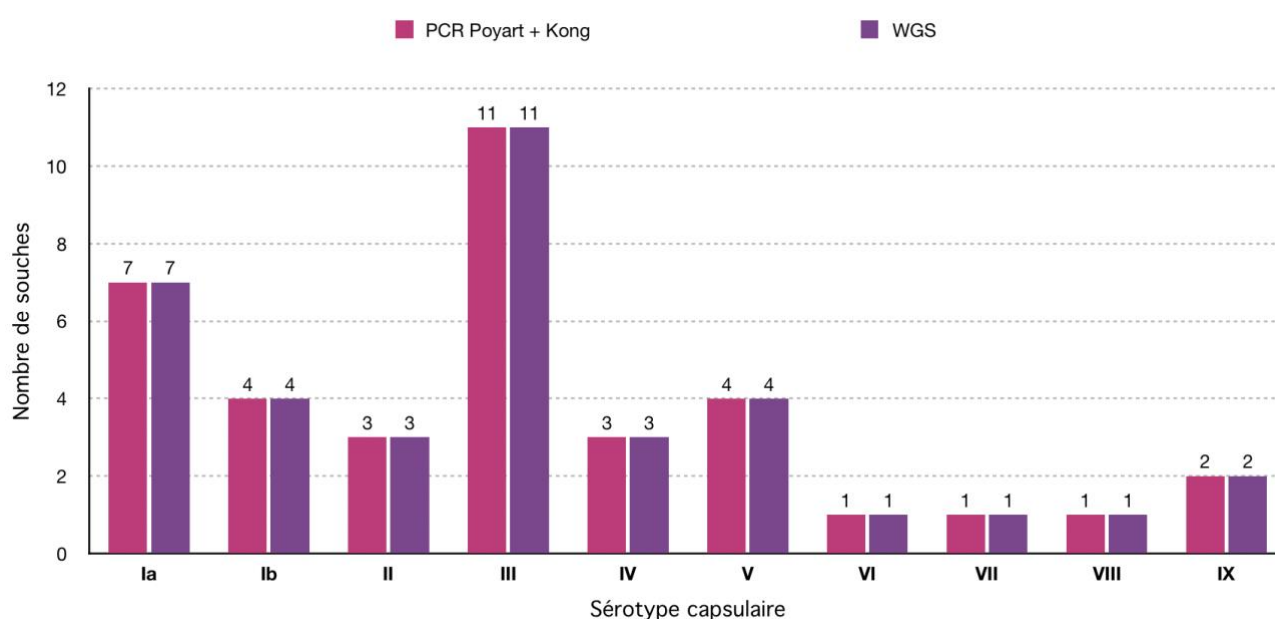


Figure 12 : distribution des sérotypes parmi les 37 souches étudiées selon les deux approches

Les résultats du premier run pour la PCR Poyart et Kong sont repris à l'annexe 3.

2. LA DÉTERMINATION DES PROTÉINES PILI

La détection des gènes codant pour les protéines pili est réalisée à la fois par la PCR pili et le WGS. La figure 13 expose la comparaison des résultats selon les deux approches. Parmi les 37 souches caractérisées, le profil PI-2a est prédominant avec 19 souches positives (51,4%), suivi par une expression double PI-1/PI-2a retrouvée pour huit souches (21,6%) et un profil PI-2b pour six souches (16,2%). Pour ce qui est de la combinaison PI-1/PI-2b, quatre souches (10,8%) sont positives pour ce profil. Ces résultats sont équivalents pour les deux méthodes, aucune divergence n'a été observée.

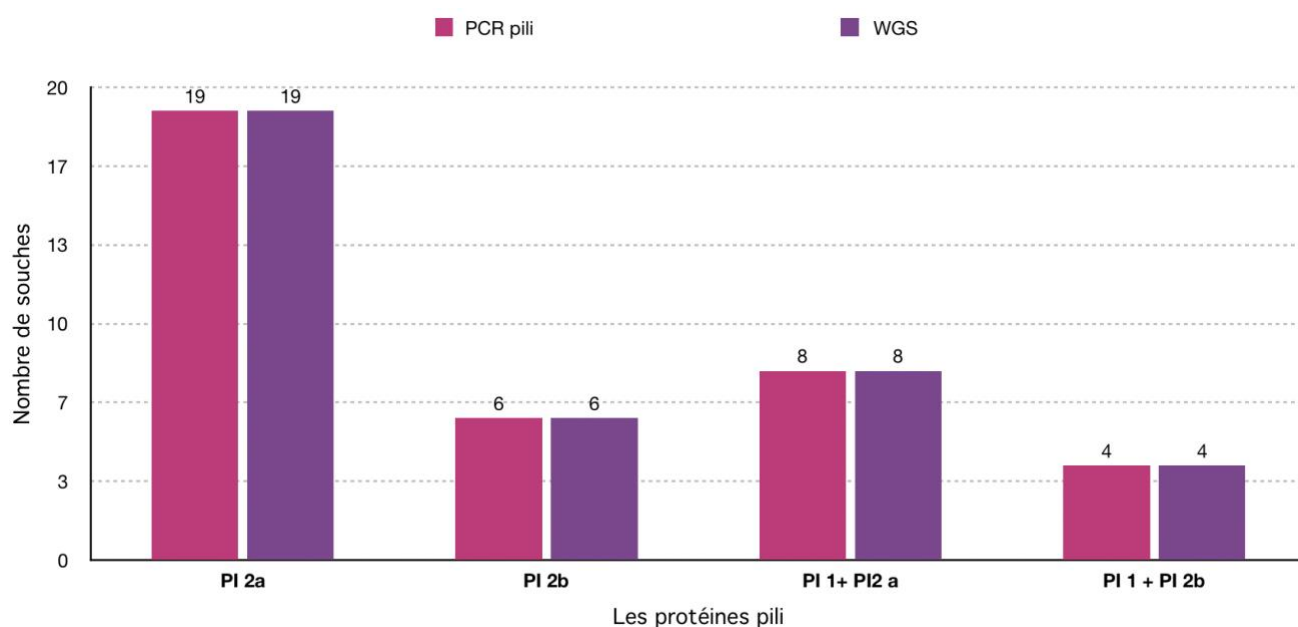


Figure 13 : expression des protéines pili pour les 37 souches caractérisées par PCR pili et WGS

Les résultats du premier run pour la PCR pili sont repris à l'annexe 3.

3. LE PROFIL DE RÉSISTANCE AUX MACROLIDES, LINCOSAMIDES ET STREPTOGRAMINES (MLS)

L'expression des gènes de résistances aux macrolides, lincosamides et streptogramines est évaluée pour les 37 souches sur base des résultats obtenus par PCR MLS et WGS. Parmi les souches étudiées, 16 d'entre elles présentent un profil de résistance à ces antibiotiques quelle que soit la méthode utilisée. Plus précisément, la PCR MLS a mis en évidence la présence du gène ErmB pour six souches (16,2%) et le gène ErmTr pour trois souches (8,1%). Ensuite, deux souches (5,4%) sont respectivement positives aux gènes LsaC et MefA. En ce qui concerne les combinaisons des gènes ErmB/LsaC et ErmB/MefA, elles sont respectivement retrouvées pour une (2,7%) et deux souches (5,4%). En comparaison avec les résultats obtenus par WGS, une discordance est soulignée. La souche 13-180615-0024 exprimant uniquement le gène ErmTr par la PCR MLS, possède une double expression (ErmTr et LsaC) par la méthode du NGS. De plus, une observation lors de l'utilisation de l'outil WGS typer a été faite pour les souches exprimant le gène de résistance MefA. Ce dernier indique « below threshold » (pourcentage d'identité inférieur au seuil), ce qui signifie qu'il est présent avec néanmoins des variations de séquence. Cette observation sera examinée plus en détails dans la section discussion. La figure 14 affiche la distribution des profils de résistances obtenue par PCR MLS et WGS.

Les résultats du premier run pour la PCR MLS sont repris à l'annexe 3.

Les échantillons montrant des résultats différents par rapport à la PCR, ont été ré-extraits puis re-séquencés par la même méthode WGS. Les résultats obtenus après la répétabilité sont identiques au premier run.

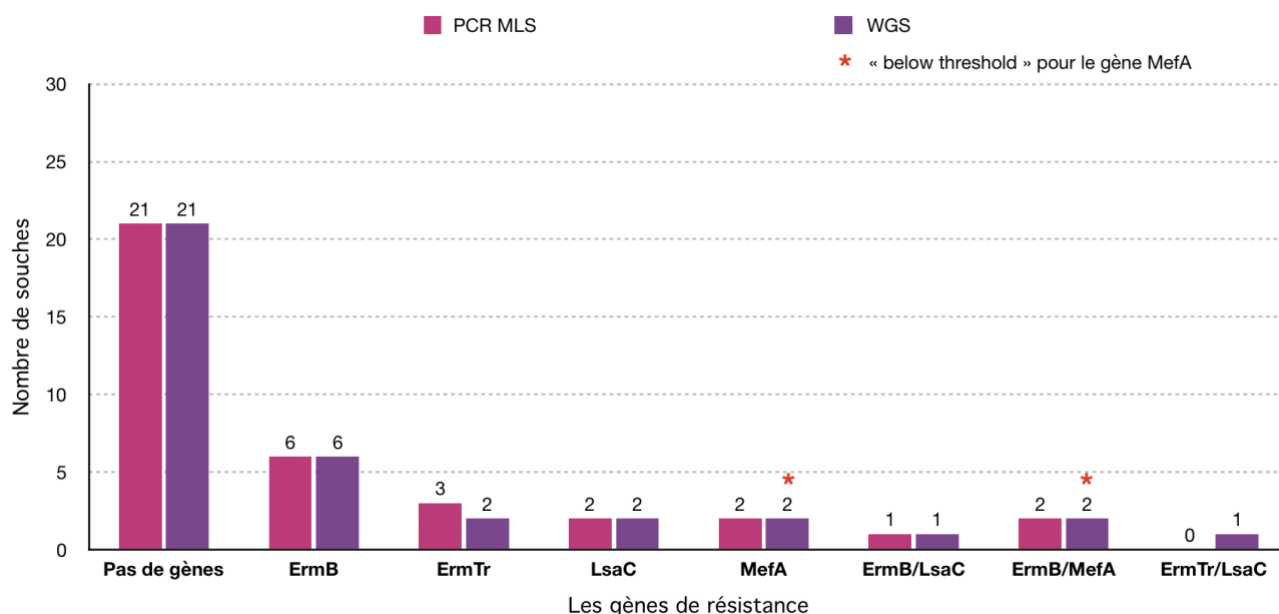


Figure 14 : distribution des gènes de résistance pour les 37 souches caractérisées par PCR MLS et WGS

4. LA DÉTERMINATION DU « SÉQUENCE TYPE »

La méthode MLST n'a pas été réalisée dans le cadre de ce TFE car elle est longue et coûteuse. Cependant, les souches de colonisation vaginale (14 souches) ont fait l'objet d'une première caractérisation en 2018-2019 dans laquelle la détermination du ST a été effectuée par MLST ou PCR HvgA. Ces résultats sont utilisés pour les comparer avec ceux obtenus par le WGS. La figure 15 illustre la distribution des séquences types obtenues par les deux approches pour les souches de colonisation vaginale chez la femme enceinte. Parmi les 14 souches étudiées par MLST/PCR HvgA dans une précédente étude :

- Une souche (7,1%) est identifiée respectivement comme ST-19, ST-23, ST-167, ST-196, ST-8 et ST-130. Ces résultats sont confirmés par WGS
- 2 souches (14,3%) sont identifiées comme ST-569. Ce ST est mis en évidence pour une seule souche par l'approche du WGS (7,1%). L'autre souche exprime le ST-28 (7,1%) par WGS.
- 2 souches (14,3%) sont identifiées comme ST-1. Ces résultats sont semblables pour le WGS
- 2 souches (14,3%) sont identifiées comme ST-17 par la PCR HvgA alors qu'il a été mis en évidence dans une seule souche par WGS (7,1%).
- Le sequence type 529, mis en évidence dans une souche par MLST, n'a pas été détecté par WGS (le WGS fournit le ST-24 pour cette souche).

Une souche (7,1%) lors du WGS est caractérisée respectivement par un ST-24 et ST-1465. Ces ST n'ont pas été détectés par MLST. De plus, la mention ND (non déterminé) est accordée à la souche C180015, pour qui le « sequence type » n'a pas pu être déterminé ni par MLST ni par WGS.

En résumé, parmi les 14 souches comparées, seules 11 souches présentent des résultats identiques entre les deux approches.

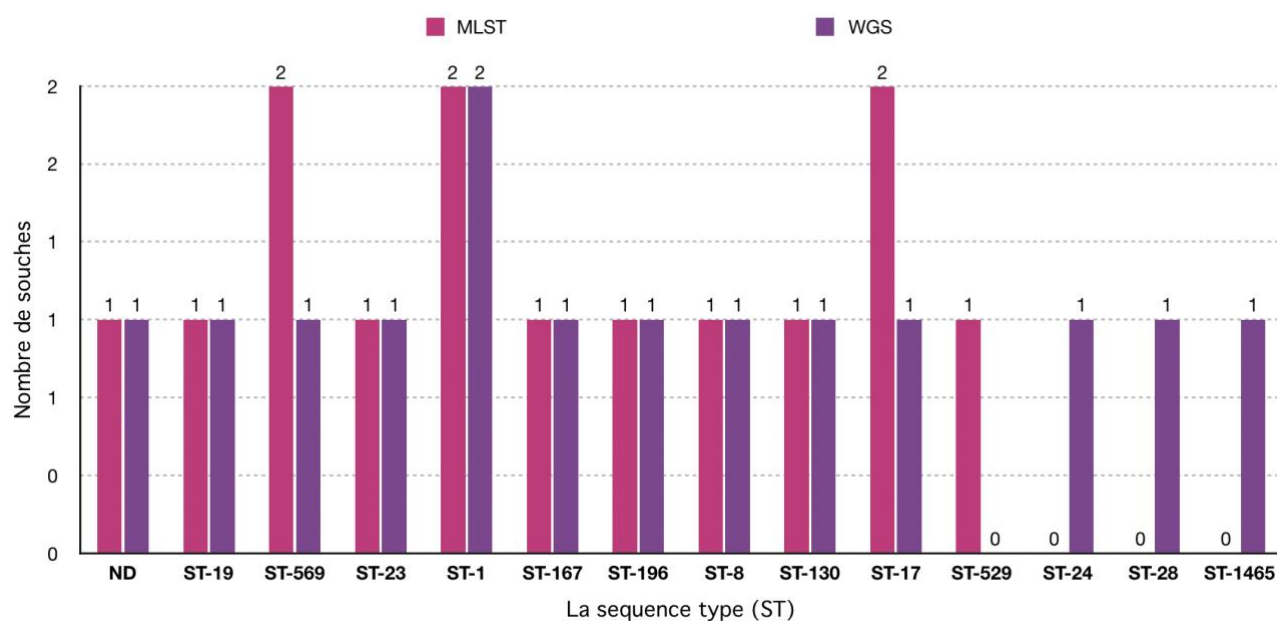


Figure 15 : distribution des ST pour les souches de colonisation vaginale

5. LA COMPARAISON ENTRE LES DEUX APPROCHES

Le tableau 19 résume les résultats obtenus par les deux approches pour le sérotype capsulaire, les protéines pili, les gènes de résistance MLS et le sequence type associés à chaque souche. Les résultats de ces marqueurs sont globalement identiques selon les deux démarches, à l'exception du gène de résistance LsaC non détecté par PCR MLS pour la souche 13-180615-0024. À propos des résultats pour le MLST, trois souches parmi celles testées présentent des divergences entre les méthodes employées.

Tableau 19 : tableau comparatif des marqueurs ciblés par les méthodes du CNR et le WGS associé à l'outil WGS typer

Les souche du CNR	Résultats obtenus par les méthodes du CNR				Résultats obtenus par le NGS			
	pili	Serotype	MLST	Les gènes de résistance MLS	pili	Serotype	MLST	Les gènes de résistance MLS
1) 13-181217-0026	PI 2b	III	ND	ErmB	PI 2b	III	ST-17	ErmB
2) 13-180913-0047	PI 1, PI 2a	VI	ND	/	PI 1, PI 2a	VI	ST-1	/
3) 13-180928-0008	PI 2a	II	ND	ErmB	PI 2a	II	ST-22	ErmB
4) 13-181129-0002	PI 2b	III	ND	ErmB	PI 2b	III	ST-17	ErmB
5) 13-181019-0064	PI 2a	Ia	ND	LsaC	PI 2a	Ia	ST-23	LsaC
6) 13-180111-0021	PI 1, PI 2a	III	ND	ErmB/LsaC	PI 1, PI 2a	III	ST-19	ErmB/LsaC
7) 13-180102-0008	PI 1, PI 2b	III	ND	/	PI 1, PI 2b	III	ST-17	/
8) 13-180116-0041	PI 1, PI 2a	Ib	ND	/	PI 1, PI 2a	Ib	ST-8	/
9) 13-180116-0025	PI 1, PI 2a	III	ND	ErmTr	PI 1, PI 2a	III	ST-335	ErmTr
10) 13-180110-0037	PI 1, PI 2a	V	ND	ErmB	PI 1, PI 2a	V	ST-1	ErmB
11) 13-180202-0008	PI 2a	Ia	ND	MefA	PI 2a	Ia	ST-23	MefA
12) 13-180320-0001	PI 2b	III	ND	ErmB/MefA	PI 2b	III	ST-17	ErmB/MefA
13) 13-180320-0038	PI 2b	III	ND	ErmB/MefA	PI 2b	III	ST-17	ErmB/MefA
14) 13-180412-0048	PI 2a	Ia	ND	/	PI 2a	Ia	ST-24	/
15) 13-180131-0017	PI 1, PI 2a	Ib	ND	/	PI 1, PI 2a	Ib	ST-1	/
16) 13-180411-0023	PI 1, PI 2a	III	ND	ErmB	PI 1, PI 2a	III	ST-106	ErmB
17) 13-180302-0035	PI 1, PI 2a	IV	ND	ErmTr	PI 1, PI 2a	IV	ST-459	ErmTr
18) 13-180301-0005	PI 2a	IX	ND	/	PI 2a	IX	ST-130	/
19) 13-180220-0010	PI 1, PI 2a	Ib	ND	/	PI 1, PI 2a	Ib	ST-8	/
20) 13-180615-0024	PI 1, PI 2a	IV	ND	ErmTr	PI 1, PI 2a	IV	ST-196	ErmTr/LsaC
21) 13-180718-0001	PI 1, PI 2a	V	ND	LsaC	PI 1, PI 2a	V	ST-1	LsaC
22) 13-180626-0005	PI 1, PI 2a	Ia	ND	/	PI 1, PI 2a	Ia	ST-88	/
23) 13-180530-0027	PI 1, PI 2b	VIII	ND	/	PI 1, PI 2b	VIII	ND	/
24) C180001	PI-2a	Ia	ST-529	/	PI 2a	Ia	ST-24	/
25) C180007	PI-2a, PI-1	III	ST-19	/	PI 1, PI 2a	III	ST-19	/
26) C180015	PI-1, PI-2b	Ia	ND	/	PI 1, PI 2b	Ia	ND	/
27) C180022	PI-2a	Ia	ST-23	MefA	PI 2a	Ia	ST-23	MefA
28) C180023	PI-2a, PI-1	V	ST-1	ErmB	PI 1, PI 2a	V	ST-1	ErmB
29) C180032	PI-2a, PI-1	V	ST-167	/	PI 1, PI 2a	V	ST-167	/
30) C180004	PI-2a, PI-1	II	ST-569	/	PI 1, PI 2a	II	ST-569	/
31) C180014	PI-2a, PI-1	II	ST-569	/	PI 1, PI 2a	II	ST-28	/
32) C180012	PI-2a, PI-1	IV	ST-196	/	PI 1, PI 2a	IV	ST-196	/
33) C180030	PI-2a, PI-1	Ib	ST-8	/	PI 1, PI 2a	Ib	ST-8	/
34) C180039	PI-1, PI-2b	VII	ST-1	/	PI 1, PI 2b	VII	ST-1	/
35) C180043	PI-2a	IX	ST-130	/	PI 2a	IX	ST-130	/
36) C180006	PI-1, PI-2b	III	ST-17	/	PI 1, PI 2b	III	ST-17	/
37) C180013	PI-1, PI-2b	III	ST-17	/	PI 1, PI 2b	III	ST-1465	/

6. LES NOUVEAUX MARQUEURS CIBLÉS PAR LE WGS

Outre les marqueurs examinés par les deux approches, le WGS en combinaison avec l'outil développé par la société Hedera22 fournit des informations complémentaires sur des gènes de résistance ou facteurs impliqués dans la virulence du GBS. Ce complément d'informations a pour intérêt de les intégrer dans des études plus approfondies sur la virulence et le traitement des GBS. Les figures 16 et 17 reprennent les résultats pour ces marqueurs.

Sur les 37 échantillons participants à l'étude de ce TFE :

- Toutes les souches expriment les gènes CylB, hylB, MreA, PBP2X WT et RnZ
- 6 souches (16,2%) expriment respectivement les gènes Aad-6, Alp-3, AphA-3, Sar5
- 9 souches (24,3%) expriment respectivement les gènes Alp-1 et ErmC
- 4 souches (10,8%) expriment le gène Alp-2
- 7 souches (18,9%) expriment respectivement les gènes BibA et HvgA
- 1 souche (2,7%) exprime le gène LnuB
- 36 souches (97,3%) expriment le gène ScpB
- 25 souches (67,6%) expriment le gène TetM
- 8 souches (21,6%) expriment le gène TetO
- Aucune souche n'exprime les gènes Alp-4, RepB, Rib, Tet et TetK

Au niveau des marqueurs de virulence ciblés par l'outil, la recherche de mutations au niveau de PBP2X, a démontré que toutes les souches analysées étaient bien de génotype « sauvage » et ne présentaient donc aucune mutation sur ce gène. Ce paramètre est très important à suivre pour monitorer l'émergence de résistance à la pénicilline comme c'est déjà le cas au Japon. [97]Le gène PBP2x muté est en effet impliqué dans la résistance à la pénicilline, l'antibiotique de choix pour le traitement des infections à GBS. [98, 99]

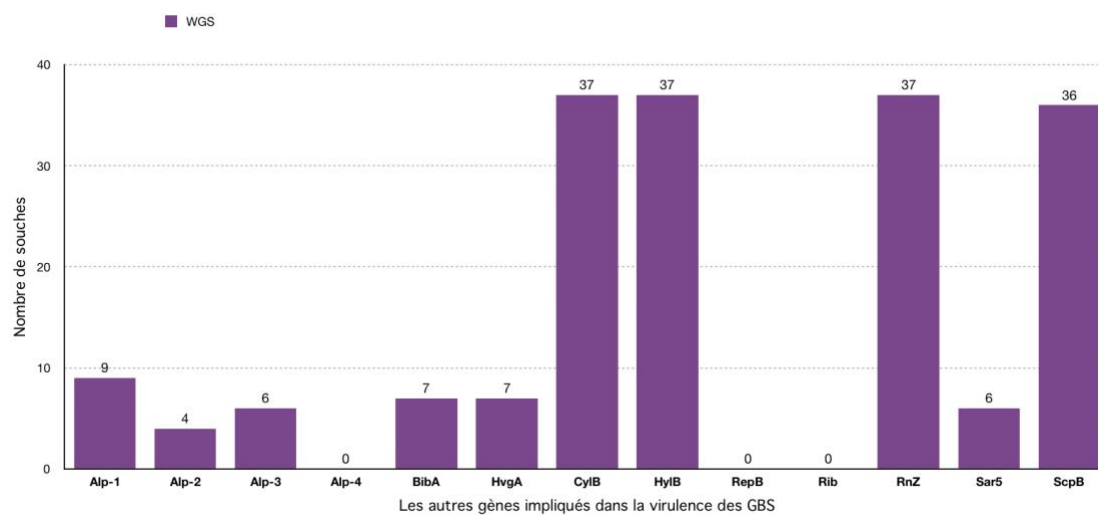


Figure 16 : distribution des autres facteurs de virulence ciblés par l'outil

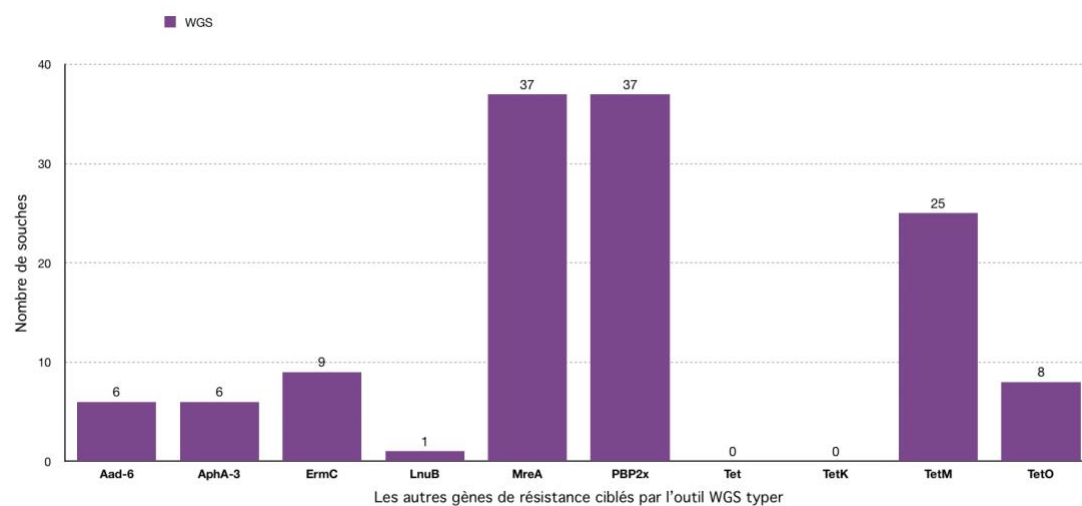


Figure 17 : distribution des auteurs gènes de résistance ciblés par l'outil

IV. La discussion

Dans la collection du Centre National de Référence pour les GBS, 37 souches ont été caractérisées simultanément par les deux approches, à savoir les réactions de PCR employées actuellement par le CNR en comparaison avec le séquençage NGS combiné à un outil bioinformatique.

1. LE NGS, UNE MÉTHODE EFFICACE ?

Le séquençage à haut débit, le séquençage de nouvelle génération ou le séquençage massivement parallèle sont des termes apparentés qui décrivent une technique de séquençage révolutionnaire dans le domaine de la génétique. Bien que cette méthode ait déjà fait ses preuves dans la compréhension des voies impliquées dans diverses pathologies, telles que le cancer, le NGS n'est pas encore mis en pratique dans les laboratoires de microbiologie. Le but de ce travail était ainsi d'analyser le potentiel de ce séquençage du génome entier pour une application microbiologique liée à l'infection à *Streptococcus agalactiae*. En ce sens, une comparaison a été réalisée avec des méthodes de PCR accréditées au laboratoire de microbiologie du CHU de Liège. Celles-ci détectent les sérotypes, les gènes codant pour les protéines pili et les gènes de résistance

1.1. L'IDENTIFICATION DES GÈNES DE RÉSISTANCE

Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent majoritairement une concordance entre les deux démarches. Néanmoins, cinq souches parmi les 37 présentent des divergences au niveau des gènes de résistance. Après l'analyse du séquençage via l'outil WGS typer pour les souches 13-180202-0008, 13-180320-0001, 13-180320-0038 et C180022, le gène MefA affiche la remarque « below thresholds » qui signifie un pourcentage d'identité inférieur à un seuil de 90% ou une couverture de séquençage inférieure à 50%. Dans ce cas-ci, l'outil a pu réaliser un alignement sur 100% de la séquence cible (couverture à 100%) mais seulement 88,15 % des positions sont identiques entre la séquence de référence et celle d'intérêt. À ce stade, une vérification a eu lieu via l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) qui répertorie l'ensemble des protéines référencées pour les GBS. L'outil WGS typer propose l'option de téléchargement de la séquence protéique. Ainsi, les séquences MefA pour les quatre souches qui ont montré un résultat en dessous du seuil, ont été introduites dans l'outil BLAST. Les résultats montrent que la séquence la plus proche et de même longueur (405 acides

aminés) pour les quatre souches correspond bien au gène MefA chez *Streptococcus agalactiae* avec un pourcentage d'identité et de couverture égal à 100 %. (Cf. Annexe 4) Au sein de cette espèce, le gène MefA semble avoir une grande variabilité génétique, ce qui explique le manque de précision de l'outil qui comporte dans sa base de données une seule séquence de référence pour chaque marqueur. Dans le cas du gène MefA, la séquence de référence sélectionnée n'est pas la plus proche de celle des quatre souches de GBS. Dès lors, un élargissement de la base de données, avec l'ajout d'autres séquences de référence en particulier pour le gène MefA améliorerait davantage les résultats obtenus par l'outil WGS typer. L'alternative serait d'extraire la séquence protéique par l'outil WGS typer lorsqu'il indique « below threshold » pour le gène et soumettre la séquence dans BLAST pour une vérification.

En ce qui concerne la souche 13-180615-0024, le gène de résistance LsaC a uniquement été mis en évidence par le WGS et non par PCR MLS. Bien que la technologie de la PCR est davantage performante de nos jours, l'échec d'une PCR est toujours possible. La raison de cette absence de gènes peut s'expliquer par un oubli de réactif dans le mix réactionnel à l'absence de la séquence cible dans la matrice. En l'occurrence, le contrôle positif pour ce gène montre la bande attendue sur le gel, ce qui valide les réactifs et le mode opératoire utilisés pour la PCR MLS. Cette divergence de résultats entre les deux méthodes peut se justifier par la sensibilité de la PCR aux variations de concentrations, mais aussi à une contamination et/ou dégradation de l'ADN, possible aux endroits d'hybridation des amorces. Ce problème est contourné par le séquençage du génome entier.

1.2. L'IDENTIFICATION DU « SEQUENCE TYPE »

La comparaison des ST pour les souches de colonisation montre quelques différences entre les deux approches. L'évaluation de ce critère n'est cependant pas légitime dans le cadre de ce TFE par le manque de données et l'absence de confirmation des résultats obtenus précédemment. En effet, la méthode du MLST, étant fastidieuse et coûteuse, n'a pas été réalisée lors de ce travail. Les résultats disponibles d'une précédente étude (2018-2019) ont ainsi été utilisés pour l'analyse de ce critère. Il semblerait que les divergences de résultats soient dues soit à la base de données restreinte de l'outil qui ne contient pas toutes les combinaisons alléliques

référéncées, soit à des erreurs dans la séquence des allèles. Après une analyse des « sequences types » discordants dans la base de données PubMLST⁴, plusieurs remarques en sont tirées.

La souche C180015 dont le ST n'a pas pu être déterminé par MLST et WGS, semble posséder une nouvelle combinaison allélique récemment répertoriée dans la base de données des « sequences types » par le centre de référence du CHU de Liège. Après caractérisation des allèles par MLST et WGS, cette combinaison était inconnue de la base de données PubMLST. Les données brutes de séquençage ont donc été soumises sur la base de données et le ST 1655 a été attribué à cette combinaison après validation par les experts le 04 mars 2021. En effet, après avoir introduit le profil allélique dans l'outil PubMLST dédié au typage moléculaire des GBS, le ST-1655 est maintenant accordé à la souche. Ce résultat est identique entre les deux approches évaluées qui ont fourni la même combinaison allélique. La non-détermination du ST s'explique par le fait que lors du typage par MLST ou de la conception de la base de données de l'outil WGS typer, la combinaison allélique du ST-1655 n'était pas encore référencée. De ce fait, l'outil nécessite une mise à jour de sa base de données. Ceci dit le recours à la base de données PubMLST GBS est toujours possible lorsque l'outil donne un résultat ND.

Le résultat obtenu par WGS pour la souche C180013 (ST-1465) est différent de celui donné par la PCR HvgA (ST-17). En analysant le profil allélique du ST1465, seul l'allèle du gène tkt diffère par rapport au profil ST17. De plus, une comparaison avec les facteurs de virulence ciblés par l'outil, montre une expression du gène HvgA, pourtant spécifique du clone ST-17. Des études plus approfondies par la suite seraient intéressantes afin de déterminer si le « sequence type » 1465 serait un variant dérivé du ST-17. Jusqu'à présent l'expression d'HvgA n'était toujours associée qu'au ST17 [100].

Pour les souches C180001 et C180014, le ST est différent selon l'approche utilisée. En analysant les combinaisons alléliques, celles-ci comportent de nombreuses discordances au niveau des numéros des allèles. Dans le cas du profil allélique de la souche C180001, seuls les gènes atr, SdhA et glck possèdent le même allèle par MLST et WGS. Pour la souche C180014, tous les allèles sont différents à l'exception des gènes pheS et tkt. À ce stade, une vérification de la

⁴ https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_sagalactiae_seqdef

fiabilité des résultats donnés par l'outil a eu lieu à partir des séquences nucléotidiques qui en sont extraites. Après les avoir soumises à la base de données PUBMLST spécifique des GBS, les résultats obtenus pour le profil allélique et le ST sont identiques à ceux obtenus par WGS typer. La variabilité des résultats pourrait s'expliquer par la performance du séquençage utilisée. Il est à noter que la méthode MLST, contrairement à la nouvelle approche, a recours au séquençage de Sanger. Ainsi, l'évaluation de ce dernier par rapport au séquençage de nouvelle génération (NGS) constitue une perspective intéressante afin de déterminer si la méthode de séquençage pourrait influencer l'identification du ST. Une inversion d'échantillon ou une erreur de rapportage lors de la PCR MLST est également possible étant donné le caractère fastidieux de cette méthode. Les deux résultats ambigus devront être vérifiés par MLST une seconde fois pour affirmer ou infirmer si la discordance de ST persiste entre les deux méthodes.

2. LE NGS, UNE MÉTHODE FACILE D'UTILISATION ?

À propos de l'expérimentation des méthodes employées, la PCR est facile à mettre en œuvre grâce au principe de la PCR multiplex et à l'utilisation de l'extraction automatisée. Cependant, sa conception nécessite de nombreuses étapes préliminaires avant sa mise en place. Premièrement, la PCR est uniquement envisageable pour des séquences connues préalablement identifiées afin de générer les primers appropriés à chaque région cible. En effet, le principe de la PCR, à la différence du WGS, repose sur une amplification spécifique d'une séquence à l'aide de couples d'amorces spécifiques et de séquences complémentaires. Ces derniers requièrent une étape de validation dans laquelle plusieurs conditions sont vérifiées, à savoir la spécificité de chaque primer, la complémentarité, les températures de fusion et la compatibilité des primers à être mélangés pour une PCR multiplex. De plus, la taille des fragments amplifiés par la PCR demande également une analyse expérimentale afin d'éviter la superposition des bandes sur le gel d'électrophorèse. Par ailleurs, l'étape de migration électrophorétique des amplicons fait également l'objet d'une vérification de méthode dans le but d'utiliser un gel adapté à la bonne visualisation et séparation des bandes. De fait, la composition du gel, ainsi que sa teneur en agarose sont influencées par les tailles des fragments à migrer.

Ces limitations de la PCR sont évitées par le séquençage qui possède une méthode universelle applicable à tous les organismes. Néanmoins, il requiert tout de même des informations sur le

génomique à séquencer, tel que la composition en nucléotides C et G. Cela oriente sur le kit de préparation des librairies à utiliser.

Contrairement au séquençage NGS, la plupart des équipements nécessaires à la PCR sont disponibles dans les laboratoires. Ainsi, la réalisation de cette méthode ne demande pas d'activité de sous-traitance avec d'autres plateformes, comme c'est souvent le cas pour le NGS.

Au sujet de l'interprétation des résultats, elle est plus aisée avec la démarche du NGS même si cela demande un traitement bioinformatique adapté. Les résultats du NGS pour les 41 marqueurs sont obtenus en une dizaine de minutes après le téléchargement des fichiers FastQ dans l'outil WGS typer. Pour ce qui est de la PCR, l'analyse des résultats peut être une tâche complexe lorsque les gènes amplifiés sont de taille proche. Ce cas de figure se produit pour la PCR Poyart de génotypage pour laquelle une proximité de la taille des amplicons conduit à un risque de confusion.

Le NGS nécessite pour chaque souche de GBS une extraction unique. Ensuite les ADNs sont envoyés à la plateforme GIGA pour la réalisation du WGS. Une fois les résultats obtenus, ils sont analysés en quelques minutes avec l'outil WGS typer. Cette démarche remplace 10 PCR individuelles si on considère uniquement les PCR de génotypage, pili, MLS et MLST (7 PCR différentes). Bien plus lorsque l'on considère tous les marqueurs additionnels de virulence et de gènes de résistance que la démarche WGS peut apporter en une seule manipulation. Qui plus est l'outil WGS est flexible et il est toujours possible d'ajouter de nouveaux marqueurs, ce qui rend la méthode d'autant plus intéressante et prometteuse.

3. LE NGS, UNE APPROCHE PROMETTEUSE ?

Globalement, les résultats obtenus lors de ce TFE sont en faveur du séquençage à haut débit au vu de ses nombreux avantages. Premièrement, il offre un gain de temps par rapport aux techniques classiques de biologie moléculaire. Le kit Nextera XT avec son nombre considérable d'index permet le séquençage de 384 échantillons à la fois. Par ailleurs, le temps de préparation requis est de 3 heures auxquelles s'ajoute le temps du run estimé à 56 heures pour le séquenceur MiSeq de chez Illumina. En ce qui concerne le temps d'analyse via l'outil, une moyenne deux heures a été nécessaire pour caractériser les 37 souches.

Le NGS en combinaison avec l'outil WGS typer permet l'identification complète des GBS en un seul run, par opposition à la variété de tests traditionnels requis pour identifier et caractériser

l'agent pathogène en routine. Au vu de la durée pour une réaction de PCR, plusieurs semaines sont attendues pour déterminer l'expression de tous les marqueurs ciblés par l'outil. La nouvelle approche a pour atout de fournir des résultats complets pour 41 marqueurs. Ceci réduit considérablement le temps d'expérimentation, ainsi que les frais à déboursier. Outre un délai d'analyse plus court, le NGS offre également un faible coût en comparaison avec la somme des prix des différentes méthodes à réaliser pour déterminer tous les marqueurs. À titre indicatif, le prix du NGS tourne aux alentours de 90€ par échantillon alors qu'avec seulement la méthode de PCR MLST (7 PCR + séquençage Sanger), 150€ par échantillon sont nécessaires. Il est donc clair que le NGS propose un rapport qualité prix intéressant pour l'étude des GBS.

Le séquençage à haut débit a pour bénéfice, contrairement au séquençage de Sanger, de fournir d'excellents rapports pour les paramètres de séquençage tels que la couverture et la profondeur. Ceux-ci évaluent la qualité des données obtenues par séquençage. De plus, le NGS peut être réalisé à partir de n'importe quelle matrice (ADN, cDNA, ARN, amplicons ...) et type de prélèvement. L'approche par NGS fournit, en plus de l'analyse de 41 marqueurs, l'arbre phylogénétique, une représentation graphique illustrant les relations évolutives entre les différentes souches de GBS.

Pour finir, la séquence entière du génome déterminée par le WGS est conservée pour des études plus approfondies ultérieures. De plus, il n'est pas nécessaire de reconcevoir la méthode après l'apparition d'une nouvelle souche émergente par exemple. Cette caractéristique offre un avantage de plus à la nouvelle approche, à la différence de la PCR qui doit être continuellement optimisée en fonction de l'évolution de l'espèce ciblée (choix des primers).

4. LES LIMITATIONS DU NGS

Le séquençage à haut débit est une approche prometteuse en comparaison avec les techniques actuellement utilisées par le CNR. Néanmoins, il présente l'inconvénient d'un manque de sélectivité. Plus précisément, le NGS est incapable de distinguer l'ADN de l'organisme à séquencer de celui des autres micro-organismes présents dans le milieu. C'est pourquoi, l'utilisation d'un milieu sélectif permettant le travail sur une culture pure est fortement recommandée pour la mise en culture de la bactérie. De plus, le WGS est rentable à partir du moment où plusieurs souches sont analysées simultanément, ce qui implique un délai d'attente parfois long pour obtenir le résultat.

5. LES AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DU NGS COMBINÉ À L'OUTIL WGS TYPER

L'outil WGS typer permet d'analyser en quelques minutes les innombrables informations fournies par le WGS. Cet outil simplifie grandement la tâche de l'utilisateur et offre un gain de temps considérable. En quelques minutes, le focus est posé sur les gènes d'intérêt pour l'utilisateur (préalablement définis). Ceci dit, comme cela a été le cas pour le gène MefA et certains ST, l'outil WGS typer doit être configuré de façon optimale afin de ne pas produire de faux négatifs. Le gène de référence doit être choisi avec soin et être le plus représentatif possible. L'utilisation de cet outil doit se faire avec précaution et en gardant un sens critique afin d'analyser correctement les résultats obtenus. Le recours à la base de données BLAST peut s'avérer nécessaire afin de vérifier les résultats fournis par l'outil WGS. Le tableau 20 résume les avantages et les inconvénients tirés lors de ce travail.

Tableau 20 : les avantages et inconvénients du WGS combiné à l'outil WGS typer

Les avantages	Les inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> ❖ Le NGS permet de séquencer le génome de 384 souches simultanément ❖ Il permet une caractérisation complète en une seule technique ❖ 41 marqueurs impliqués dans la virulence du GBS sont ciblés par NGS ❖ Le NGS ne nécessite pas la connaissance du génome au préalable ❖ L'interprétation est plus rapide et moins fastidieuse que les techniques de biologie moléculaire ❖ Le temps d'expérimentation est rapide si le nombre de souches à séquencer est relativement élevé ❖ Faible coût ❖ L'outil WGS typer permet de réaliser un arbre phylogénétique des souches étudiées ❖ Le NGS offre une bonne couverture et profondeur de séquençage ❖ Le NGS est réalisé à partir de tout type de prélèvement et matrice ❖ La méthode ne nécessite pas d'amélioration ou d'optimisation lors de l'apparition de nouvelles souches ou de variations génomiques de la bactérie ❖ L'outil WGS typer peut être applicable pour l'étude d'autres micro-organismes ❖ Diverses applications en microbiologie (suivi de l'épidémie, surveillance épidémiologique, caractérisation ...) 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ La base de données de l'outil WGS typer n'est pas exhaustive. Elle nécessite une mise à jour, notamment pour le gène de résistance MefA et les ST ❖ Le NGS n'est pas une méthode sélective ❖ Le NGS nécessite absolument une analyse bioinformatique pour l'assemblage du génome entier et l'étude de celui-ci ❖ Le NGS, étant une technique dans l'air du temps, les laboratoires n'ont pas les équipements pour sa réalisation, ainsi que le personnel pour l'interprétation des données

V. La conclusion

L'objectif principal de ce travail de fin d'études était d'évaluer les atouts du séquençage du génome entier par WGS pour les Streptocoques du groupe B, en comparaison avec des méthodes de biologie moléculaire (PCR) actuellement utilisées par le CNR. Les souches étudiées ont été prélevées dans la collection du CNR sur base de profils diversifiés. Le but étant de déterminer si la nouvelle approche permet une caractérisation complète des GBS de manière fiable.

Au vu des résultats obtenus au cours de cette étude, la technique du WGS fera prochainement l'objet d'une validation de méthode au sein du CNR pour l'identification du sérotype capsulaire, des protéines pili et les gènes de résistance. En effet, les résultats sont majoritairement identiques pour les principaux critères testés. Cependant, l'outil employé pour l'analyse du séquençage nécessite une mise au point, notamment dans sa base de données. Un élargissement de cette dernière favoriserait une caractérisation plus précise et fiable de certains gènes de résistance (*mefA*). Pour ce qui est de la détection des « sequences types », les résultats n'étant pas optimaux pour certains, une investigation approfondie par WGS et MLST est nécessaire avant toute validation.

En conclusion, le NGS est une approche prometteuse pour le laboratoire de microbiologie, qui de par ses nombreux avantages, permet diverses applications :

- Le NGS met en place une caractérisation complète, précise et fiable de l'agent pathogène.
- Le NGS est une méthode avantageuse pour le contrôle en cas d'épidémie et de surveillance épidémiologique. Il permet d'établir des liens de parenté phylogéniques entre les souches. Son utilisation servira à retracer la source de contamination, et à suivre l'évolution des cas d'infections invasives. La possibilité qu'offre l'outil WGS typer de réaliser un arbre phylogénétique est très intéressante dans ce contexte.
- Il est utile pour la détection de gènes de résistance aux antibiotiques, notamment pour l'émergence de souches portant une mutation sur PBP2X générant une résistance à la pénicilline qui est le 1^{er} antibiotique de choix dans le traitement des infections à GBS.

Les perspectives à venir sont d'une part d'explorer davantage la méthode du NGS, en y associant notamment une extraction automatisée de l'ADN, et d'autre part d'évaluer sa mise en place au sein du laboratoire de routine en tenant compte de la rapidité et la fiabilité de l'analyse.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Case, C., Funke, B., & Tortora, G. (2018). Introduction à la Microbiologie (3è éd.). Montréal : ERPI..
- [2] Pasquier, C., Grosjean, J., Clavé, D., & Archambaud, M. (2017). Bactériologie et virologie pratique. De Boeck Supérieur. ISO 690.
- [3] *Da Cunha V., 2012, Réseaux de régulation et éléments intégratifs et conjugatifs de la famille TnGBS dans l'adaptation de Streptococcus agalactiae, Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris..*
- [4] Prescott, L., Sherwood, L., Willey, J., & Woolverton, C. (2018). Microbiologie (4è éd.). De Boeck Supérieur..
- [5] Facklam, R. (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clinical microbiology reviews, 15(4), 613-630..
- [6] *Denis, F., Cattoir, V., Martin, C., Ploy, M. C., & Poyart, C. (2016). Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Masson..*
- [7] *De Aguiar, E.L., Mariano, D.C.B., Viana, M.V.C., et al. (2016). Complete genome sequence of Streptococcus agalactiae strain GBS85147 serotype of type Ia isolated from human oropharynx. Stand in Genomic Sci 11, 39. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0158-6>.*
- [8] *Denis, F., Cattoir, V., Martin, C., Ploy, M. C., & Poyart, C. (2016). Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Masson..*
- [9] *Carroll, K. C. (2019). Biographical Feature: Rebecca Lancefield, Ph. D. Journal of clinical microbiology, 57(8). <https://doi.org/10.1128/JCM..>*
- [10] *Lancefield, R. C. (1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. The Journal of experimental medicine, 57(4), 571-595. <https://doi.org/10.1084/jem.57.4.571..>*
- [11] Oxoid Ltd. (n.d.). Oxoid Streptococcal : Grouping Kit. Retrieved from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/Instructions/X3981D.pdf..>
- [12] Aryal, S. (2020). Hemolysis of Streptococci- Types and Examples with Images. Retrieved from [https://microbenotes.com/hemolysis-of-streptococci/..](https://microbenotes.com/hemolysis-of-streptococci/)
- [13] Prescott, Willey, Sherwood, Woolverton, Microbiologie, 4e edition, n.d..
- [14] *Biorender.*
- [15] *Da Cunha, V., Davies, M. R., Douarre, P. E., et al. (2014). Streptococcus agalactiae clones infecting humans were selected and fixed through the extensive use of tetracycline. Nature communications, 5(1), 1-12..*
- [16] *Melin, P. (2011). Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. Clinical Microbiology and Infection, 17(9), 1294-1303. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03576.x..>*
- [17] *Khatami, A., Randis, T. M., Tavares, L., Gegick, M., Suzman, E., & Ratner, A. J. (2019). Vaginal co-colonization with multiple Group B Streptococcus serotypes. Vaccine, 37(3), 409-411. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.001...>*
- [18] *De Aguiar, E.L., Mariano, D.C.B., Viana, M.V.C., et al. (2016). Complete genome sequence of Streptococcus agalactiae strain GBS85147 serotype of type Ia isolated from human oropharynx. Stand in Genomic Sci 11, 39. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0158-6>.*
- [19] Baker C., 2013, The spectrum of perinatal group B streptococcal disease, Vaccine, 31S, D3-D6..
- [20] *Stalder, T. S., & Preheim, L. C. (2001). Gram-Positive Bacteria. In Management of Antimicrobials in Infectious Diseases (pp. 29-41). Humana Press, Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1385/1-59259-036-5:29..>*
- [21] *Wilkinson, H. W. (1977). CAMP-disk test for presumptive identification of group B streptococci. Journal of clinical microbiology, 6(1), 42-45..*

- [22] Faculté de médecine de Sorbonne Université. (n.d.). Les streptocoques, entérocoques et pneumocoques. Retrieved from <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.4.html>, consulté le 16 mai 2021..
- [23] CLINICAL EXPERIMENTAL VACCINE RESEARCH Brief Communication. (n.d.). <https://doi.org/10.7774/cevr.2018.7.1.76..>
- [24] van der Mee-Marquet, N., Fourny, L., Arnault, L., Domelier, A. S., Salloum, M., Lartigue, M. F., & Quentin, R. (2008). Molecular characterization of human-colonizing *Streptococcus agalactiae* strains isolated from throat, skin, anal margin, and genital bod.
- [25] Farley, M. M., & Strasbaugh, L. J. (2001). Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clinical Infectious Diseases*, 33(4), 556-561. <https://doi.org/10.1086/322696..>
- [26] Schuchat, A. (1998). Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clinical microbiology reviews*, 11(3), 497-513. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.3.497..>
- [27] Shabayek, S., & Spellerberg, B. (2018). Group B streptococcal colonization, molecular characteristics, and epidemiology. *Frontiers in microbiology*, 9, 437. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00437..>
- [28] [25] Meyn, L. A., Krohn, M. A., & Hillier, S. L. (2009). Rectal colonization by group B *Streptococcus* as a predictor of vaginal colonization. *American journal of obstetrics and gynecology*, 201(1), 76-e1. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2009.02.011..>
- [29] Matee, M. I., Massawe, F. A., & Lyamuya, E. F. (2009). Maternal and neonatal colonisation of group B streptococcus at Muhimbili National Hospital in Dar es Salaam, Tanzania: prevalence, risk factors and antimicrobial resistance. *BMC public Health*, 9(1), 1.
- [30] Matee, M. I., Massawe, F. A., & Lyamuya, E. F. (2009). Maternal and neonatal colonisation of group B streptococcus at Muhimbili National Hospital in Dar es Salaam, Tanzania: prevalence, risk factors and antimicrobial resistance. *BMC public Health*, 9(1), 1.
- [31] Doran, K. S., & Nizet, V. (2004). Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Molecular microbiology*, 54(1), 23-31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04266..>
- [32] Cieslewicz, M. J., Chaffin, D., Glusman, G., et al. (2005). Structural and genetic diversity of group B streptococcus capsular polysaccharides. *Infection and immunity*, 73(5), 3096-3103..
- [33] Spellerberg, B. (2000). Pathogenesis of neonatal *Streptococcusagalactiae* infections. *Microbes and infection*, 2(14), 1733-1742. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01328-9..](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01328-9..)
- [34] Edwards, M. S., Kasper, D. L., Jennings, H. J., Baker, C. J., & Nicholson-Weller, A. (1982). Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. *The Journal of Immunology*, 128(3), 1278-1283..
- [35] Burcham, L. R., Spencer, B. L., Keeler, L. R., Runft, D. L., Patras, K. A., Neely, M. N., & Doran, K. S. (2019). Determinants of group B streptococcal virulence potential amongst vaginal clinical isolates from pregnant women. *PloS one*, 14(12), e0226699. h.
- [36] Maisey, H. C., Doran, K. S., & Nizet, V. (2008). Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Expert reviews in molecular medicine*, 10, e27..
- [37] Kreikemeyer, B., Valentin-Weigand, P., Bergmann, S., Spellerberg, B., & Shabayek, S. (2018). Group B Streptococcal Colonization, Molecular Characteristics, and Epidemiology. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00437>.
- [38] Goldschmidt Jr, J. C., & Panos, C. H. A. R. L. E. S. (1984). Teichoic acids of *Streptococcus agalactiae*: chemistry, cytotoxicity, and effect on bacterial adherence to human cells in tissue culture. *Infection and immunity*, 43(2), 670-677..
- [39] Szili, N. R. (2017). *Biosynthesis, role (s) and regulation of the PI-2b pilus in the hypervirulent ST-17 clone of Streptococcus agalactiae (Doctoral dissertation, Université Sorbonne Paris Cité)*. Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-0193246>.
- [40] Spellerberg, B., Pohl, B., Haase, G., Martin, S., Weber-Heynemann, J., & Lütticken, R. (1999). Identification of genetic determinants for the hemolytic activity of *Streptococcus agalactiae* by IS S1 transposition. *Journal of bacteriology*, 181(10), 3212-32.
- [41] Six, A., Joubrel, C., Tazi, A., & Poyart, C. (2014). Infections materno-fœtales à *Streptococcus agalactiae*. *La Presse Médicale*, 43(6), 706-714. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2014.04.008..>

- [42] Jiang, S., Park, S. E., Yadav, P., Paoletti, L. C., & Wessels, M. R. (2012). Regulation and function of pilus island 1 in group B *Streptococcus*. *Journal of bacteriology*, 194(10), 2479-2490. <https://doi.org/10.1128/JB.00202-12>.
- [43] Springman, A. C., Lacher, D. W., Waymire, E. A., et al. (2014). Pilus distribution among lineages of group b streptococcus: an evolutionary and clinical perspective. *BMC microbiology*, 14(1), 1-11.
- [44] Lindahl, G., Stålhammar-Carlemalm, M., & Areschoug, T. (2005). Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 18(1), 102-127.
- [45] Kvam, A. I., Mavengwa, R. T., Radtke, A., & Maeland, J. A. (2011). *Streptococcus agalactiae* alpha-like protein 1 possesses both cross-reacting and Alp1-specific epitopes. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(8), 1365-1370. <https://doi.org/10.1128/CI.05>.
- [46] Beckmann, C., Waggoner, J. D., Harris, T. O., Tamura, G. S., & Rubens, C. E. (2002). Identification of novel adhesins from group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infection and immunity*, 70(6), .
- [47] Mu, R., Kim, B. J., Paco, C., Del Rosario, Y., Courtney, H. S., & Doran, K. S. (2014). Identification of a group B streptococcal fibronectin binding protein, SfbA, that contributes to invasion of brain endothelium and development of meningitis. *Infection*.
- [48] Santi, I., Scarselli, M., Mariani, M., et al. (2007). BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B *Streptococcus* survival in human blood. *Molecular microbiology*, 63(3), 754-767.
- [49] Tazi, A., Disson, O., Bellais, S., et al. (2010). The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *Journal of experimental medicine*, 207(11), 2313-2322.
- [50] Wang, Z., Guo, C., Xu, Y., Liu, G., Lu, C., & Liu, Y. (2014). Two novel functions of hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae* are enhanced intracellular survival and inhibition of proinflammatory cytokine expression. *Infection and immunity*, 82(6), 2615.
- [51] Kvam, A. I., Mavengwa, R. T., Radtke, A., & Maeland, J. A. (2011). *Streptococcus agalactiae* alpha-like protein 1 possesses both cross-reacting and Alp1-specific epitopes. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(8), 1365-1370. <https://doi.org/10.1128/CI.05>.
- [52] <https://www.deciphergenomics.org/gene/ELAC1/overview/clinical-info>, consulté le 14 juin 2021.
- [53] Del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., & Díaz-Orejas, R. (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(2), 434-464. ISO 690.
- [54] Jones, N., Bohnsack, J. F., Takahashi, S., et al. G. (2003). Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *Journal of clinical microbiology*, 41(6), 2530-2536.
- [55] Manning, S. D., Springman, A. C., Lehotzky, E., Lewis, M. A., Whittam, T. S., & Davies, H. D. (2009). Multilocus sequence types associated with neonatal group B streptococcal sepsis and meningitis in Canada. *Journal of clinical microbiology*, 47(4), 1143-1.
- [56] Meex, C., Clinique, M., & Liège, C. (n.d.). Détection rapide des Streptocoques du groupe B de sequence-type 1 et 17 par MALDI-TOF MS : Avantages au laboratoire et en Avantages au laboratoire et en clinique..
- [57] Raabe, V. N., & Shane, A. L. (2019). Group B streptococcus (*Streptococcus agalactiae*). *Gram-Positive Pathogens*, 228-238. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0007-2018>.
- [58] Björnsdóttir, E. S., Martins, E. R., Erlendsdóttir, H., Haraldsson, G., Melo-Cristino, J., Ramirez, M., & Kristinsson, K. G. (2019). Group B Streptococcal Neonatal and Early Infancy Infections in Iceland, 1976–2015. *The Pediatric infectious disease journal*.
- [59] Schuchat, A. (1998). Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clinical microbiology reviews*, 11(3), 497-513.
- [60] Morgan, J. A., & Cooper, D. B. (2018). Pregnancy, Group B *Streptococcus*. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29494050>.
- [61] High, K. P., Edwards, M. S., & Baker, C. J. (2005). Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clinical Infectious Diseases*, 41(6), 839-847. <https://doi.org/10.1086/432804>.

- [62] Meyn, L. A., Krohn, M. A., & Hillier, S. L. (2009). Rectal colonization by group B Streptococcus as a predictor of vaginal colonization. *American journal of obstetrics and gynecology*, 201(1), 76-e1..
- [63] Kleweis, S. M., Cahill, A. G., Odibo, A. O., & Tuuli, M. G. (2015). Maternal obesity and rectovaginal group B streptococcus colonization at term. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/586767>..
- [64] Verani, J. R., & Schrag, S. J. (2010). Group B streptococcal disease in infants: progress in prevention and continued challenges. *Clinics in perinatology*, 37(2), 375-392. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2010.02.002>..
- [65] Rosa-Fraile, M., & Spellerberg, B. (2017). Reliable detection of group B Streptococcus in the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*, 55(9), 2590-2598. <https://doi.org/10.1128/JCM.00582-17>..
- [66] bioMérieux - Culture Media | product - Columbia agar + 5% sheep blood. (n.d.). Retrieved May 31, 2021, from <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/30-columbia-agar+-5-percent-sheep-blood>.
- [67] bioMérieux - Culture Media | product - Granada agar. (n.d.). Retrieved May 31, 2021, from <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/12-granada-agar>.
- [68] StrepBSelect Agar | Clinical Diagnostics | Bio-Rad. (n.d.). Retrieved May 31, 2021, from <https://www.bio-rad.com/en-be/product/strepbselect-agar?ID=OMERQBKG4>.
- [69] S. Bontems, Annexe de procédure de Microbiologie Clinique (MBA.DSB.ANA.A02) : Columbia ANC agar avec 5% de sang de mouton, CNA, Vivaldi (Logiciel Institutionnel du CHU de Liège). (2018)..
- [70] S. Bontems, Procédure opératoire standard de Biologie Clinique - Microbiologie Clinique- CNR (MBA.DSB.ANA) : Procédure de mise en culture des GBS sur milieux sélectifs, Vivaldi (Logiciel Institutionnel Du CHU Liège). (2018)..
- [71] S. Bontems, Annexe de Procédure de Microbiologie Clinique (MBA.DSB.ANA.A03): Milieu Granada, Vivaldi (Logiciel Institutionnel du CHU de Liège). (2018)..
- [72] S. Bontems, Annexe de procédure de Microbiologie Clinique (MBA.DSB.ANA.A04) : Milieu gélosé Strep B Select, Vivaldi (Logiciel Institutionnel du CHU de Liège). (2018)..
- [73] S. Bontems, Annexe de Procédure de Microbiologie Clinique (MBA.DSB.ANA.A05) : Bouillon de Lim, Vivaldi (Logiciel Institutionnel du CHU de Liège). (2018)..
- [74] Polet, M., Botteldoorn, N., & Dierick, K. (n.d.). MALDI-TOF MS comme outil d'identification de pathogènes alimentaires. Retrieved May 31, 2021, from <http://www.biomerieux.com/fr/spectrometrie-de-masse-maldi-tof>..
- [75] Hayette Marie-Pierre, *Cours et travaux pratiques de microbiologie clinique*, 2017, 2018 (bachelier en sciences biomédicales)..
- [76] Tagu, D., & Jaubert-Possamai, S. (2018). *Principes des techniques de biologie moléculaire et génomique: 3e édition revue et augmentée*. Quae..
- [77] Brown, T. A. (2020). *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*. John Wiley & Sons..
- [78] Melin, P., & Sacheli, R. (2013). *Centre National de référence Streptococcus agalactiae 2012*..
- [79] Apgar, B. S., Greenberg, G. M., & Yen, G. (2005). Prevention of group B streptococcal disease in the newborn. *American Family Physician*, 71(5), 903-910..
- [80] Assefa, S., Desta, K., & Lema, T. (2018). Group B streptococci vaginal colonization and drug susceptibility pattern among pregnant women attending in selected public antenatal care centers in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC pregnancy and childbirth*, 18(1), 1-9.
- [81] Prevention of Group B Streptococcal Early-Onset Disease in Newborns : ACOG Committee Opinion Summary, Number 797. (2020). *Obstetrics and gynecology*, 135(2), 489–492. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003669>.

- [82] Glynn, M. K., Bopp, C., Dewitt, W., Dabney, P., Mokhtar, M., & Angulo, F. J. (1998). Emergence of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT104 Infections in the United States. *New England Journal of Medicine*, 338(19), 1333-1339. Retri.
- [83] Verani, J. R., McGee, L., & Schrag, S. J. (2010). Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC, 2010..
- [84] Melin, P. (2006). Prévention des infections périnatales à streptocoques du groupe B: stratégie basée sur le dépistage prénatal. *Gynaïkeia. Société Royale Belge de Gynécologie et d'Obstétrique*, 11(7), 198-203..
- [85] Melin P., 2011, Neonatal group B streptococcal disease : from pathogenesis to preventive strategies, *Clinical Microbiology and Infections*, Volume 17, numéro 9, p. 1294-1303..
- [86] M. Kobayashi, J. Vekemans, C.J. Baker, A.J. Ratner, K. Le Doare, S.J. Schrag, Group B *Streptococcus* vaccine development: Present status and future considerations, with emphasis on perspectives for low and middle income countries [version 1; peer review: 2.
- [87] Baker C-J, Edwards M-S, 2003, Group B streptococcal conjugate vaccines, *Arch Dis Child*, 88, p.375-378..
- [88] Margarit I., Rinaudo C-D., Maione D., Ghezzi C., et al., 2009, Preventing Bacterial Infections with Pilus-Based Vaccines : The Group B *Streptococcus* Paradigm, *The Journal Of Infectious Diseases*, Volume 199, p. 108-115..
- [89] Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J. C., Bouzigarene, P., & Bogard, M. (2008). Les techniques de séquençage de l'ADN: une révolution en marche. première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 23(5), 260-279..
- [90] Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1-8..
- [91] https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf, consulté le 16 mai 2021.
- [92] Promega, Technical Manual Maxwell® 16 DNA Purification Kits, (2007)..
- [93] https://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Promega_Biotech_Iberica_1.pdf, consulté le 31 mai 2021.
- [94] Maxwell® 16 System Advantages Instruments purification kits, (2012)..
- [95] C. Poyart, A. Tazi, H. Réglier-Poupet, A. Billoët, N. Tavares, J. Raymond, P. Trieu-Cuot, Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci, *J. Clin. Microbiol.* 45 (2007) 1985–1988. <https://doi.org/10.1128/JCM.00159-07>..
- [96] F. Kong, L.M. Lambertsen, H.C. Slotved, D. Ko, H. Wang, G.L. Gilbert, Use of phenotypic and molecular serotype identification methods to characterize previously nonserotypeable group B streptococci, *J. Clin. Microbiol.* 46 (2008) 2745–2750. <https://doi.org>.
- [97] Moroi, H., Kimura, K., Kotani, T., Tsuda, H., Banno, H., Jin, W., ... & Arakawa, Y. (2019). Isolation of group B *Streptococcus* with reduced β -lactam susceptibility from pregnant women. *Emerging microbes & infections*, 8(1), 2-7. ISO 690.
- [98] Vannice, K. S., Ricaldi, J., Nanduri, S., Fang, F. C., Lynch, J. B., Bryson-Cahn, C., ... & Beall, B. (2020). *Streptococcus pyogenes* pbp2x mutation confers reduced susceptibility to β -lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 71(1), 201-204..
- [99] Dahesh, S., Hensler, M. E., Van Sorge, N. M., Gertz Jr, R. E., Schrag, S., Nizet, V., & Beall, B. W. (2008). Point mutation in the group B streptococcal pbp2x gene conferring decreased susceptibility to β -lactam antibiotics. *Antimicrobial agents and chemo*.
- [100] Tazi, A., Disson, O., Bellais, S., Bouaboud, A., Dmytruk, N., Dramsi, S., ... & Poyart, C. (2010). The surface protein HvgA mediates group B *streptococcus* hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *Journal of experimental medicine*, 207(11), 2313-23.

Les annexes

Annexe 1: Le tableau des caractéristiques des souches étudiées (37)

N° souche	Statut	Âge	Sexe	Symptôme(s)	Facteur(s) associé(s)	Type d'échantillon
1) 13-181217-0026	Nouveau-né (LOD)	75 jours	M	Méningite	/	LCR
2) 13-180913-0047	Adulte	40 ans	F	Bactériémie	Immunodépression + neutropénie fébrile	Sang
3) 13-180928-0008	Femme enceinte	30 ans	F	Chorio-amnionite	/	Sang
4) 13-181129-0002	Nouveau-né (EOD)	0 jour	M	Décès à la naissance	*	Sang
5) 13-181019-0064	Adulte	28 ans	F	**	/	Frottis vaginal
6) 13-180111-0021	Adulte	44 ans	F	Bactériémie	/	Sang
7) 13-180102-0008	Adulte	61 ans	F	mal perforant plantaire	/	Plaie
8) 13-180116-0041	Nouveau-né (LOD)	112 jours	F	Méningite	Prématurité	LCR
9) 13-180116-0025	Adulte	58 ans	M	***	/	Sang
10) 13-180110-0037	Adulte	76 ans	M	****	/	LCR
11) 13-180202-0008	Adulte	77 ans	F	Bactériémie	Diabète	Sang
12) 13-180320-0001	Nouveau-né (EOD)	1 jour	F	Sepsis	/	Liquide gastrique
13) 13-180320-0038	Adulte	53 ans	F	Bactériémie	Immunodépression	Sang
14) 13-180412-0048	Adulte	80 ans	F	Endocardite	/	Valve aortique
15) 13-180131-0017	Nouveau-né (LOD)	63 jours	M	Bactériémie	/	Sang
16) 13-180411-0023	Nouveau-né (EOD)	3 jours	M	Bactériémie	/	Sang
17) 13-180302-0035	Adulte	87 ans	F	Bactériémie	/	Sang
18) 13-180301-0005	Adulte	90 ans	M	Bactériémie	/	Sang
19) 13-180220-0010	Adulte	46 ans	M	Infection articulaire	/	Ponction du genou
20) 13-180615-0024	Adulte	63 ans	F	Érysipèle de la jambe	Diabète	Sang
21) 13-180718-0001	Adulte	61 ans	M	Érysipèle + ***	Grefe rénale + diabète	/
22) 13-180626-0005	Femme enceinte	38 ans	F	Portage femme enceinte	/	Tractus génital
23) 13-180530-0027	Adulte	86 ans	F	Bactériémie	Immunodépression	Sang

*Infection à *klebsiella pneumoniae* + présence d'une chorio-amnionite chez la mère, positive à l'accouchement

**Infection mixte : association avec une infection à *Staphylocoque aureus* et *Candida albicans*

***Bactériémie + infection peau et tissus mous

****Carcinome spinocellulaire + thrombose du sinus caverneux

N° souche	Statut	Âge	Sexe	Symptôme(s)	Facteur(s) associé(s)	Type d'échantillon
24) C180001	Femme enceinte	/	F	Colonisation vaginale	/	Frottis vaginal
25) C180007	Femme enceinte	/	F	Colonisation vaginale	/	Frottis vaginal
26) C180015	Femme enceinte	/	F	Colonisation vaginale	/	Frottis vaginal
27) C180022	Femme enceinte	/	F	Colonisation vaginale	/	Frottis vaginal
28) C180023	Femme enceinte	/	F	Colonisation vaginale	/	Frottis vaginal
29) C180032	Femme enceinte	/	F	Colonisation vaginale	/	Frottis vaginal
30) C180004	Femme enceinte	/	F	Colonisation vaginale	/	Frottis vaginal
31) C180014	Femme enceinte	/	F	Colonisation vaginale	/	Frottis vaginal
32) C180012	Femme enceinte	/	F	Colonisation vaginale	/	Frottis vaginal
33) C180030	Femme enceinte	/	F	Colonisation vaginale	/	Frottis vaginal
34) C180039	Femme enceinte	/	F	Colonisation vaginale	/	Frottis vaginal
35) C180043	Femme enceinte	/	F	Colonisation vaginale	/	Frottis vaginal
36) C180006	Femme enceinte	/	F	Colonisation vaginale	/	Frottis vaginal
37) C180013	Femme enceinte	/	F	Colonisation vaginale	/	Frottis vaginal

Annexe 2: Le mode opératoire pour l'utilisation du logiciel WGS typer

L'utilisation de l'outil se résume en cinq étapes. Celui-ci est uniquement accessible via un ordinateur du service de Microbiologie.

Étape 1: Choisir *Streptococcus agalactiae* comme organisme à typer

Étape 2 : Création d'un échantillon

- Cliquer sur « sample »
- Cliquer sur « New Sample »
- Entrer un nom unique à l'échantillon

Par exemple : Souche 13-180102-0008

La case « description » est optionnelle

Étape 3 : Ajouter des données génomiques

- Cliquer sur le bouton vert « add genomic data »
- Ajouter les fichiers contenant les séquences forward et reverse, envoyés par le GIGA genomics

Après ajout des séquences, un contrôle qualité est appliqué. Il dure quelques secondes

Étape 4 : Assemblage des séquences

- Lancer l'assemblage en cliquant sur le bouton vert « assemble »

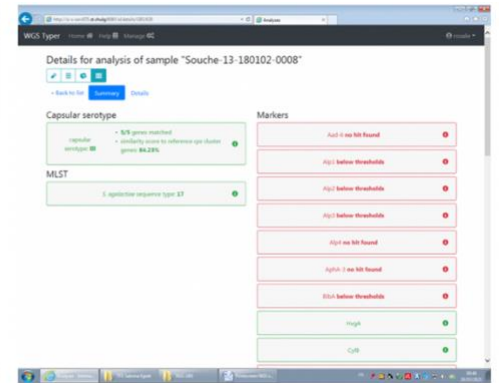
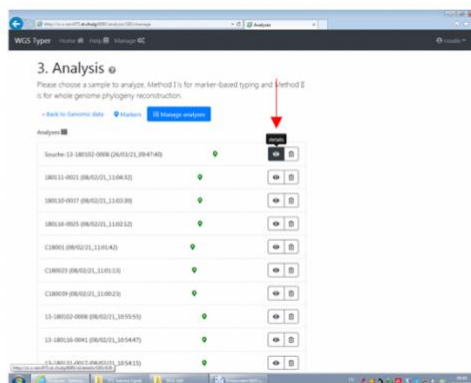
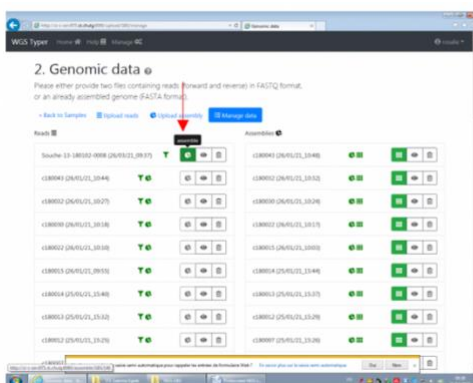
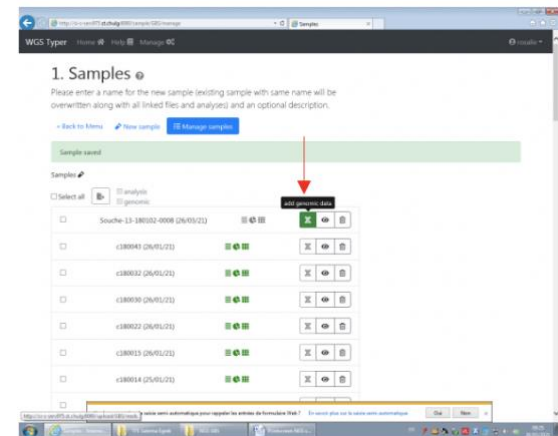
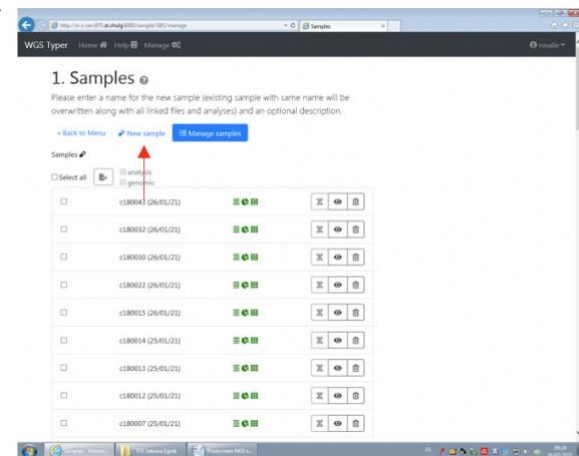
Le processus dure environ 5 minutes

Étape 5 : Analyse du génome

- Lancer l'analyse en cliquant sur le bouton vert « to analysis », puis sur « analyze »

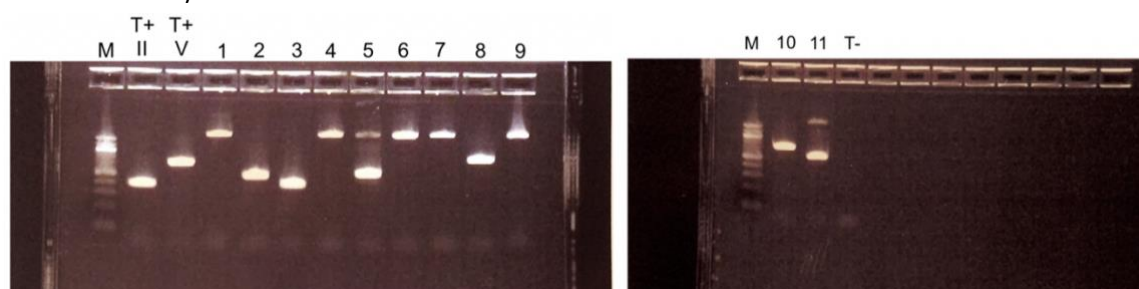
L'analyse dure quelques secondes

- Une fois l'analyse terminée, cliquer sur le bouton œil/ « details » pour avoir accès aux résultats



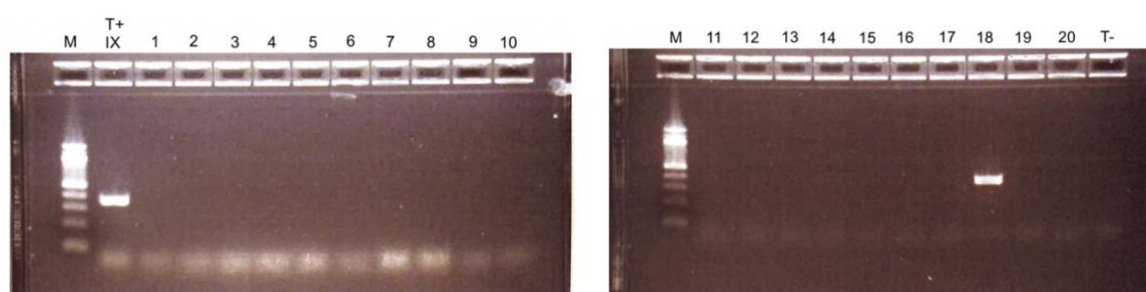
Annexe 3: les résultats du premier run lancé pour chaque type de PCR employée

▪ PCR Poyart



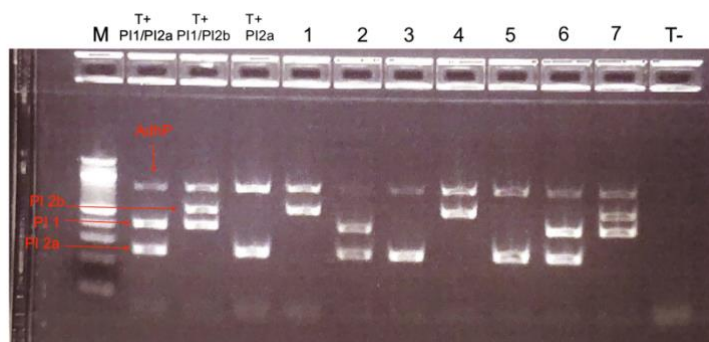
Légende : M = marqueur ; T+II = témoin positif pour le sérotype II ; T+V= témoin positif pour le sérotype V ; T- = témoin négatif ; 1 à 11 = numéro des échantillons (Cf. Annexe 1)

▪ PCR Kong



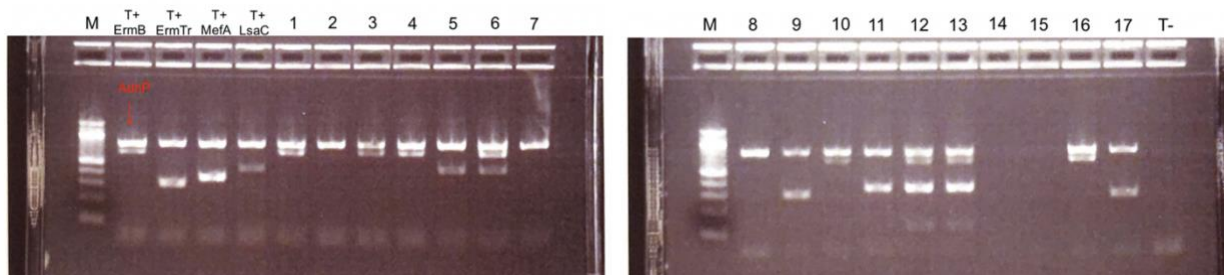
Légende : M = marqueur ; T+IX= témoin positif pour le sérotype IX ; 1 à 20 = numéro des échantillons (Cf. Annexe 1)

▪ PCR pili



Légende : M = marqueur ; T+ PI1/PI2a= témoin positif pour les protéines PI1 et PI2a ; T+PI1/PI2b= témoin positif pour les protéines PI1/PI2b; T+PI2a= témoin positif pour la protéine PI2a ; T-= témoin négatif ; 1 à 7 = numéro des échantillons (Cf. Annexe 1)

- PCR MLS



Légende : M = marqueur ; T+ ErmB= témoin positif pour le gène ErmB ; T+ErmTr= témoin positif pour le gène ErmTr; T+MefA= témoin positif pour le gène MefA ; T+LsaC= témoin positif pour le gène LsaC ; T-= témoin négatif ; 1 à 17 = numéro des échantillons (Annexe 1)

Annexe 4: Extraction de la séquence protéique de 13-180202-0008 via l'outil WGS typer et son analyse sur Blast

La séquence protéique (405 acides aminés) :

MEKYNNWKLKFYTIWAGQAVSLITSAILQMAIIFYLTEKTGSAMVLSMASLLGFLPYAVFGPAIGVLVDRH
DRKKIMIGADLIIAAGSVLTIVAFYMELPVWMVMIVLFIRSIGTAFHTPALNAVTPLLVP EEQLTKCAGYS
QSLQSIYIVSPAVALLYSVWELNAIIAIDVLGAVIASITVAIVRI PKLGDRVQSLDPNFIREMQEGMAVLR
QNKGLFALLLVGTYLMFVYMPINALFPLISMDYFNGTPVHISITEISFASGMLIGG LLLGLFGNYQKRILLITA
SIFMMGISLTISGLLPQSGFFIFVCCAIMGSLVPFYSGVQTALFQEKIKPEYLGRVFSLTGSIMSLAMPIGLIL
SALFADRIGVNHWFLLSGTLIICIAIVCPMINEIRKLDLK

Les séquences les plus proches sur BLAST sont :

Descriptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy					
Sequences producing significant alignments								
Download ▼ New Select columns ▼ Show 100 ▼ ?								
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment New MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> MULTISPECIES: macrolide efflux MFS transporter Mef(A) [Streptococcus]	Streptococcus	811	811	100%	0.0	100.00%	405	WP_000417517.1
<input checked="" type="checkbox"/> macrolide-efflux pump protein [Streptococcus phage phi29854]	Streptococcus phage phi29854	811	811	100%	0.0	99.75%	405	QJD49465.1
<input checked="" type="checkbox"/> macrolide efflux MFS transporter Mef(A) [Streptococcus pneumoniae]	Streptococcus pneumoniae	810	810	100%	0.0	99.75%	405	WP_061630909.1
<input checked="" type="checkbox"/> macrolide efflux MFS transporter Mef(A) [Streptococcus pyogenes]	Streptococcus pyogenes	810	810	100%	0.0	99.75%	405	WP_094398410.1
<input checked="" type="checkbox"/> MULTISPECIES: macrolide efflux MFS transporter Mef(A) [Streptococcus]	Streptococcus	810	810	100%	0.0	99.75%	405	WP_061909557.1

Évaluation du séquençage à haut débit (NGS) combiné à un outil bioinformatique pour la caractérisation complète de l'infection au *Streptococcus agalactiae* et le remplacement des méthodes actuellement utilisées par le laboratoire.

Le Streptocoque du groupe B, également appelé *Streptococcus agalactiae* ou Group B Streptococcus (GBS), est une bactérie cocci à gram positif, présente naturellement dans le tractus gastro-intestinal et génital des porteurs sains. Ce pathogène opportuniste est responsable de la première cause d'infection néonatale chez les nouveau-nés. Elle se manifeste principalement par des septicémies et des méningites.

Ce travail de fin d'études s'inscrit dans le cadre de l'évaluation d'une nouvelle méthode de typage basée sur le séquençage à haut débit, ou « Next Generation Sequencing » (NGS). Ce dernier, combiné à l'outil bioinformatique « WGS typer », permet une caractérisation complète de la bactérie. L'objectif de ce TFE repose ainsi sur une comparaison entre les méthodes actuellement utilisées au laboratoire (PCR et MLST) et la nouvelle approche. Les facteurs ciblés sont le sérotype capsulaire, les protéines pili, les gènes de résistance et le « sequence type ».

Les résultats obtenus pour les 37 souches étudiées sont majoritairement similaires entre les deux démarches. Au vu des avantages du NGS, il fera prochainement l'objet d'une validation de méthode au sein du Centre National de Référence du GBS.

Mots clés : GBS, *Streptococcus agalactiae*, séquençage, NGS, bioinformatique

Evaluation of high-throughput sequencing (NGS) combined with a bioinformatics tool for the complete characterization of *Streptococcus agalactiae* infection and replacement of methods currently used by the laboratory.

Group B Streptococcus, also known as *Streptococcus agalactiae* or Group B Streptococcus (GBS), is a gram-positive cocci bacterium, found naturally in the gastrointestinal tract and genital healthy carriers. This opportunistic pathogen is responsible for the leading cause of neonatal infection in newborns. It is mainly manifested by septicemia and meningitis.

This graduation project is part of the evaluation of a new typing method based on high-throughput sequencing, or "Next Generation Sequencing" (NGS). The latter, combined with the bioinformatics tool "WGS typer", allows a complete characterization of the bacteria. The aim of this work is thus based on a comparison between the methods currently used in the laboratory (PCR and MLST) and the new approach. The targeted factors are the capsular serotype, the pili proteins, the resistance genes and the "sequence type".

The results obtained for the 37 strains studied are mostly similar between the two approaches. In view of the advantages of the NGS, it will soon be the subject of a method validation within the National Reference Center of the GBS.

Keywords: GBS, *Streptococcus agalactiae*, sequencing, NGS, bioinformatics