

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre
et de l'Univers

Département d'Ecologie et Génie de l'Environnement

Laboratoire de Biologie, Eau et Environnement



THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat 3^{ème} cycle en Sciences Biologiques

Option: Santé, Eau et Environnement

Thème

**Etude épidémiologique moléculaire du portage de
Streptocoque de groupe B chez la femme enceinte à
Guelma: prévalence, facteurs de risque et résistance
aux antibiotiques des souches isolées**

Présentée par

BERGAL Amira

Directeur de thèse: BENOUARETH D. E. Prof. Université de Guelma

Devant le jury:

Présidente:	BENDJEDDOU D.	Prof.	Université de Guelma
Examinatrice:	KIRANE-GACEMI D.	Prof.	Université d'Annaba
Examineur:	BITAM I.	MCA	Université de Boumerdes
Examinatrice:	GARARA N.	MCA	Université de Guelma
Membre invité:	ROLAIN J. M.	Prof.	Université d'Aix-Marseille
Membre invité:	BENTORKI A. A	MAA	CHU DORBAN d'Annaba
Membre invité:	LOUCIF L.	MCB	Univesité de Batna

Année Universitaire 2015/2016

Remerciements

Ce travail est le fruit d'une «aventure» de plus de trois ans, qui n'aurait pas pu voir le jour sans le soutien de nombreuses personnes que je tiens à remercier ici.

*Tous d'abord, je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude au **Professeur Jean-Marc Rolain** pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser la plus importante partie de ma thèse dans son unité de recherche. J'ai pu bénéficier de ses précieux conseils, de son sens critique et de sa rigueur dans le travail.*

*Je remercie infiniment mon directeur de thèse, **Professeur BENOUARETH Djamel Eddine**, merci pour votre disponibilité, amitié, soutien et votre appui constant. Vous m'aviez apporté vos conseils et surtout votre confiance ainsi qu'une liberté de décision. Vous étiez toujours attentive à mon avis. Et ça je sais que ce n'est pas donné à tous les thésards. Je suis très heureuse d'avoir pu bénéficier de votre encadrement.*

*Je désire adresser toute ma gratitude à Monsieur le **Docteur BENTOURKI Ahmed Aymen**, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire à l'hôpital IBN ZOR (Guelma), ce qui m'a aidé à réaliser la première partie de mon travail. Je n'oublierai pas nos discussions scientifiques, et vos précieux conseils.*

Merci infiniment à tous le staff du laboratoire d'IBN ZOHR pour leur aide précieuse et leur soutien.

*Il m'est particulièrement agréable de remercier le **Professeur HOUHAMDI Moussa** directeur du laboratoire «Santé, Eau et Environnement», Pour l'aide*

*irremplaçable qu'il m'a apportée, en trouvant ici l'expression de ma profonde gratitude. Je tiens également à remercier **Mlle ABABSA Leila** qui m'a permis de passer des bons moments partagés dans notre laboratoire grâce à son aide.*

Mes remerciements s'adressent également à:

***Docteur GAAS Nardjas** et **Docteur DIB Salim**, pour m'avoir accepté en me consacrant leur temps pour l'évolution de ma partie pratique.*

*Un remerciement à **Mlle Samira** pour l'aide qu'elle m'a apportée et les conseils qu'elle m'a donnés.*

*Merci **Docteur LOUCIF Lotfi** pour ton grand aide, ta bonne humeur, ta patience et pour avoir supporté ma conception assez personnelle du rangement.*

*Je tiens aussi à remercier les membres de l'équipe **URMITE** «Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France », où j'ai passé une année riche d'enseignements et de découvertes sous la direction du Professeur Jean Marc **ROLAIN**, spécialement **Madame FILOSA Valérie**.*

*Un grand merci à **Mlle HADJEJ Linda** que j'ai côtoyée chaque jour, et qui a rendue mon stage Doctoral plus facile.*

*Un grand merci également à; **CEDRIC Abat**, **BAKOUR Sofian**, **AL BAYSSARI Charbel**, **OLAITAN Abiola**, **MA El-Sayed-Ahmed**, **BATAH Rim**, **KHENNOUCHI Nour** et **LOUCIF Asma**.*

J'adresse mes vifs remerciements par ailleurs:

A notre Maître et Président du Jury

-Professeur BENEJOUDDOU Dalila

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant la présidence de notre Jury de thèse.

-Professeur BITAM Idir, pour avoir honoré ce travail en l'évaluant et en acceptant de participer à cette soutenance.

-Professeur KIRANE-Gacemi Djamila, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de participer à mon jury de thèse.

- M.C.A. Madame GRARA Ndjoud, pour avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.

Je vous suis infiniment reconnaissante pour votre investissement dans ce travail.

*Je tiens à remercier particulièrement mes très **chers parents** de m'avoir permis de réaliser ce travail grâce à leur financement et leur encouragement, leurs disponibilités, leurs patiences et leurs conseils avisés et leurs soutiens qui m'ont été très précieux.*

*Mon remerciement s'adresse aussi à **mon frère** et mes cousines, à mes **grands-parents**, mes tantes plus spécialement ma tante **karima** et mes oncles pour leurs soutien et leurs encouragement.*

*Merci à tous mes amies et collègue de Guelma ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail (**BOUGUENOUN Imene, ABDA Ahlem et TABET Mouna, LAYADA Samiha et MOUMENE Meriem**).*

Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Partie 1: Revue de la littérature 4

Chapitre I. Etude de l'espèce *Streptococcus agalactiae* 4

1. Historique 4

2. Taxonomie et nomenclature 5

3. Caractères bactériologiques 5

3.1. Caractères morphologiques et cultureux 5

3.2. Caractères biochimiques et métabolisme 6

3.3. Caractères antigéniques 7

3.4. Caractères génomiques 7

4. Identification de *Streptococcus agalactiae* 7

4.1. Examen direct 8

4.2. Recherche d'antigènes solubles à partir des prélèvements biologiques 8

4.3. L'isolement du germe 8

4.4. Caractérisation de *S. agalactiae* 9

5. Ultrastructure bactérienne 9

5.1. La paroi 9

5.2. La capsule	10
5.3. Le cytoplasme et la membrane plasmique	10
5.4. Les substances produites	11
6. Pouvoir pathogène	11
6.1. Facteurs de pathogénicité	11
6.2. Les facteurs favorisant l'échappement immunitaire	12
6.3. Facteurs favorisant adhésion et invasion de la surface cellulaire de l'hôte	12
6.4. Autres facteurs contribuant à la pathogénie de <i>S. agalactiae</i>	13
7. Antibiotype	14
7.1. Résistance naturelle	14
7.2. Résistance acquise	14
8. Marqueurs épidémiologiques	17
8.1. Marqueurs phénotypiques	17
8.1.1. La sérotypie	17
8.1.2. La lysotypie	18
8.1.3. Electrophorèse des isoenzymes métaboliques	18
8.2. Marqueurs génotypiques	18
8.2.1. Sérotypage moléculaire	18
8.2.2. Amplification-séquençage pour l'étude du polymorphisme multilocus: Multi- Locus Sequence Typing (MLST)	20
8.2.3. Profils de restriction de l'ADN génomique total: Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	22
8.2.4. Amplification aléatoire de différentes parties du génome: Random	23

Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)	
8.2.5. Electrophorèse en champ pulsé: Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)	23
9. La spectrométrie de masse MALDI-TOF MS (Nouvel outil de marquage épidémiologique)	23
9.1. Introduction	23
9.2. Historique	24
9.3. Principe de fonctionnement	24
9.4. Banque de spectres	26
9.5. Utilisations de la spectrométrie de masse	27
Chapitre II: Le portage de <i>Streptococcus agalactiae</i>	29
1. <i>Streptococcus agalactiae</i> et la période périnatale	29
1.2. Colonisation	29
1.3. Transmission	29
1.4. Incidence des infections materno-fœtales	31
1.5. Les infections chez le nouveau-né	31
1.5.1. La forme précoce	31
1.5.2. La forme tardive	32
1.5.3. Taux de mortalité	33
1.6. Les infections de la femme enceinte	33
1.6.1. Facteurs de risque	34
1.6.2. Sérotypes capsulaires des souches impliquées dans les infections néonatales	34

1.7. Prévention de l'infection précoce à streptocoque du groupe B	35
1.7.1. Dépistage du portage pendant la grossesse	35
a. Recommandations américaines	35
b. Recommandations françaises	35
1.7.2. Antibioprophylaxie per-partum	36
a. Recommandations américaines	36
b. Recommandations françaises	37
1.7.3. Modalités de l'antibioprophylaxie	37
1.8. Les infections génitales au cours de la grossesse liées au portage de SGB	39
1.8.1. Rappel sur la flore vaginale	39
1.8.2. Type de vaginites	40
a. Vaginite à candida (champignons ou levure)	40
b. Vaginose bactérienne	41
c. Vaginite à trichomonas	41
1.8.3. Diagnostic et traitement des infections	42
2. <i>Streptococcus agalactiae</i> chez l'adulte en dehors de la grossesse	43
2.1. Prévalence de la colonisation	43
2.2. Incidence et émergence des infections	43
2.3. Démographie et taux de mortalité	44
2.4. Sérotype capsulaire dans les infections invasives chez l'adulte	44
2.5. Conditions prédisposantes et facteurs de risque des infections chez l'adulte	45
2.6. Les manifestations cliniques	45

2.7. Les infections récurrentes	46
2.9. Les infections polymicrobiennes	46
Partie 2: Matériel et Méthodes	47
1. Cadre et objectifs de l'étude	47
2. Souches bactériennes	48
3. Analyse préliminaire	48
3.1. Recueil des données et dépistage	48
3.1.1. Fiche de prélèvement	49
3.1.2. Démarche de diagnostique	50
3.2. Prélèvements	50
3.2.1. Technique d'analyse de laboratoire	50
3.3. Diagnostic des infections	51
3.3.1. Vaginoses bactériennes (VB)	51
3.3.2. Vaginite	53
3.4. Analyse des données	54
4. Analyse secondaire	55
4.1. Caractérisation des souches de <i>S. agalactiae</i>	55
4.1.1. Isolement et identification	55
a. API 20-Strep	55
b. Sérogroupage de Lancefield	56
c. CAMP Test	57
d. La spectrométrie de masse MALDI-TOF MS (Microflex)	58

4.1.2. Biomarquage	62
4.2. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques (Antibiotype)	63
4.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) parE-test	64
5. Analyse Moléculaire	65
5.1. Extraction d'ADN à partir des cultures bactériennes	65
5.2. Préparation des amorces (primers)	66
5.3. Polymérase Chain Réaction (PCR) standard	66
5.4. Support génétique de la résistance	67
5.5. Séquençage	69
5.6. Sérotypage moléculaire	72
5.7. MultiLocus Sequence Typing	74
5.8. Détermination des complexes clonaux	77
5.9. Réalisation des arbres phylogénétiques	78
5.10. Conservation des souches	79
5.11. Analyses statistiques	79
Partie 3: Résultats	81
1. Analyse préliminaire (Portage de <i>S.agalactiae</i>)	81
1.1. Portage de <i>S.agalactiae</i>	81
1.2. Fréquence de portage	81
1.3. Analyse des données (Terrain)	82
1.3.1. Age gestationnel (trimestres de grossesse)	82
1.3.2. Age	85

1.3.3. Parité	86
1.3.4. Niveau socio-économique (S-E) (incluant le niveau d'étude)	88
1.3.5. Nombre de toilettes intimes (<5 fois / >5 fois)	89
1.3.6. Antécédents	89
1.3.7. Paramètres inhérent à la grossesse actuelle	90
1.3.8. Les infections génitales	92
2. Analyse secondaire	101
2.1. Identification	101
2.1.1. Enrichissement	101
2.1.2. Culture	101
2.1.3. Identification	103
2.2. Analyse des données	107
2.2.1. Biotypage des souches de <i>S. agalactiae</i> par MALDI-TOF MS	110
2.2.2. Détections des clones de virulence par MALDI TOF-MS	112
2.3. Sensibilité aux antibiotiques	115
2.3.1. Résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux glycopeptides	115
2.3.2. Résistance aux Macrolides-Lincosammides-Synergestines (MLS) et au Cycline (Tétracycline)	116
2.3.3. Phénotypes de résistance	122
2.3.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E- test	124
2.3.5. Détermination du support génétique de la résistance (Amplification par PCR Standard)	126

2.3.6. Analyse des données	132
2.3.7. Séquençage et analyse des séquences	134
2.3.8. Arbre phylogénétique	137
2.3.9. Sérotypes moléculaires	140
2.3.10. Génotypage par Multi-locus séquence typing (MLST)	146
2.3.11. Position phylogénétique des souches	153
2.3.12. Corrélation entre les gènes de résistance, sérotypes, séquences types et complexes clonaux des souches de <i>S. agalactiae</i> isolées de Guelma, Algérie et de Marseille, France	161
Partie 4. Discussion	173
Partie 5. Conclusion et perspective	194
Références bibliographiques	
Résumés	
Annexes	

Liste des abréviations

%	Pourcent
C°	Le degré Celsius
µl	Microlitre
16S	Svedberg (vitesse de sédimentation)
30S	Ribosome bactérien
A	Adénine (base azotée)
AAP	American Academy of Pediatrics
ACOG	American College of Obstetrics and Gynecology
ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
Alp	Alpha-like protein
AX	Amoxicilline
AMP	Ampicilline
ANAES	Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé
AP	Accouchement Prématuro
ARGANNOT	Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation
ARN	Acide Ribo Nucléique
ATCD	Antécédent
BET	Bromure d'éthidium BET
BHE	barrière hématoencéphalique
BTS	Bacterial Test Standard
C	Cytosine (base azotée)
C+G%	Pourcentage en guanin+cytosine du génome (coefficient de Chagraff)
CAMP	Christie-Atkins-Munch-Peterson
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CRO	Céftriaxone
CC	Complexe Clonal
CCI	Indice de Corrélation des Composants
CDC	Center for Disease Control
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
DA	Clindamycine
CMI	Concentration Minimal Inhibitrice

cMLS_B	constitutive Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B
CO₂	DiOxyde de Carbone
CPS	Capsular Polysaccharide Synthesis
CT	Chlamydia trachomatis
CylE	cytolysine
DLV	Double Locus Variant
dNTP	désoxyNucléotide TriPhosphate
ECBU	Examen CytoBactériologique des Urines
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
<i>Erm</i>	Erythromycin ribosome methylase
E	Erythromycine
F	Forward
G	Guanine (base azoté)
CN	Gentamicine
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
GUE	Grossesse Extra-Utérine
H	Heures
HCCA	Alpha-Cyano-a-hydroxy-Cinnamic Acid
HTA	Hypertension Artérielle
<i>iagA</i>	invasion-associated gene
IMF	Infections Materno-Fœtales
iMLS_B	inductible Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IST	Infection Sexuellement Transmissible
Lmb	Laminin-binding protein
M	Marqueur
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight Mass Spectrometry
MS	
MAP	Menace d'Accouchement Prématuro
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
<i>mefA/E</i>	macrolide efflux
<i>MeV</i>	Multiexperiment Viewer
Mg	Milligramme

Min	Minute
MI	Millilitre
MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis
MLS_B	Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B
MLST	Multi-Locus Sequence Typing
M.T.S	Maladie Transmise Sexuellement
mm	Millimètre
MSP	Main Spectrum Profile
MTS	Maladie Transmise Sexuellement
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	Neighbour Joining
NT	Non Typable
NSE	Niveau Socio-Economique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OXA	Oxacilline
PNG	Pénicilline G
Pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PCA	Analyse en Composante Principale
PT	Pristinamycine
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
PV	Prélèvement Vaginal
PVL	Panton-Valentine leukocidin
R	Reverse (inverse)
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Rib	Resistance to proteases, immunity, group B
RA	Rifampicine
RPM	Rupture Prématuration des Membranes
RPMAT	Rupture Prématuration des Membranes Avant Terme
SA	Semaine d'Aménorrhées
SGB	Streptocoque du groupe B

SkzL	Laminin-binding protein
SLV	Single Locus Variant
SodA	Superoxide Dismutase
Spp	Species (espèce)
Srr	Serine-rich repeat
ST	Sequence Type
TBE	Tris, Borate, EDTA
TE	Tris EDTA
Tet	Tetracycline
TLV	Triple Locus Variant
tr/min	nombre de tours par minute
TFA	Acide TriFluorocétique
TSA	Antigène spécifique de type
TW	Todd Hewitt
UMR	Unité Mixte de Recherche
UV	Ultraviole
VA	Vancomycine
VB	Vaginoses Bactériennes
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques des infections à SGB.	33
Tableau 2: Bactéries maternelles à risque infectieux néonatal.	39
Tableau 3: Fiche d'évaluation du portage de streptocoque du groupe B.	49
Tableau 4: Évaluation du score de Nugent de la flore vaginale.	52
Tableau 5: Fiche de résultats.	54
Tableau 6: Traduction des profils numériques de <i>Streptococcus agalactiae</i> en caractères biochimique.	55
Tableau 7: Composition des mélanges réactionnels pour les PCR standards.	67
Tableau 8: Liste des oligonucléotides utilisés dans ce travail.	68
Tableau 9: Composition du mélange réactionnel pour la PCR Big Dye.	71
Tableau 10: Programme de l'amplification de la PCR Big Dye.	71
Tableau 11: Liste des oligonucléotides utilisé pour le sérotypage.	73
Tableau 12: Gènes de ménage pour la technique MLST.	75
Tableau 13: Amorces utilisé pour la technique MLST.	75
Tableau 14: Evolution du portage de SGB au cours des trois trimestres en fonction du nombre de prélèvements.	85
Tableau 15: Résultats d'identification par MALDI-TOF MS.	107
Tableau 16: Provenance des 93 souches de <i>Streptococcus agalactiae</i> .	108
Tableau 17: Sensibilité aux antibiotiques des 93 souches de <i>S. agalactiae</i> .	117
Tableau 18: Répartition des phénotypes de résistance de 37 isolats cliniques résistants à l'érythromycine à Guelma et à Marseille.	122
Tableau 19: Répartition des souches en fonction de l'expression des gènes de résistance vis-à-vis leurs phénotypes entre Guelma et Marseille.	133
Tableau 20: Répartition des phénotypes et génotypes des souches de SGB résistantes à la tétracycline entre Guelma et Marseille.	134
Tableau 21: Model du Blast sur ARGANNOT.	135
Tableau 22: Répartition globale des sérotypes.	144
Tableau 23: Profile alléliques (ST) des 93 souches de SGB.	149
Tableau 24: Distribution des séquences type (STs) entre Guelma et Marseille.	152
Tableau 25: Répartition des complexes clonaux entre Guelma et Marseille.	155
Tableau 26: Répartition des Séquence Types (STs) dans les complexes clonaux.	157

Tableau 27: Résistance aux macrolides selon le type capsulaire.	161
Tableau 28: Résistance aux macrolides selon l'appartenance aux complexes clonaux.	163
Tableau 29: Distribution des STs au sein des types capsulaires.	164
Tableau 30: Corrélation entre complexes clonaux et sérotypes.	166
Tableau 31: Corrélation entre gènes de résistance, sérotypes capsulaire et séquences types des souches de <i>S. agalactiae</i> isolées à Guelma, Algérie et à Marseille, France.	167
Tableau 32: Corrélations entre phénotypes de résistance, sérotypes, et séquences types (STs) des souches isolées en fonction du site de prélèvement entre Guelma et Marseille.	172
Tableau 33: Taux de portage selon les séries publiées.	176
Tableau 34: Taux de portage du SGB selon l'origine ethnique.	181

Liste des figures

Figure 1: Photographies de deux cas de mammites infectieuses à SGB chez la vache laitière.	5
Figure 2: Différents aspects de l'hémolyse des streptocoques sur gélose au sang.	6
Figure 3: CAMP-Test.	7
Figure 4: Milieux d'identification rapide de <i>S. agalactiae</i> .	8
Figure 5: Structure des streptocoques.	10
Figure 6: Facteurs de pathogénicité impliqués dans les infections à SGB.	14
Figure 7: Séquences d'ADN de la région cps.	19
Figure 8: Distribution des principaux STs selon l'origine clinique des souches.	22
Figure 9: Modes de contamination materno-fœtale.	30
Figure 10: Schéma représentant les différentes entités des infections materno-fœtales et leur transmission.	31
Figure 11: <i>S. agalactiae</i> , pathogène du nouveau-né.	32
Figure 12: Dépistage systématique du SGB pendant la grossesse.	36
Figure 13: Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.	25
Figure 14: Principe d'ionisation par la technique MALDI.	26
Figure 15: Spectre MALDI-TOF.	26
Figure 16: Motif stries pour le test de CAMP.	58
Figure 17: Insertion de la cible MALDI et interprétation des résultats	61
Figure 18: Protocole de la spectrométrie de masse MALDI-TOF MS.	62
Figure 19: Pics discriminants des souches de SGB analysés par MALDI-TOF MS	62
Figure 20: Extracteur EZ1 XL.	66
Figure 21: Procédure d'extraction par EZ1.	66
Figure 22: Schéma représentant les bandes électrophorétiques des sept gènes de ménage.	76
Figure 23: Capture d'écran de l'onglet « Analyzed » du logiciel CodonCode Aligner.	77
Figure 24: Capture d'écran de la fenêtre « Diagram » du logiciel eBURST.	78
Figure 25: Capture d'écran de la fenêtre de visualisation des arbres phylogénétiques du logiciel MEGA.	79
Figure 26: Fréquence globale du portage de SGB.	81
Figure 27: Fréquence du portage de SGB au cours des trois trimestres de la grossesse.	82
Figure 28: Répartition du portage de SGB au cours des trois trimestres de la grossesse.	82
Figure 29: Evolution du portage de SGB au cours des trois trimestres de la grossesse.	83

Figure 30: Répartition du portage de SGB au cours du 3 ^{ème} trimestre.	84
Figure 31: Taux du portage de SGB au cours du 3 ^{ème} trimestre.	84
Figure 32: Distribution des patientes en fonction du nombre de prélèvements positifs par trimestres.	85
Figure 33: Répartition du portage de SGB en tranches d'âge.	86
Figure 34: Distribution des patientes en fonction de la parité.	87
Figure 35: Parité selon les résultats positifs des prélèvements.	87
Figure 36: Distribution des patientes en fonction du niveau S-E.	88
Figure 37: Niveau S-E selon les résultats des prélèvements.	88
Figure 38: Répartition du portage en fonction du nombre de toilette intime.	89
Figure 39: Antécédents selon résultats des prélèvements.	91
Figure 40: Répartition du portage de SGB en fonction des antécédents.	92
Figure 41: Observations microscopiques d'une flore normale à l'état frais et après coloration de Gram des frottis vaginaux.	93
Figure 42: Répartition des infections vaginale.	94
Figure 43: Examen microscopique de <i>T. vaginalis</i> .	95
Figure 44: Observation macroscopique et microscopique des levures.	96
Figure 45: Examen microscopique (Gram) des levures.	96
Figure 46: Observations microscopiques d'une flore de vaginose bactérienne après coloration de Gram des frottis vaginaux.	98
Figure 47: Distribution du portage de SGB par rapport aux infections.	99
Figure 48: Distribution des infections mixtes.	100
Figure 49: Distribution des infections mixtes en fonction du portage de SGB.	100
Figure 50: Bouillon d'enrichissement TW après 24 h d'incubation.	101
Figure 51: Culture de SGB sur géloses Columbia+5% de sang de mouton (sans et avec milieux d'enrichissement) et sur la gélose chromogène CHROM agar™ StrepB.	102
Figure 52: Observation microscopique des colonies de SGB après la coloration de Gram.	103
Figure 53: Profil Api 20 Strep.	104
Figure 54: Identification de <i>S. agalactiae</i> par sérogroupage de Lancefield.	105
Figure 55: Identification de <i>S. agalactiae</i> par Camp test.	106
Figure 56: Analyse typologique par MALDI-TOF MS des spectres de <i>S. agalactiae</i> isolé à Guelma et à Marseille (MSP dendrogramme).	111
Figure 57: Gel View (extraction des pics).	112

Figure 58: Détection rapide par MALDI-TOF MS des clones de virulences ST-1.	114
Figure 59: Détection rapide par MALDI-TOF MS des clones de virulences ST-17 (Pic discriminant a 7625 DA).	115
Figure 60: Profil d'antibiogramme de la souche (M4) sensible à la gentamycine, pristinamycine vancomycine, tétracycline, rifampicine et à la pénicilline.	116
Figure 61: Clustering Herarching des phénotypes de résistance utilisant le programme <i>MeV</i> .	121
Figure 62: Distribution des phénotypes de résistance entre Guelma et Marseille.	123
Figure 63: Phénotype MLSB constitutif.	123
Figure 64: Phénotype MLSB inductible.	124
Figure 65: Phénotype M.	124
Figure 66: Détermination des CMI d'une souche de SGB sensible à la pénicilline.	125
Figure 67: E.test érythromycine et clindamycine (-a- cMLSB) et (-b- iMLSB).	126
Figure 68: E.test érythromycine et clindamycine (M).	126
Figure 69: Électrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR.	131
Figure 70: PCR Multiplexe de quelques souches de SGB.	132
Figure71: Distributions des gènes de résistance au MLS à Guelma et à Marseille.	132
Figure 72: Distribution des gènes de résistance à la tétracycline entre Guelma et Marseille.	134
Figure 73: Arbre phylogénétique des gènes <i>ermA</i> , <i>ermB</i> et <i>mefA/E</i> .	137
Figure 74: Arbre phylogénétique des gènes <i>tetM</i> et <i>tetO</i> .	138
Figure 75: Position phylogénétique des gènes de résistance.	139
Figure 76: Clustering Herarching des gènes de résistances utilisant le programme <i>MeV</i> .	140
Figure 77: Typage moléculaire par PCR monoplexe.	143
Figure 78: PCR multiplexe de quelques souches sérotypés.	143
Figure 79: Répartition globale des sérotypes.	144
Figure 80: Répartition des sérotypes identifiés à Guelma.	145
Figure 81: Répartition des sérotypes identifiés à Marseille.	145
Figure 82: Répartition des sérotypes entre Guelma et Marseille.	146
Figure 83: Profil électrophorétique du gène <i>adhP</i> des 93 souches de SGB.	148
Figure 84: Répartition globale des séquences types.	148
Figure 85: Soumission d'un nouveau ST dans la base de données Pub Med (Capture écran).	149
Figure 86: Distribution des STs entre Guelma et Marseille.	152

Figure 87: Arbre phylogénétique des 93 souches de <i>S. agalactiae</i> déduit de l'analyse MLST.	154
Figure 88: Distribution des CCs entre les isolats de Guelma et de Marseille.	156
Figure 89: Répartition globale des Complexes Clonaux (CCs).	156
Figure 90: Diagramme eBURST représentant les STs révélés dans cette étude.	159
Figure 91: Diagramme eBURST représentant les STs révélés dans cette étude contre les différentes STs présents dans la base de données d'eBURST.	160
Figure 92: Répartition du taux de la résistance en fonction du sérotype.	162
Figure 93: Résistance aux macrolides selon l'appartenance aux complexes clonaux.	163
Figure 94: Répartition des sérotypes au sein des complexes clonaux.	166



Introduction



Introduction

Streptococcus agalactiae (streptocoque du groupe B ou SGB) est une bactérie commensale des tractus digestif et génito-urinaire de l'Homme. Cependant, cette bactérie peut être impliquée dans des infections sévères chez le nouveau-né et l'adulte dont les personnes âgées et les patients avec des conditions médicales sous-jacentes, telles que le cancer, le diabète ou les maladies du foie [1-3].

Les répercussions de ces infections en termes de santé publique sont très importantes. Il s'agit principalement des séquelles neurologiques chez le nouveau-né et des stérilités maternelles qui succèdent aux endométrites du postpartum. En raison de sa fréquence et des complications qu'elle entraîne, l'infection maternofoetale à *Streptococcus agalactiae* demeure une préoccupation majeure des professionnels de périnatalité [4].

Les infections néonatales à streptocoque du groupe B peuvent être classées comme étant à début précoce ou tardif. Les infections à début précoce surviennent moins de 7 jours après la naissance et représentent 80% des cas de la maladie chez les nouveau-nés (taux de mortalité étant de 5% à 20%) [4]. La prévention de l'infection néonatale se base sur le dépistage de SGB chez la femme enceinte et l'administration d'antibiotiques en intra-partum [5]. Le Center for Disease Control and Prevention (CDC) recommande une stratégie basée sur la chimioprophylaxie intra-partum pour les femmes enceintes pour réduire les infections à SGB chez les nouveaux nés [6]. Cette antibioprofylaxie intrapartum est actuellement considérée comme la stratégie la plus efficace pour diminuer l'incidence de l'infection précoce à SGB chez le nouveau-né même si l'incidence de l'infection tardive reste encore inchangée [7].

Cependant en raison de l'importance de la colonisation maternelle, du pouvoir pathogène de cette bactérie, et des complications pouvant en découler, des stratégies de dépistage, de prévention et de traitement ont été développées.

Du fait de l'absence d'une politique de dépistage systématique dans notre pays, nous avons recouru dans un premier temps à la méthode d'enquête prospective appuyée de la technique d'interview structurée, afin d'évaluer la prévalence du portage maternel du SGB chez les parturientes consultant au cours des trois trimestres de la grossesse au sein de notre structure sanitaire (des cabinets de gynécologues). Ensuite, rechercher les éventuels facteurs de risque associés à ce portage et de pouvoir tirer des conclusions sur des données concrètes propres à notre contexte.

Introduction

Pour prévenir les infections à *S. agalactiae* chez les nouveaux nés, les β -lactamines sont recommandés comme une première ligne de l'antibio-prophylaxie chez les femmes parturientes, les macrolides-lincosamides restent l'alternative thérapeutique en cas d'allergie aux bêta-lactamines [8]. Cependant, l'utilisation de ces antibiotiques comme une alternative de la prophylaxie est remise en question en raison de la progression et l'augmentation remarquable dans les taux de résistance à l'érythromycine et la clindamycine chez *S. agalactiae* [9]. Le premier mécanisme de résistance à l'érythromycine rapporté dans SGB était la modification de la cible ribosomale par une méthylase codée par les gènes *erm(TR)* sous classe d'*ermA* et *ermB* (erythromycin resistance methylase), empêchant la fixation des macrolides sur le ribosome bactérien. Ce mécanisme est à l'origine d'une résistance croisée aux macrolides, lincosamides et streptogramine B (phénotype MLS_B) [10]. Le deuxième mécanisme beaucoup plus rare est l'efflux, qui fait intervenir une pompe. Le domaine transmembranaire de cette pompe est codé par les gènes *mefA/E*. Ce mécanisme est à l'origine d'une résistance isolée aux macrolides à 14 et 15 atomes carbone (phénotype M) [11]. La résistance croissante aux macrolides observés dans le monde-entier souligne la nécessité d'exécuter des études plus détaillées sur les populations de SGB résistantes aux macrolides [12;13]. De même, la résistance des SGB à la tétracycline est également courante. Il existe deux mécanismes de résistance acquise à la tétracycline: la protection ribosomale (modification de cible), mécanisme de loin le plus fréquent chez les streptocoques, porté par les gènes *tetM* ou *tetO*, et le système d'efflux, codé par les gènes *tetK* et *tetL*, beaucoup plus rare [14]. En outre, les gènes de résistance à la tétracycline sont souvent trouvés dans les mêmes éléments génétiques mobiles qui portent des gènes de résistance aux macrolides [15].

Le sérotypage capsulaire est la méthode classique utilisée dans les études épidémiologiques qui définit dix sérotypes de SGB (Ia, Ib, II-IX) [16]. Un des facteurs les plus importants impliqués dans la virulence est la capsule polysaccharidique (CPS) [17], dont les vaccins polyvalents conjugués CPS-protéines ont été développés dans la dernière décennie, ce qui soulève la possibilité de prévenir les maladies périnatales à SGB par la vaccination maternelle [18].

Divers outils de typage épidémiologique développés au cours du temps ont montré l'existence de génogroupes particuliers impliqués dans les infections néonatales et dans certaines infections de l'adulte. Cependant, peu de données voir rare sont publiées dans notre pays.

Introduction

Parmi les procédés multivariés appliqués pour typer les souches de SGB, plusieurs outils moléculaires ont été développés, en particulier la **Multi-Locus Sequence Typing** (MLST), qui a un pouvoir discriminant très élevé [19]. En effet, l'approche MLST a contribué à une meilleure caractérisation de SGB et la classification des génogroupes bactériennes [20] et pareillement elle a été utilisée dans les études épidémiologiques de la génétique des populations des bactéries pathogènes pour l'homme [19]. Plus récemment, le MALDI-TOF (MALDI= **M**atrix-**A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onisation) a émergé comme un outil puissant, rentable et rapide pour l'identification bactérienne dans les laboratoires cliniques et pour le biotypage [21]. D'autres aspects de cette technologie sont potentiellement intéressantes, telles que sa contribution au domaine de la nouvelle caractérisation des espèces, la détection de certains mécanismes de résistance et l'identification simultanée des souches de SGB appartenant au clone le plus virulent ST-17 ou l'émergence du clone ST-1 [22;23]. Un seul rapport en Algérie focalisé sur l'étude des souches de SGB est publié. En outre, ce rapport a enquêté seulement sur les facteurs de risque associés aux infections du nouveau-né par sérotypage en utilisant la méthode classique de séro-agglutination [24]. Toutefois, dans cette étude pour la première fois nous avons ciblé le support moléculaire de la résistance aux antibiotiques, sérotypage moléculaire et la clonalité d'une collection d'isolats cliniques de SGB isolés de Guelma, Algérie et comparés à ceux de Marseille, France.

Ce travail débute par une revue de la littérature décrivant les caractéristiques de SGB, les principaux éléments épidémiologiques, les modes de transmission maternofoetales, les manifestations cliniques chez la femme enceinte et le nouveau-né, le diagnostic biologique et enfin, les stratégies de prévention des infections causées par cette bactérie et finalement traiter les nouveaux outils de typage épidémiologique développés au cours du temps.

Nous présenterons ensuite notre travail expérimental (les techniques et les résultats des analyses réalisées) dont les objectifs étaient de mesurer la prévalence du SGB chez la femme enceinte isolées de la ville de Guelma. Ensuite; mettre en évidence la prévalence et la diversité génétique des souches de SGB par rapprochement entre les isolats de la ville de Guelma et de Marseille, d'identifier le support génétique de cette résistance, le sérotypage et le génotypage. Pour cela, nous avons eu recours à divers techniques de Biologie Moléculaire, telles que la PCR, le typage moléculaire, le séquençage ainsi qu'à *multi-locus sequence typing* (MLST).



Revue de la Littérature



Partie 1: Revue de la littérature

Chapitre I. Etude de l'espèce *Streptococcus agalactiae*

1. Historique

En 1887, Nocard et Mollereau décrivent pour la première fois, le streptocoque de la mammite bovine [25;26] isolé dans le lait de vaches atteintes de mammite (Fig. 1). Il a d'abord été nommé "*Streptococcus* de la mammite" puis baptisé *Streptococcus agalactiae* par Lehmann et Neumann en 1896 (du grec *agalactia*, signifiant absence de lait) [27-29]. En 1933, Rebecca Lancefield crée un système de classification des streptocoques en fonction des antigènes polysaccharidiques de la paroi [30] et classe le streptocoque de la mammite bovine dans le groupe B, groupe qu'elle sépare en 3 sérotypes : I, II et III [31] en 1934. En 1935, Lancefield et Hare découvrent que le streptocoque du groupe B est souvent retrouvé dans les fièvres du post-partum, et Colebrook et Purdie l'isolent pour la première fois dans le sang d'une femme atteinte de septicémie puerpérale en 1937.

A partir de 1958, les infections à streptocoque du groupe B sont documentées et on observe une augmentation de leur fréquence, en particulier chez les nouveaux nés et les nourrissons. Dès les années 1970, les infections invasives materno-fœtales (IMF) à SGB apparaissent comme la première cause de morbidité et de mortalité néonatales [32-34].

Dans les années 1980, des études démontrent que l'administration d'antibiotiques en intrapartum permet la prévention des infections néonatales précoces. De nombreuses recommandations sont alors élaborées par divers organismes pour prévenir la transmission verticale. Aux États-Unis, plusieurs publications se succèdent dès le début des années 1990: The American Academy of Pediatrics (1992) [35]. The American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) (1996) [36] et Centers for Disease Control (CDC) (1996) [37]. En France, il faut attendre 2001 pour que l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES) [38], publie ses recommandations.

Dès la mise en place des recommandations pour le dépistage, le diagnostic et la prophylaxie dans les années 1990, on observe une diminution importante de l'incidence des infections à streptocoques du groupe B. Mais malgré ces recommandations, le streptocoque du groupe B reste à l'heure actuelle la première cause de sepsis néonatal. Parallèlement aux infections néonatales, on observe une augmentation du nombre d'infections à streptocoque du groupe B chez l'adulte [39]. L'incidence de ces infections est en augmentation ces dernières décennies, en particulier chez les personnes présentant des pathologies sous-jacentes.



Figure 1: Photographies de deux cas de mammite infectieuse à SGB chez la vache laitière [25].

2. Taxonomie et nomenclature

L'espèce *Streptococcus agalactiae* appartient à l'ordre des Micrococcales, à la famille des *Streptococcaceae* et au genre *Streptococcus*, qui regroupe actuellement 55 espèces [40]. Avec la classification des streptocoques de Rebecca Lancefield en 1933, basée sur les caractères antigéniques portés par le polyside C et les acides teichoïques, *Streptococcus agalactiae* est classé au sein du groupe B [30]. Il appartient aux streptocoques pyogènes et produit une hémolyse bêta quand il est cultivé sur gélose au sang [41].

3. Caractères bactériologiques

3.1. Caractères morphologiques et cultureux

Les streptocoques sont des cocci à Gram positif, immobiles et asporulés. *S. agalactiae* se présente sous forme sphérique ou ovoïde, de diamètre mesurant 0,6 à 1,2 micromètres (μm), et groupé en diplocoques ou en chaînettes de longueur variable [41].

La paroi de ce germe est constituée d'un peptidoglycane associé à des acides lipotéichoïques, du polysaccharide du groupe B, de protéines et du polyside capsulaire. Le polysaccharide capsulaire des streptocoques du groupe B consiste en la répétition d'un motif trisaccharidique auquel est liée une chaîne latérale qui possède un acide sialique en position terminale [42].

En culture, il est relativement exigeant, se développant sur milieux riches type gélose Columbia additionnée de sang mouton ou cheval à une température optimale de 35-37°C, et sa croissance est favorisée par une atmosphère anaérobie ou enrichie en CO_2 (5 à 10%).

Après 24 heures d'incubation à 37° C, *S. agalactiae* se présente sous forme de petites colonies rondes à bords nets, d'environ 3 à 5 mm de diamètre, blanchâtres, translucides, plates et

muqueuses. Les colonies de *S. agalactiae* masquent une zone étroite d'hémolyse totale ou β -hémolyse. Ces colonies peuvent produire un pigment jaune à rouge brique [43].

Selon le type d'hémolyse entourant les colonies sur gélose au sang, on distingue : les streptocoques α -hémolytiques (hémolyse incomplète, verdâtre), les streptocoques β -hémolytiques (hémolyse complète) et les streptocoques γ -hémolytiques (absence d'hémolyse) (Fig. 2).



Figure 2: Différents aspects de l'hémolyse des streptocoques sur gélose au sang [43].

3.2. Caractères biochimiques et métabolisme

S. agalactiae est une bactérie anaérobie, aéro-tolérante, immobile et asporulé, dépourvue d'oxydase et de catalase, qui ne réduit pas les nitrates. Les principaux caractères d'identification de cette espèce sont les tests de résistance à la bacitracine, au triméthoprime-sulfaméthoxazole, l'hydrolyse de l'hippurate. *S. agalactiae* met en jeu un métabolisme fermentatif du glucose avec une production d'acides lactique, acétique, et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone. Enfin, il est également identifiable par le « CAMP-Test » (Christie-Atkins-Munch-Peterson) [44]. Ce test consiste à renforcer l'expression de la cytolysine CAMP spécifique de *S. agalactiae*, en présence d'une souche de *Staphylococcus aureus* sécrétrice de sphingomyélinase, sur gélose au sang de mouton. L'aspect caractéristique de l'hémolyse β en « aile de papillon » témoigne de l'activité synergique des deux cytolysines sur la paroi des globules rouges de mouton (Fig. 3)

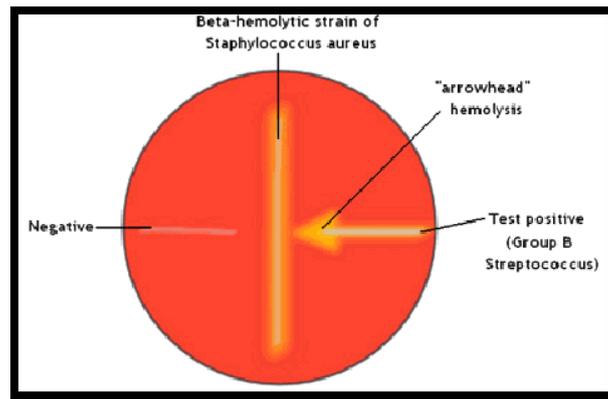


Figure 3: CAMP-TEST [45].

3.3. Caractères antigéniques

La principale caractéristique de *Streptococcus agalactiae* est de posséder l'antigène du groupe B de Lancefield [46]. Toutefois, cet antigène n'est pas spécifique puisqu'il est également présent chez les souches de *Streptococcus halichoeri*. La présence d'antigènes polysaccharidiques (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII et VIII) et d'antigènes protéiques (c, R et X) permet de définir des sérovars [47]. Parmi ces antigènes polysaccharidiques cités précédemment, cinq sérotypes (Ia, Ib, II, III et V) sont généralement détectés au cours des infections humaines; le sérotype III étant retrouvé dans 75% des infections néonatales avec atteinte méningée [42]. Ce sérotype confère une virulence particulièrement élevée à ces souches en raison de sa richesse en acide sialique. La virulence de ces bactéries est liée au pouvoir antiphagocytaire de la capsule polysaccharidique agissant par inhibition de l'activation du complément par la voie alterne (interférence avec la fixation du composant C3 sur les bactéries) [48].

3.4. Caractères génomiques

L'analyse du génome des souches séquencées de *S. agalactiae* a mis en évidence un génome mesurant environ 2, 220, 000 paires de bases (pb), constitué d'un «core-genome» représentant environ 80 % du génome, et d'un génome dispensable constitué de gènes partiellement communs ou spécifiques à la souche [49]. *S. agalactiae* a un contenu faible en bases guanine et cytosine (G + C), représentant environ 35,5 % de son génome.

4. Identification de *Streptococcus agalactiae*

L'identification de *S. agalactiae* repose sur les caractères morphologiques observés à l'examen direct, les caractères cultureux, les caractères antigéniques, et les caractères

biochimiques [50];

4.1. Examen direct des cocci à Gram positif à partir des prélèvements biologiques.

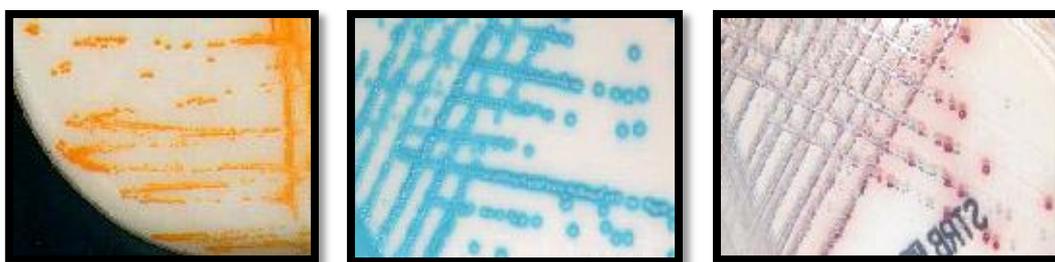
4.2. Recherche d'antigènes solubles à partir des prélèvements biologiques

Basée sur la détection d'antigènes du polysaccharide spécifique de *S. agalactiae* grâce à des antisérums monoclonaux, la mise en évidence directe des antigènes bactériens permet d'établir un diagnostic rapide. Différentes techniques ont été élaborées pour détecter les antigènes, telles que la technique immunoenzymatique [51], la contreimmunoélectrophorèse [52], ou l'agglutination utilisant des particules de latex sensibilisées.

4.3. L'isolement du germe

S. agalactiae est un germe anaérobie aéro-tolérant qui cultive sur des milieux enrichis par du sang défibriné de cheval ou de mouton. L'observation d'une β -hémolyse après incubation des milieux gélosés pendant 24 heures à 37° C oriente le diagnostic.

Des milieux de dépistage sélectif pour la détection de *S. agalactiae* facilitent sa détection dans des prélèvements plurimicrobiens [53-57]. Deux types de milieux ont été développés. Le milieu de type Granada qui utilise la propriété de *S. agalactiae* à synthétiser un pigment isoprénoïde orange induit par réduction du méthotrexate entrant dans la composition de la gélose. Le développement en 18 à 24 heures d'anaérobiose orangées est spécifique de *S. agalactiae*. Le second type de milieu correspond à un milieu chromogène, qui permet la détection spécifique d'enzyme en utilisant un substrat chromogène; exemple le milieu StrepB chromo-ID™ (bioMérieux) sur lequel les colonies de SGB apparaissent de couleur rose à rouge et le milieu StrepB Select™ (Bio-Rad) où elles sont bleu-turquoise (**Fig. 4**). Ces milieux présentent une sensibilité et spécificité équivalentes à la gélose au sang mais permettent une détection plus rapide et facile [57].



-A-

-B-

-C-

Figure 4: Milieux d'identification rapide de *S. agalactiae* [58].

(A) Isolement de SGB sur gélose Granada™ (bioMérieux), après 48 heures d'incubation en anaérobiose. (B) et (C) Isolement de SGB sur milieu Strep B Select™ (Bio-Rad) et Strep B chromo ID™ (bioMérieux), après 48 heures d'incubation en aérobie à 37 °C.

4.4. Caractérisation de *S. agalactiae*

- **Sérogroupage.** Basé sur l'identification du polysaccharide antigénique spécifique de l'espèce, le sérogroupage est réalisé par l'utilisation de « kits » d'agglutination : après extraction par traitement enzymatique (pronase, pepsine, ou trypsine), les antigènes de surface sont mis en contact avec des particules de latex recouvertes d'anticorps spécifiques.
- **CAMP-test.**
- **Identification biochimique.** L'identification présomptive de *S. agalactiae* peut être obtenue par le test de l'hydrolase de l'hypurate de sodium présent dans les galeries d'identification des streptocoques d'intérêt médical.

5. Ultrastructure bactérienne

S. agalactiae présente la structure cellulaire classique des bactéries à Gram positif: elle comprend un cytoplasme délimité par une membrane plasmique, une paroi et une capsule.

5.1. La paroi

La structure de la paroi cellulaire repose principalement sur la présence du peptidoglycane, associé à des polymères accessoires tels que les protéines de paroi, le polyside C, et les acides teichoïques.

➤ **Les protéines de paroi** peuvent être classées en deux familles principales: les protéines à motifs LPXTG, exposées à la surface, et les lipoprotéines non accessibles en surface et masquées par d'autres composants de l'enveloppe cellulaire [59].

***Les protéines de surface à motif LPXTG** comprennent;

Les protéines de la famille Alp dont l'expression est associée aux sérotypes et aux génotypes [14;59-61], la C5a-peptidase [62;63], la protéine CspA [64], la protéine Spb1, identifiée chez le clone hypervirulent RDP III-3 ou ST-17, et jouant un rôle dans l'internalisation cellulaire [65], la protéine BibA [66], les protéines Srr-1 et Srr-2 (serine-rich repeat proteins) [67], des pili [68-70] et la protéine FbsA [71].

***Les lipoprotéines** sont des protéines de paroi ancrées à la membrane cytoplasmique par des acides gras, comprenant; la protéine de liaison à la laminine Lmb (laminin binding protein) [59;72], des transporteurs de type ABC, des carboxypeptidases, des isomérases, des protéases et les protéines Blr [73] et LrrG [74]

➤ **Le polyside C** (ou antigène C) est l'antigène spécifique de *S. agalactiae* dans la classification de Lancefield. Ancré au niveau de l'acide N-acétylmuramique du peptidoglycane, il est constitué de quatre oligosaccharides différents (I, II, III, et IV),

composés d'unités répétitives de L-rhamnose, de D-galactose, de 2-acétamido-2-déoxy-D-glucose, et de D-glucitol [75].

- **Les acides teichoïques** sont des polymères de glycérol ou de ribitol reliés à des groupements phosphates, liés directement au peptidoglycane ou aux lipides de membrane.

5.2. La capsule

La capsule de *S. agalactiae* se compose principalement d'eau et d'un composé hétéropolysaccharidique, l'acide hyaluronique (Fig. 5). La capsule présente des structures antigéniques de type TSA, polymères de haut poids moléculaire constitués d'unités répétitives dont la composition variable permet de décrire dix sérotypes (Ia, Ib, II à IX). La structure comporte glucose, galactose, et acide N-acétylneuraminique (acide sialique) pour les neuf sérotypes, ainsi que le N-acétylglucosamine à l'exception des sérotypes VI et VIII. L'unité répétitive du sérotype VIII contient le rhamnose [76] (Fig. 5).

À l'exception du sérotype II pour lequel le sucre terminal est le galactose, l'acide sialique est en position terminale. L'acide sialique terminal est identique à un épitope sucré très largement réparti à la surface des cellules mammifères [77].

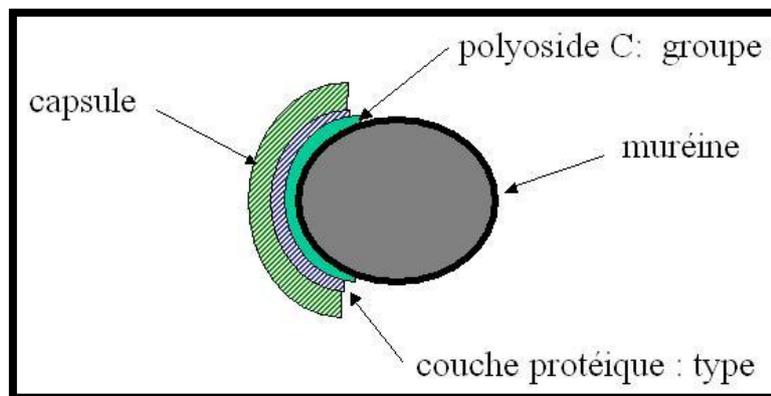


Figure 5: Structure des streptocoques [76].

5.3. Le cytoplasme et la membrane plasmique

Le cytoplasme comporte les molécules nécessaires à la machinerie moléculaire de la bactérie, soit l'acide nucléique et des enzymes telles que la superoxyde dismutase, la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) codée par le gène *gapC*, et qui module la réponse immunitaire de l'hôte en induisant la synthèse d'IL-10, cytokine immunosupresseur [78].

La membrane plasmique, à l'interface du cytoplasme et des structures externes de la cellule bactérienne, se compose de protéines (72 %), de lipides (26 %), et de polyosides (2 %) [79].

5.4. Les substances produites

Les souches de *S. agalactiae* excrètent près de 70 produits [80], dont certains sont impliqués dans la virulence tels qu'une hémolysine, un pigment caroténoïde, le facteur CAMP, une hippuricase, des protéases, collagénases, peptidases, et nucléases [81-83], les protéines FbsB liant le fibrinogène, la hyaluronate lyase, l'exotoxine CM101, et la protéine BibA.

6. Pouvoir pathogène

Initialement isolée de lésions mammaires de bovidés [84], cette bactérie infecte aussi bien l'homme que le bétail. Commensale de la flore génitale et digestive chez l'individu sain, c'est un *streptocoque pyogène* capable de donner des infections aiguës et invasives.

En pathologie humaine, il est impliqué dans les infections materno-foetales où, après contamination périnatale, il donne des septicémies, des pneumonies et des méningites néonatales.

Chez l'adulte, il provoque des infections variées telles que des infections urogénitales, des endocardites aiguës, des septicémies, des arthrites, des ostéomyélites, des infections des tissus mous, des méningites et plus rarement des endophtalmies, ou des pneumopathies.

6.1. Facteurs de pathogénicité

La pathogénie des infections associées à *S. agalactiae* est associée d'une part à un défaut des mécanismes immunitaires de défense de l'hôte, et d'autre part, à l'action de différents produits élaborés par la bactérie et des antigènes cellulaires [1]. Nombreux systèmes de signalisation et de régulation de la transcription sont codés dans le génome de *S. agalactiae* [49;80;85].

La physiopathologie des infections à *S. agalactiae* implique que cette bactérie puisse (i) adhérer à et/ou envahir différents types de cellules épithéliales (en particulier, les cellules vaginales, les cellules de la barrière foeto-placentaire et les cellules pulmonaires) et celles formant l'endothélium en particulier celui de la barrière hémato-méningée ; (ii) échapper à la réponse immunitaire de l'hôte à différents niveaux du processus infectieux ; (iii) s'adapter rapidement à des conditions environnementales différentes (pH, température...) [86]. Ainsi elles agressent l'hôte par la libération de substances nocives. Elles ont aussi besoin d'armes défensives pour échapper aux mécanismes de défense de l'hôte (phagocytes, compléments) [87].

En effet, *S. agalactiae* est doté d'un véritable arsenal de facteurs de virulence. Exprimés à la surface bactérienne ou sécrétés dans l'environnement proche de *S. agalactiae*, ils contribuent

à la virulence de la bactérie et lui confèrent une forte faculté d'adaptation à son environnement infectieux. Ils interviennent à chaque étape du processus pathologique, de l'adhésion à l'épithélium vaginal à l'invasion du système nerveux central du nouveau-né.

Les principaux facteurs de virulence et les systèmes impliqués dans leur régulation sont (Fig. 6); [1;50].

- **Les toxines porogènes: l'hémolysine/cytolysine β (β -H/C) ou CylE**, codé par le gène cylE [88].
- **Le pigment β -caroténoïde**

Le pigment caroténoïde, codé par le locus cyl, colore les colonies en orange et constitue une barrière physique de surface, permettant ainsi la survie de *S. agalactiae* au contact des molécules oxydantes des phagolysosomes au sein des macrophages [89]. De plus, des souches hyper pigmentées ont montré une plus grande virulence dans un modèle d'infection murin par rapport aux autres souches [89].

- **le facteur CAMP (Christie Atkins Munch Peterson)**

Les toxines facilitent l'entrée de *S. agalactiae* dans les cellules de l'hôte, la survie intracellulaire et la diffusion systémique [90;91].

6.2. Les facteurs favorisant l'échappement immunitaire

S. agalactiae code pour des facteurs qui empêchent sa reconnaissance par l'hôte ou offrent une résistance aux mécanismes de défense de l'hôte.

- **La capsule polysaccharidique riche en acide sialique** [92]
- **La superoxyde dismutase (La protéine SodA)** [93]
- **La C5a-peptidase** [94].
- **La sérine protéase (CspA)** [95].
- **La résistance aux peptides antimicrobiens de l'hôte.** Les peptides antimicrobiens cationiques sont des composants du système immunitaire jouant un rôle dans la lutte contre les infections bactériennes [96].

6.3. Facteurs favorisant adhésion et invasion de la surface cellulaire de l'hôte

L'adhésion de *S. agalactiae* aux surfaces des cellules de l'hôte est importante pour la colonisation de la muqueuse et l'invasion. *S. agalactiae* adhère et envahit les cellules épithéliales vaginales, les cellules épithéliales et endothéliales du poumon, et de la barrière hématoencéphalique (BHE). Ces interactions impliquent la consolidation initiale de *S. agalactiae* aux protéines de la matrice extracellulaire tels que le fibrinogène, la fibronectine,

et la laminine, facilitant alors les interactions avec les intégrines de la surface cellulaire de l'hôte et l'entrée dans la cellule [97].

- **Les protéines de liaison au fibrinogène (Fibrinogen-binding proteins) [71;98].**
- **La protéine de liaison à la laminine Lmb (Laminin-binding protein) [72].**
- **La protéine Rib.** La protéine Rib (Resistance to proteases, immunity, group B) est également une protéine de surface avec des séquences répétées. Elle est exprimée chez la majorité des souches de sérotype III mais aussi chez de nombreuses souches de sérotype II et quelques unes de sérotype V [99;100].
- **Les protéines répétées riche en sérine (Serine-rich repeat proteins)**

La protéine Srr (Serine-rich repeat) possède, à son extrémité N-terminale, un peptide signal de 50 acides aminés suivi d'une large région Srrs et, à son extrémité C-terminale, une séquence peptidique d'ancrage caractéristique des protéines de surface [67]. Deux variants de Srr ont été décrits. Ainsi, les souches de *S. agalactiae* de sérotype Ia, Ib, II, V et certaines de sérotype III expriment la protéine Srr1, alors que les souches de sérotype III qui appartiennent à la lignée "hyper-invasive" ST-17, expriment la protéine Srr2 [67;101].

- **L'adhésine bactérienne immunogénique**

L'adhésion de *S. agalactiae* aux cellules de l'hôte est facilitée par l'adhésine bactérienne immunogénique BibA située à la surface de *S. agalactiae* sous le contrôle du régulateur transcriptionnel covR/S [66].

- **La protéine α C**

La protéine C, également appelée antigène C, est une protéine de surface composée de deux antigènes, alpha et bêta, qui sont synthétisés indépendamment l'un de l'autre et exprimés chez la plupart des souches de sérotype Ia, Ib, et II, mais exceptionnellement chez les souches de sérotype III et rarement chez les souches de sérotype V [100;102].

- **Le gène associé à l'invasion** (invasion-associated gene; *iagA*), a été identifié comme le facteur de virulence le plus important pour la méningite à *S. agalactiae* car associé à un plus fort ancrage membranaire de l'acide lipotéichoïque [103].

6.4. Autres facteurs contribuant à la pathogénie de *S. agalactiae*

- **La hyaluronate lyase** codée par le gène hylB, la hyaluronate lyase est sécrétée en concentration plus importante chez les souches virulentes, notamment du sérotype III, que chez les souches de portage [104;105].

- **La toxine CM101.** L'étude des produits extracellulaires de souches de *S. agalaciae* de sérotype III isolées de méningites néo-natales a montré la production d'une exotoxine polysaccharidique de 200 kDa [106;107].
- **La Skizzle (SkzL),** protéine de séquence apparentée à celle de la streptokinase et la staphylokinase, se lie au plasminogène et à la plasmine [108].

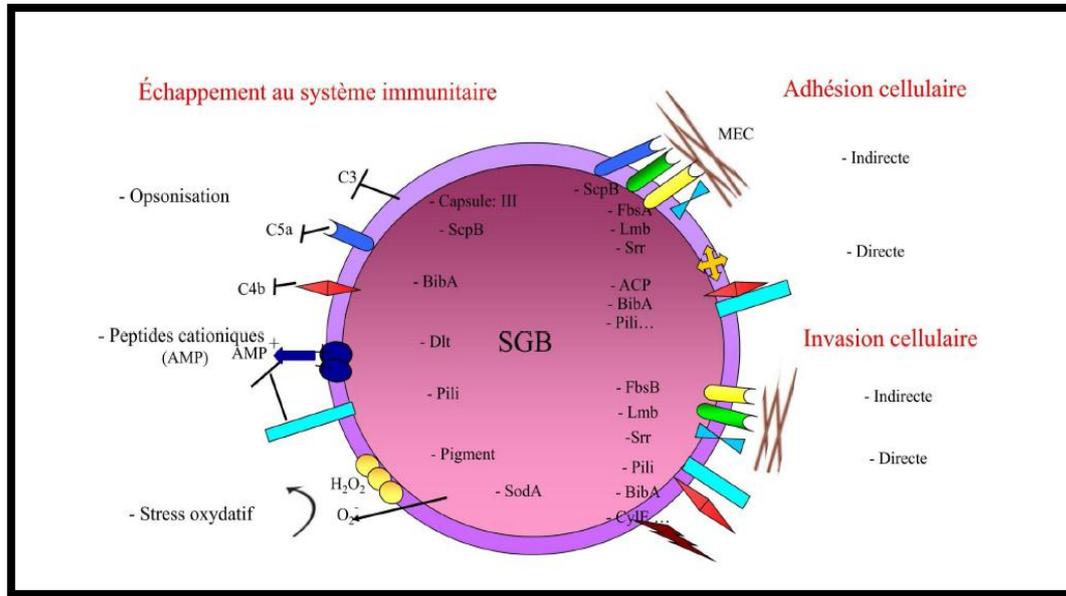


Figure 6: Facteurs de pathogénicité impliqués dans les infections à SGB [80].

7. Antibiotype

7.1. Résistance naturelle

Les streptocoques du groupe B sont naturellement résistants aux polymyxines, aux quinolones de première génération et à la bacitracine. Ils sont de plus, comme tous les streptocoques, résistants de bas niveau aux aminosides du fait d'une imperméabilité de leur paroi, mais ces derniers restent synergiques et bactéricides avec une pénicilline ou un glycopeptide.

7.2. Résistance acquise

➤ Les β -lactamines

Les SGB restent très sensibles aux β -lactamines et notamment à la pénicilline G et à l'amoxicilline qui sont les antibiotiques de choix pour le traitement des infections invasives et la prophylaxie perpartum. Néanmoins, dès 1994, des souches de SGB tolérantes à la pénicilline G ont été isolées et associées à des échecs thérapeutiques [109]. Récemment des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline ont été rapportées aux Etats-Unis, avec des

CMI (Concentration minimale inhibitrice) à la pénicilline à 0,12 mg/l [110]. De plus, au Japon, la première souche de SGB résistante à la pénicilline a été décrite [111]. Cette résistance aux β -lactamines n'est pas liée à un mécanisme enzymatique mais à des mutations par substitution au niveau d'acides aminés de la PLP2X de SGB, ce qui modifie l'affinité des protéines de liaison aux pénicillines et entraîne une résistance croisée à l'ensemble des molécules de cette famille [110;111].

En France, aucune souche de sensibilité diminuée aux β -lactamines n'a encore été isolée (CMI90 à 0,064 mg/l) [8]. En 2008, un travail de thèse non publié, portant sur l'étude de la sensibilité et de la tolérance aux β -lactamines de 111 souches de SGB responsables d'infections néonatales invasives entre 2006 et 2007, collectées sur l'ensemble du territoire français, n'a retrouvé aucune souche résistante ou de sensibilité diminuée à la pénicilline, l'amoxicilline, la cloxacilline ou le céfotaxime. Seulement, trois souches tolérantes ont été identifiées [58].

➤ **Les aminosides**

Outre la résistance naturelle des bactéries de la famille des Streptococcaceae aux aminosides, des souches de SGB ont été décrites avec un haut niveau de résistance à la kanamycine liée à la présence du gène *aph A3* [8]. Des résistances de haut niveau à la gentamicine ont exceptionnellement été rapportées (seulement deux souches), la première souche ayant été isolée en France en 1987 chez un patient souffrant d'une lésion surinfectée de la jambe [112].

➤ **Macrolides-Lincosammides-Synergestines (MLS)**

S. agalactiae est le plus souvent sensible à l'érythromycine, mais une augmentation de l'incidence de la résistance a été observée au cours de la dernière décennie [113;114]. La prévalence de la résistance aux macrolides en France est estimée à environ 17 % [115].

➤ **Mécanismes de résistance**

La résistance aux MLS est principalement liée à deux mécanismes. Le plus fréquent est une modification de la cible ribosomale par une méthylase codée par les gènes *erm(TR)* sous classe d'*ermA* et *ermB* (erythromycin resistance methylase), empêchant la fixation des macrolides sur le ribosome bactérien. Ce mécanisme est à l'origine d'une résistance croisée aux macrolides, lincosamides et streptogramine B (phénotype MLS_B). L'expression de ces gènes est constitutive ou inductible. Chez les streptocoques hémolytiques, le gène *ermB* est le plus souvent en cause [8;14;116].

Les souches porteuses du gène *ermB* s'expriment majoritairement par un phénotype MLS_B-constitutif alors que les souches possédant *ermA* s'expriment principalement un phénotype MLS_B-inductible [8]. Le deuxième mécanisme beaucoup plus rare est l'efflux, qui fait

intervenir une pompe. Le domaine transmembranaire de cette pompe est codé par les gènes *mefA/E*. Ce mécanisme est à l'origine d'une résistance isolée aux macrolides à 14 et 15 atomes carbone (phénotype M).

- **Le phénotype M:** est rendu érythromycine (E) résistant et clindamycine (CM) sensible sans image d'induction visible (antagonisme) entre E et CM.

- **Le phénotype MLS_B inducible (MLS_B-i):** est rendu E résistant et CM sensible avec une image d'induction entre E et CM

- **Le phénotype MLS_B constitutif (MLS_B-c):** est rendu E résistant, CM résistant sans image d'induction entre E et CM

➤ **Taux de résistance**

Aux Etats Unis, le taux de résistance à l'érythromycine n'a cessé d'augmenter depuis la mise en œuvre de la stratégie de prophylaxie perpartum. En effet, il est passé de 1,2 % pour la période de 1980 à 1993 à 18 % entre 1997 et 1998 dans une étude en Amérique du Nord [117]. L'étude de Phares sur des souches SGB isolées dans le cadre d'infections invasives de 1999 à 2005 rapporte des taux de résistance à 32 % et 15 % pour l'érythromycine et la clindamycine respectivement. Des taux allant jusqu'à 40 % ont été publiés dans d'autres pays [118;119]. De plus, la résistance à l'érythromycine est plus élevée parmi les sérotypes V (50% versus 26 %) [120].

En France, les données du centre national de référence (CNR) des SGB rapportent un taux de résistance à l'érythromycine de 13,8 % en 2008, pour des souches de SGB isolées chez des nourrissons atteints d'infections néonatales invasives. Chez nous aussi, il existe un lien entre sérotype V et résistance aux MLS; en 2006, selon les données du CNR, 46,9 % des souches résistantes à l'érythromycine étaient de sérotype V [8;121].

➤ **Tétracyclines**

➤ **Mécanismes de résistance**

Il existe deux mécanismes de résistance acquise à la tétracycline: la protection ribosomale (modification de cible), mécanisme de loin le plus fréquent chez les streptocoques, porté par les gènes *tetM* ou *tetO*, et le système d'efflux, codé par les gènes *tetK* et *tetL*, beaucoup plus rare

➤ **Taux de résistance**

Depuis les années 1970, une majorité des souches de SGB sont devenues résistantes à la tétracycline. Actuellement, le taux de résistance en France dépasse les 90% [8;122], ce qui corrobore les données internationales [116;123;124]. Cependant, la sensibilité du SGB

aux antibiotiques n'est pas suffisamment discriminante pour être utilisée comme un outil de diagnostic d'espèce .

8. Marqueurs épidémiologiques

Il existe deux types de marqueurs: les marqueurs phénotypiques, qui prennent en compte les caractères exprimés par la bactérie et les marqueurs génotypiques, qui sont basés sur l'analyse de l'ADN ou ARN bactérien.

8.1. Marqueurs phénotypiques

Les techniques de recherche de marqueurs phénotypiques sont en général faciles à mettre en œuvre. Parmi les techniques existantes:

8.1.1. La sérotypie

Basée sur la présence ou l'absence de déterminants antigéniques capsulaires, c'est la première méthode de typage des streptocoques bêta-hémolytiques, proposée par R. Lancefield en 1934. Cette méthode est basée sur la recherche de précipitines à l'aide de sérum de lapins immunisés pour un type capsulaire. Les méthodes décrites ensuite ont cherché à simplifier la technique de sérotypage et à diminuer la quantité nécessaire d'antisérum spécifique. Des techniques d'immunoélectrophorèse [125], d'immunodiffusion [125], de co-agglutination [126] et immunoenzymatique [127] ont été utilisées pour définir le sérotype de *S. agalactiae*. Toutefois certaines souches ne sont pas typées par ces techniques. La quasi-totalité des souches de *S. agalactiae* retrouvées chez l'homme sont capsulées. Sur la base des antigènes capsulaires, dix sérotypes sont actuellement décrits: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII et récemment IX [128-131].

En 2003, Slotved *et al.* proposent une technique basée sur l'agglutination de particules de latex sensibilisées avec des anticorps spécifiques de 9 sérotypes (sérotypes Ia à VIII) [132]. La proportion de souches non typables diminue mais 12.5% des souches restent non sérotypées. Plusieurs hypothèses concernant les souches non typables par les techniques phénotypiques sont émises [133]: (i) la souche est dans une phase réversible, non capsulée ; (ii) la souche produit un polysaccharide pour lequel aucun anticorps spécifique n'est disponible (nouveau sérotype); (iii) la souche possède une mutation ou une insertion dans un gène essentiel à l'expression de la capsule.

Cinq sérotypes (Ia, Ib, II, III et V) sont responsables de la plupart des infections humaines. L'identification des protéines antigéniques de surface C et R permet d'affiner le sérotypage des souches de *S. agalactiae*.

8.1.2. La lysotypie

La lysotypie caractérise les isolats selon leur sensibilité ou leur résistance à la lyse par différents bactériophages. Un système de typage utilisant 24 phages a été évalué en 1980 pour caractériser des souches de *S. agalactiae* [134]. Combinée à la sérotypie, la lysotypie était un outil épidémiologique d'importance dans les années 80 [135].

8.1.3. Electrophorèse des isoenzymes métaboliques

Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE). L'électrophorèse des isoenzymes métaboliques (MLEE) permet de caractériser des différences de mobilité électrophorétique d'enzymes métaboliques. Ces variations reflètent les substitutions d'acides aminés et par conséquent les variations nucléotidiques des gènes codant l'enzyme. Ainsi, le MLEE fut la première méthode phénotypique capable de refléter fidèlement des variants alléliques spécifiques de loci génomiques [136]. Cette méthode fournit des informations sur les distances génétiques entre les isolats testés et permet l'étude de la structure des populations bactériennes [137].

L'inconvénient majeur de cette technique reste sa lourdeur de réalisation.

8.2. Marqueurs génotypiques

Les techniques phénotypiques présentant des inconvénients liés à leur capacité à typer les souches (sérotypie), à leur pouvoir discriminant (lysotypie) ou à leur difficulté de réalisation (MLEE), des méthodes reposant sur l'ADN ont été développées. Ainsi, l'étude de marqueurs moléculaires a souvent permis une discrimination des souches non différenciables par les méthodes phénotypiques [1].

8.2.1. Sérotypage moléculaire

Le polysaccharide capsulaire possède une structure et une composition différentes en fonction du sérotype, dues à la variabilité des gènes du locus *cps* (Capsular Polysaccharide Synthesis). Ces gènes codent pour les enzymes nécessaires à la synthèse de la capsule polysaccharidique. Cette région contient des gènes conservés d'un sérotype à l'autre, et d'autres très variables; de plus, tous les sérotypes ne possèdent pas tous les gènes du locus *cps* [138]. Les gènes *cpsA* à *cpsE*, *cpsL*, *neuB*, *neuC*, *neuD* et *neuA* (représentés en blanc sur la **Figure 7**) sont conservés pour tous les types capsulaires alors que les gènes présents dans la région située entre les gènes *cpsG* et *cpsK* sont différents pour chaque sérotype connu. La méthode de sérotypage moléculaire analyse les gènes de cette région [1].

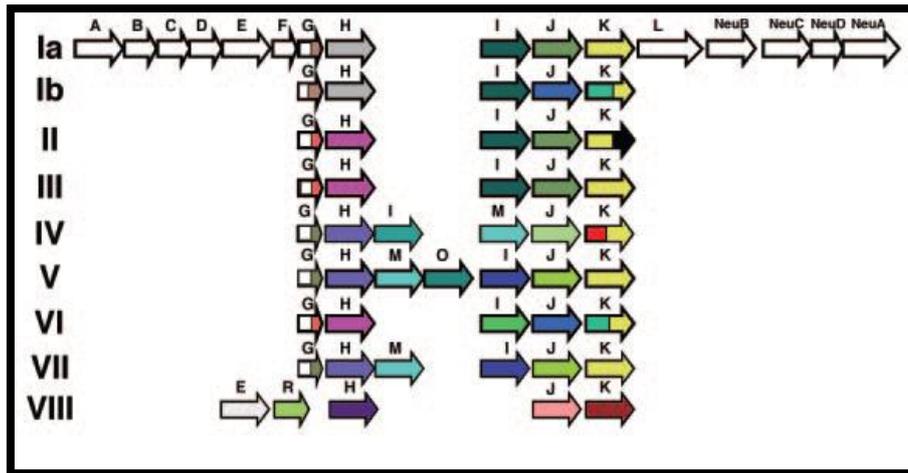


Figure 7: Séquences d'ADN de la région *cps* [76]

Il existe plusieurs techniques de sérotypage moléculaire décrites par différents auteurs:

- Kong *et al.*, ont décrit initialement une méthode utilisant une PCR multiplex ciblant partiellement les gènes de capsule du streptocoque du groupe B, associée au séquençage [139]. Une technique de révélation plus simple par hybridation avec des sondes biotinylées a été ensuite mise au point [140;141].
- Manning *et al.*, [142] ont proposé une technique avec une PCR ciblant les gènes de synthèse de la capsule polysaccharidique suivie d'une digestion par des enzymes de restriction à nombre de sites de coupure élevé (RFLP) et révélée par une électrophorèse simple.
- Les techniques proposées par Poyart *et al.*, [143] et Imperi *et al.*, [16] reposent sur une PCR multiplex suivie d'une électrophorèse. Dans toutes ces techniques, la taille des différents fragments obtenus permet de déterminer le sérotype moléculaire.

➤ **Prévalence des sérotypes**

Les souches de sérotypes Ia, III, V sont responsables de la plupart des infections néonatales précoces (entre 76 et 92% selon les études) [120;122;144]. Néanmoins, la proportion relative de chaque sérotype varie selon les pays. Le sérotype III est le plus fréquemment retrouvé en Europe (60%), suivi du sérotype Ia (17 à 28%). Aux Etats-Unis, le sérotype Ia prédomine (30%) et le sérotype III est responsable de 28% des infections néonatales précoces [120]. Le sérotype V est moins souvent retrouvé en Europe (2.6 à 9%) qu'aux Etats-Unis (18%). Les infections néonatales tardives sont majoritairement causées par des souches de sérotype III (entre 51 et 82% selon les études) [120;122;144]. Dans une étude américaine portant sur des souches isolées chez des adultes et des enfants de plus de 3 mois, les sérotypes V (31%) et Ia (24%) prédominent [120]. La distribution des sérotypes varie selon le tableau clinique : tout

âge confondu, le sérotype III est plus souvent associé aux méningites. Par ailleurs, des infections graves, avec un risque de décès accru sont associées au sérotype Ia [120].

Chez la femme enceinte, les sérotypes Ia, III et V sont également les plus fréquemment retrouvés au niveau vaginal [145]. Cependant il faut noter que les sérotypes VI et VIII, quasi absents en Europe et aux Etats-Unis sont fréquemment retrouvés au Japon [146]. Chez les femmes enceintes colonisées à *S. agalactiae*, le sérotype VIII prédomine (35.6%) suivi du sérotype VI (24.6%). Ces sérotypes sont également responsables d'infections néonatales précoces (11.1 et 9.1% respectivement).

Des variations dans la distribution des sérotypes sont également observées au cours du temps. Ainsi, le sérotype V, initialement décrit en 1985, a émergé au cours des années 1990 [147]. Dans une étude américaine chez l'adulte, le sérotype V prédomine [3]. Dans cette étude, une émergence du sérotype IV entre 1998 (0.2%) et 2006 (5.7%) est également soulignée.

8.2.2. Amplification-séquençage pour l'étude du polymorphisme multilocus: Multi-Locus Sequence Typing (MLST)

Le MLST a été proposé pour la première fois en 1998 pour caractériser les souches de *Neisseria meningitidis* [148]. Aujourd'hui le MLST est la méthode de référence pour étudier la diversité génétique des populations bactériennes, y compris le streptocoque du groupe B [19].

Le principe repose sur l'amplification et le séquençage de sept gènes dits « de ménage ». Approximativement 400 à 500 pb de chaque gène vont être séquencés (après avoir été amplifiés par PCR). Pour chaque gène, les séquences obtenues vont être comparées aux bases de données MLST (<http://sagalactiae.mlst.net/>) et des numéros d'allèles sont assignés à chaque séquence unique. Pour un gène donné, deux souches qui ont la même séquence nucléotidique portent le même numéro d'allèle et les séquences différant même d'un seul nucléotide sont considérées comme des allèles distincts. Chaque souche est définie par la combinaison de numéros correspondant aux allèles des loci étudiés, ce qui définit un profil allélique ou « séquence type » (ST) [148].

Cette méthode a été utilisée pour typer les souches et étudier la structure de la population d'un certain nombre de pathogènes bactériens humains. Cette technique est particulièrement adaptée pour les études épidémiologiques, car elle fournit des données qui peuvent facilement être comparées entre elles et permettent de construire des arbres phylogénétiques. Les données de séquences d'ADN obtenues avec MLST sont stockées dans une base de données

sur Internet. Cette méthode est suffisamment discriminatoire pour les études épidémiologiques et fournit un moyen précis de caractérisation des isolats [19].

Pour *S. agalactiae*, le MLST, qui a été créé en 2003 [19], est en passe de devenir la méthode de référence. La base de données (<http://pubmlst.org/sagalactiae/>) regroupe à ce jour plus de 710 STs et constitue une ressource importante pour l'épidémiologie mondiale de *S. agalactiae* [19]. Certains ST sont regroupés en clusters, aussi appelés Complexes Clonaux (CC). L'identification des CC se fait par le programme eBURST v3 (<http://eburst.mlst.net/>) qui permet de définir un ancêtre hypothétique commun au sein du complexe, appelé le ST fondateur. Les ST assignés à un même CC possèdent au moins cinq allèles en commun sur les sept loci étudiés [149]. Les STs qui ne sont affiliés à aucun CC sont appelés singletons.

*La structure génétique de *S. agalactiae* a été étudiée par MLST dans de nombreux pays comme l'Amérique du Nord (Etats-Unis et Canada) [61;150-153], le Royaume-Uni [19;154], la France [122;155;156], la Suède [157], le Portugal [158], le Sénégal et la République Centre-Africaine [159]. Cinq CC majeurs (CC1, CC10, CC17, CC19 et CC23) ont ainsi été identifiés à travers le monde et représentent plus de la moitié des souches isolées chez l'homme. Les cinq complexes clonaux CC1, CC8, CC17, CC19, et CC23 (ou clones) regroupent plus de 80 % de la population selon les études [19;150;153;154;157;159-164].

Une certaine congruence entre la répartition des sérotypes et les lignées MLST a été observée. De fait, le sérotype Ia est souvent retrouvé associé au complexe CC23, le sérotype Ib au complexe CC10, le sérotype V au complexe CC1, les sérotypes II et majoritairement III aux complexes CC17 et CC19 [150;152;163;165].

Le CC17 est considéré comme clone "hyper-invasif", puisque les souches appartenant à ce complexe clonal et au sérotype III sont fortement représentées parmi celles isolées d'infections néonatales invasives [19;122;150;153;157].

Des études récentes ont montré que ces souches sont associées significativement aux infections néonatales tardives [122;153] et aux méningites [153]. Par ailleurs, Manning *et al.*, ont montré que les souches appartenant au complexe clonal CC17 sont plus difficilement éliminées de l'organisme après antibioprofylaxie.[152]. Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi ces souches sont particulièrement retrouvées dans les infections tardives du nouveau-né [152;153]. Contrairement au CC17, le potentiel infectieux des CC1, CC19 et CC23 ne fait pas consensus : certaines études les relient au portage asymptomatique [19;156], alors que d'autres travaux les rattachent aux infections néonatales précoces pour CC19 [153]

et CC23 [166] et aux infections de l'adulte (cutanées et ostéo-articulaires) pour CC1 et CC23 [165].

En résumé

La distribution des STs varie en fonction de l'origine clinique des souches (Fig. 8);

- Les souches isolées d'infections néonatales sont majoritairement de ST17, et plus rarement ST19, ST1, ou ST23. CC17 est le clone le plus impliqué dans des infections néonatales tardives, alors que CC1 et CC23 sont les clones majeurs dans les infections néonatales précoces [150;160].
- Les souches isolées de colonisation maternelle sont majoritairement de ST1, ST19, ou ST23.
- Les souches isolées de colonisation néonatale sont majoritairement de CC23, CC19, ou CC1 respectivement.
- Les souches isolées d'infections chez l'adulte en dehors de la grossesse sont majoritairement de ST19, ST1, ou ST23 et de CC1, CC8, ou CC19 respectivement.
- Les souches isolées de colonisation chez l'adulte en dehors de la grossesse sont majoritairement de ST19, ST1, ou ST17.

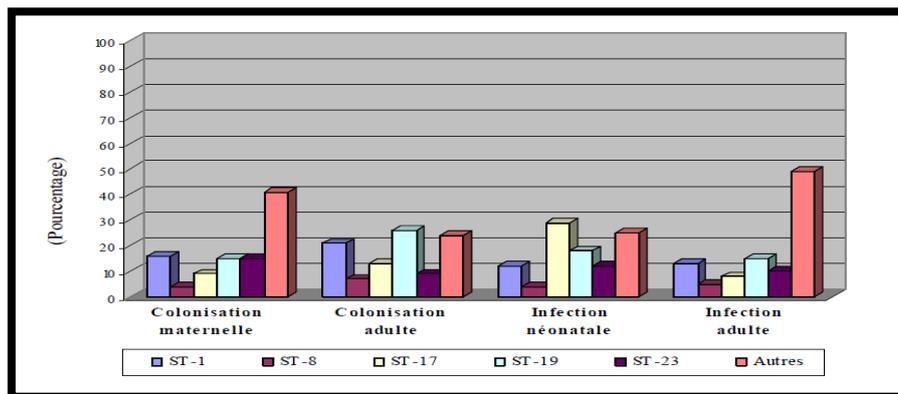


Figure 8: Distribution des principaux STs selon l'origine clinique des souches [50].

8.2.3. Profils de restriction de l'ADN génomique total: Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Cette technique analyse les variations de profils de digestion enzymatique du génome entier des différentes souches. Appliqué à *S. agalactiae*, le RFLP a permis d'identifier deux lignées responsables de la majorité des infections néonatales précoces au Japon, appelées RDP Ia-3 et RDP III-3 (RDP pour Restriction Digest Pattern). Ces deux RDP représentent des lignées phylogénétiquement séparées au sein des sérotypes Ia et III [167]. L'analyse des profils de restriction obtenus par les endonucléases HindIII et Sse83871 a permis de classer les souches

de *S. agalactiae* de sérotype III en trois RDP : RDP III-1, RDP III-2 et RDPIII [168]. La majorité des isolats obtenus de LCR de nouveau-nés sont de type RDP III-3, lui-même subdivisé en deux sous-types, RDPIII-3a et RDP III- 3b [168].

8.2.4. Amplification aléatoire de différentes parties du génome: Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

Le RAPD est une technique qui repose sur l'amplification aléatoire d'ADN en utilisant des amorces de courtes séquences nucléotidiques (de 10 à 15 nt) dans des conditions peu spécifiques d'hybridation. Cette technique ne nécessite pas une connaissance préalable du génome [169]. Appliqué à *S. agalactiae*, le RAPD a confirmé l'existence des trois groupes à plus haut risque infectieux pour le nouveau-né correspondant à la division MLEEI et les 2 ET (11 et 12) de la division MLEEI précédemment définis par MLEE en France [170;171].

8.2.5. Electrophorèse en champ pulsé: Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Cette méthode utilise des enzymes de restriction coupant l'ADN génomique avec une fréquence peu élevée, ce qui génère des fragments de grande taille. Ils sont séparés sous certaines conditions d'électrophorèse où la polarité du courant est modifiée à intervalles réguliers [172]. Cette méthode, qui présente un grand pouvoir discriminant, est particulièrement adaptée aux études d'épidémiologie locale telles que l'investigation des infections nosocomiales. Souvent utilisé pour le typage de *S. agalactiae*, le PFGE a permis d'expliquer des phénomènes localisés, comme l'émergence clonale du sérotype V aux Etats-Unis [173], et de mettre en évidence la diversité génétique des isolats circulant dans un pays ou provenant de sites anatomiques particuliers [145;160;174-176].

9. La spectrométrie de masse MALDI-TOF MS (Nouvel outil de marquage épidémiologique)

9.1. Introduction

La spectrométrie de masse MALDI-TOF (MALDI = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation- TOF = Time-Of-Flight) permet l'identification des bactéries par analyse de leurs protéines totales (protéines ribosomales et protéines associées aux membranes). La qualité de l'identification est fonction de la richesse de la banque de spectres enregistrés. Outre l'identification des micro-organismes, il est possible de réaliser du génotypage de polymorphismes ponctuels (SNPs). La spectrométrie de masse devient une alternative au séquençage standard des gènes 16S rDNA [177-179].

La spectrométrie de masse consiste à séparer et identifier des molécules selon leur masse et leur charge [180]. Les applications de la spectrométrie de masse sont nombreuses et touchent divers domaines: en biotechnologies pour l'analyse des peptides ou oligonucléotides, en pharmacologie pour le dosage de médicaments, dans le domaine de l'environnement pour l'analyse de l'eau, en clinique pour la recherche de drogues [181], etc.

Il existe plusieurs types de spectromètres de masse pouvant séparer des molécules plus ou moins grandes et leurs méthodes ont toutes en commun les étapes suivantes [177;182]:

- Préparation et introduction de l'échantillon
- Ionisation des molécules d'intérêt
- Séparation des ions en fonction de leur rapport masse/charge
- Détection et amplification du signal
- Analyse des données et identification de l'échantillon

Parmi les autres méthodes proposées, la spectrométrie de masse permet l'identification et le typage des micro-organismes (bactéries, virus, champignons) à partir des colonies ou des prélèvements, couplée ou non à une amplification génique [177].

9.2. Historique

Les premiers spectromètres de masse datent du début du 20ème siècle et ont servi en physique à rechercher les différents isotopes d'un élément chimique. C'est Francis William Aston qui conçut le premier spectromètre de masse en 1922. Il réussit à démontrer l'existence des isotopes en les séparant selon leur masse et leur charge [177].

9.3. Principe de fonctionnement

Le spectromètre de masse MALDI-TOF est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF = Time-Of-Flight) [177]. La séparation des molécules par cette technique est plus douce qu'avec les autres méthodes. Elle permet d'ioniser des molécules de grande taille, peu volatiles et sensibles à la chaleur sans les dégrader [180;183]. La méthode MALDI-TOF s'applique aux biomolécules plus fragiles comme les peptides, les protéines, les glycoprotéines et les oligonucléotides [181].

Un spectromètre de masse se compose principalement de trois parties: la chambre d'ionisation produisant des ions en phase gazeuse, l'analyseur séparant les ions selon le rapport masse sur

charge (m/z), le détecteur transformant le courant ionique en courant électrique. Le courant généré est amplifié, numérisé et enregistré [184].

L'ionisation des molécules est l'étape la plus importante pour l'identification des molécules (Fig. 13). Avec la technique de désorption laser assistée par la matrice d'inclusion de l'échantillon (MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), le produit à identifier est inclus dans une matrice (3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamic acid [sinapinic acid] ; α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid, par exemple), et immobilisé sous forme de cristaux sur un support inerte (plaque d'acier, par exemple). Le complexe produit-matrice est bombardé par un faisceau laser émettant dans la zone d'absorption de la matrice. Les ions générés dans la chambre d'ionisation sont accélérés dans un champ électrique qui les dirige vers l'analyseur [177].

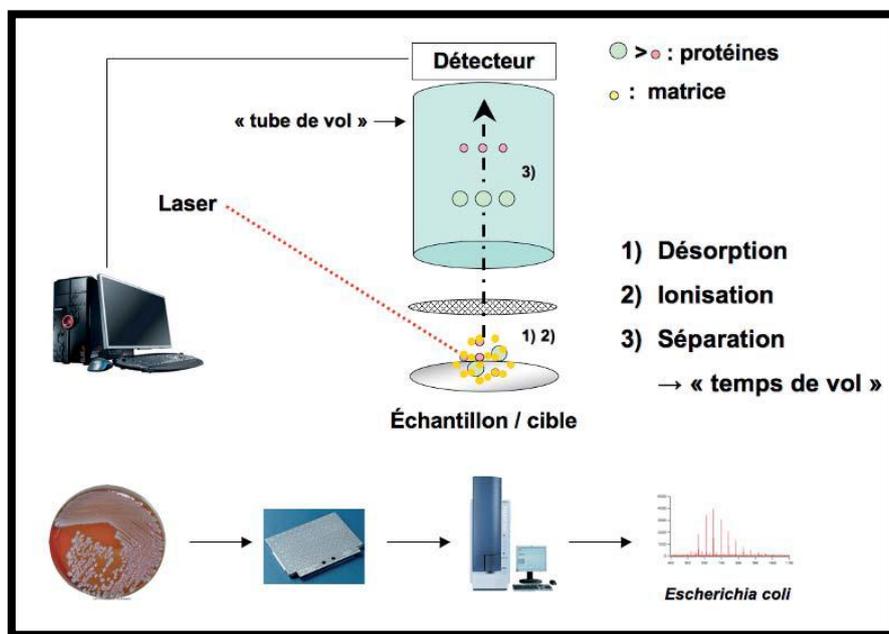


Figure 13: Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF [185].

L'analyseur permet de séparer et de classer les ions accélérés selon leur temps de vol libre (TOF : Time-Of-Flight). Selon le rapport m/z , les molécules les plus petites sont les premières à arriver au détecteur. Les molécules qui ont le même rapport m/z sont séparées grâce à un miroir électrostatique. Le détecteur transforme les ions reçus en courant électrique qui est amplifié et numérisé (Fig. 14).

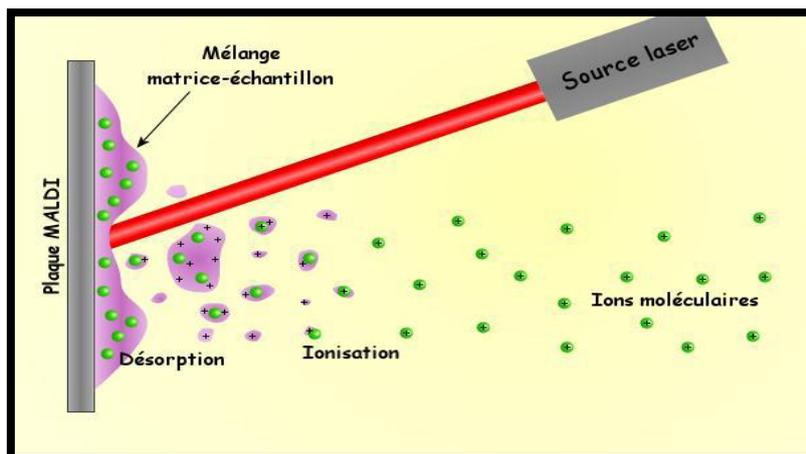


Figure 14: Principe d'ionisation par la technique MALDI [177].

L'analyte (en vert) est cristallisé dans la matrice (en violet).

9.4. Banque de spectres

Les données enregistrées sont calculées afin de transposer les résultats dans un spectre où chaque pic correspond à un type de molécule. L'axe des ordonnées représente **l'intensité relative du signal** et l'axe des abscisses indique **la taille de la molécule** en Daltons (**Fig. 15**). L'appareil intègre les différents pics enregistrés et recherche dans la base de données l'identification du germe correspondant.

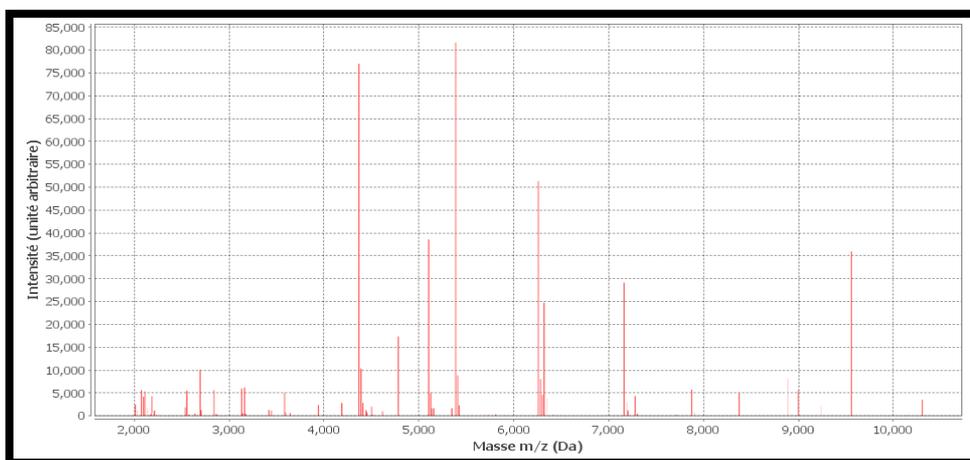


Figure 15: Spectre MALDI-TOF [177].

L'identification d'un spectre inconnu est réalisée à l'aide d'un algorithme de reconnaissance qui considère les positions des pics dont l'intensité est comprise dans une échelle de 1 à 1000. Le logiciel associé au spectromètre génère automatiquement les listes de pics à partir de tous les spectres typiques qui sont enregistrés dans une banque de données. Un score

d'appariement ou de vraisemblance classe les spectres et précise la ou les identifications bactériennes les plus plausibles.

À partir des spectres obtenus, il est possible de construire **un dendrogramme** fondé sur les scores de similarités. Le spectre de masse est susceptible de **variations**. La nature du milieu de culture, la durée d'incubation des cultures peuvent influencer sur la qualité du spectre obtenu. Par exemple, les colonies doivent être récentes pour ne pas avoir de dégradation des protéines ribosomales et des protéines associées aux membranes. Ces protéines, de masse moléculaire relativement faible, sont les mieux conservées et offrent une typicité d'espèce.

9.5. Utilisations de la spectrométrie de masse

➤ **Typage bactérien**

Quelques études ont montré l'utilité du **typage des micro-organismes** par MALDI-TOF-MS par comparaison avec la méthode de référence, le champ pulsé. Pour *Listeria monocytogenes*, il a été montré une parfaite concordance entre le typage par champs pulsé et les données de la spectrométrie de masse [186].

Pour le **typage des bactéries** d'une même espèce [187], un dendrogramme peut être établi à partir de scores de similarité. Une analyse à variation multiple fondée sur l'analyse des composants principaux est possible. Pour l'identification, l'analyse et la classification des spectres peuvent être établies selon (a) le « main spectra projection » ou banque de référence (MSP), (b) l'analyse en composante principale (PCA), (c) l'indice de corrélation des composants (CCI) (analyse statistique des relations entre les spectres *i.e.* paramètres de distance entre les spectres) [187].

➤ **Identification des clones**

Avec la spectrométrie de masse, il est ainsi possible de mieux **identifier les clones pathogènes** en mettant en évidence la variation nucléotidique et en déterminant la séquence probable à partir d'amplicons [188].

➤ **Génotypage**

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF permet de **détecter les produits d'amplification génique**. L'identification de fragments de 40 à 168 bases est possible à la condition de désaler les amplicons des résidus non amplifiés. Des applications ont été publiées pour certains micro-organismes (*Legionella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Sulfolobus acidocaldarius*, bactéries méthanogènes, par exemple) que les amplicons soient de type ARN

ou ADN, simple ou double brins. La détection et le génotypage des gènes de résistance aux antibiotiques (β -lactamases, mycobactéries) sont également possibles [189].

➤ **Autres utilisations**

Les approches post-génomiques commencent à trouver des applications en microbiologie médicale. Ainsi, l'**analyse métabolomique** met en évidence les métabolites d'intérêt biologique à partir d'analyses statistiques multivariées réalisées sur un très grand nombre de signaux qualitatifs ou quantitatifs, de visualiser les réponses métaboliques des micro-organismes face à des phénomènes de toxicité [190].

La spectrométrie de masse est employée en contrôle-qualité pour la détermination de la pureté et de l'homogénéité d'une protéine. Dans le domaine de la **protéomique**, elle permet de réaliser des études structurales pour la vérification fine d'une séquence, la localisation de certains motifs, les études de changements de conformation, de repliement, la caractérisation de complexes covalents ou non et de leurs zones d'interaction.

- **Depistage neonatal des maladies hereditaires du metabolisme**

Depuis la fin des années 1990, la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est apparue dans les services de biologie spécialisée et les performances de cet outil en terme de rapidité d'analyse, de spécificité et de polyvalence l'ont rapidement rendu indispensable. Dans le domaine des maladies héréditaires du métabolisme (MHM), il est actuellement possible d'utiliser la MS/MS pour le dépistage néonatal systématique de plus d'un cinquantaine de pathologies génétiques rares dont la plupart peuvent bénéficier d'un traitement ou d'une prise en charge adaptée [177;191].

- **Identification hémocultures positives [192;193]**
- **Identification pathogènes urinaires [194]**
- **Identification cultures mixtes ? [195;196]**
- **Détection de phénotypes de virulence ou d'antibiorésistance [197-199]**
- **Détection PVL (Panton-Valentine leukocidin) chez *S. aureus* [200]**
- **Détection MRSA [201-203]**
- **Biotyping, génotyping, la nouvelle caractérisation des espèces et la détection de certains mécanismes de résistance. [21-23].**

Chapitre II: Le portage de *Streptococcus agalactiae*

1. *Streptococcus agalactiae* et la période périnatale

1.2. Colonisation

L'infection néonatale survient avec des germes non pathogènes pour la femme enceinte, dont le portage vaginal n'est pas synonyme d'infection mais de colonisation maternelle [38]. *S. agalactiae* est un germe commensal des voies gastro-intestinales et génito-urinaires chez la femme enceinte. Le taux de colonisation maternelle varie de 1,6 % à 36 % selon les études [204;205].

La colonisation vaginale à par cette bactérie peut être transitoire, intermittente ou persistante [206]: Seules 30 à 40 % des femmes colonisées en début de grossesse le sont encore à l'accouchement [207]. Le statut d'une femme enceinte vis-à-vis du streptocoque du groupe B peut changer au cours de la grossesse. La colonisation en début de grossesse n'est donc pas prédictive de la colonisation à streptocoque du groupe B en fin de grossesse [208].

La bactériurie à streptocoque du groupe B chez une femme enceinte est un marqueur de colonisation et a été associée à un risque accru d'infection néonatale précoce à streptocoque du groupe B quel que soit le trimestre. Le streptocoque du groupe B est retrouvé dans les urines de 2% à 7% des femmes enceintes [208;209]. Des études ont montré que certaines femmes présentant une bactériurie à streptocoque du groupe B au cours du premier trimestre pouvait avoir un dépistage recto-vaginal négatif à 35-37 SA ou au moment de l'accouchement [209] et que malgré l'administration d'antibiotique pour traiter la bactériurie au cours de la grossesse, le streptocoque du groupe B n'est pas complètement éliminé des voies génito-urinaires et gastro-intestinales et la recolonisation est fréquente.

1.3. Transmission

Chez les nouveau-nés, deux sources de contamination ont été démontrées: la transmission **verticale** lors de l'accouchement, et la transmission **horizontale** après la naissance.

À la naissance, 50 à 65 % des nouveau-nés dont les mères sont colonisées par *S. agalactiae* présentent des cultures positives pour ce germe au niveau des muqueuses et de la peau (conduit auditif externe, gorge, ombilic, et site ano-rectal) [210;211]. Environ 98 % des nouveau-nés colonisés restent asymptomatiques, mais 1 à 2 % d'entre eux développent une infection invasive à *S. agalactiae* [212].

La transmission verticale de la mère au fœtus ou au nouveau-né peut se faire via plusieurs voies [38;208;213]: la contamination par passage à travers la filière génitale au cours de

l'accouchement est la voie la plus fréquente. **La voie hématogène trans-placentaire** au décours d'une infection maternelle (bactériémie, endométrite, pyélonéphrite aiguë) et **la voie ascendante**, où une bactérie présente dans le vagin pendant la grossesse remonte vers l'utérus jusqu'à la cavité amniotique à travers les membranes intactes ou rompues, (**Fig. 9 et 10**) peuvent conduire à des infections intra-utérines (chorioamniotites), pouvant causer le décès du fœtus ou une infection à un stade avancé chez le nouveau-né.

La transmission horizontale du nouveau-né après la naissance, à partir de la mère (manuportage maternel, ou transmission par le lait) [214;215], ou à partir d'autres nouveau-nés par l'intermédiaire du personnel soignant [216;217] concerne entre 1,2 et 41% des nouveau-nés colonisés.

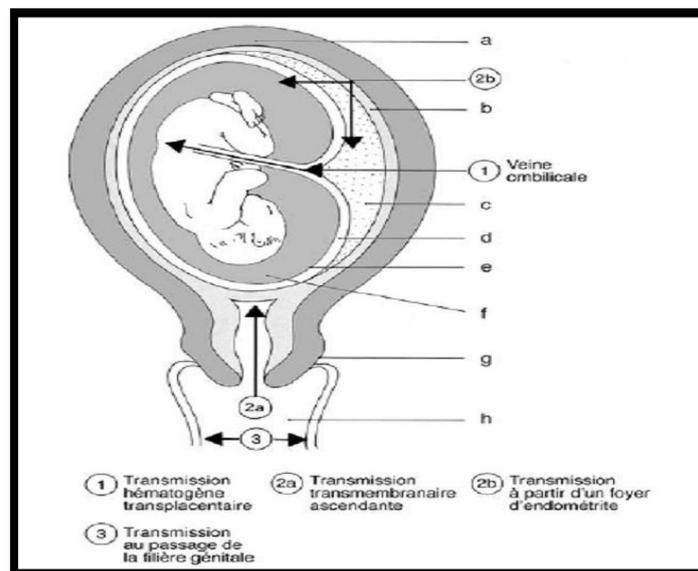


Figure 9: Modes de contamination materno-foetale [218].

- a. Muscle utérin d. Chorion g. Col utérin
- b. Muqueuse utérine e. Amnios h. Vagin.
- c. Placenta f. Liquide amniotique

La transmission verticale entre la mère et le nouveau-né se produit dans 30 à 70% des cas, soit [219] l'absence de toute intervention, on estime que 1% à 2% des nourrissons colonisés vont développer une infection précoce à streptocoque du groupe B [208].

Par ailleurs, chez 5,6% des nouveau-nés colonisés, le streptocoque du groupe B n'a pas été retrouvé dans les prélèvements vaginaux de la mère pendant la grossesse [220].

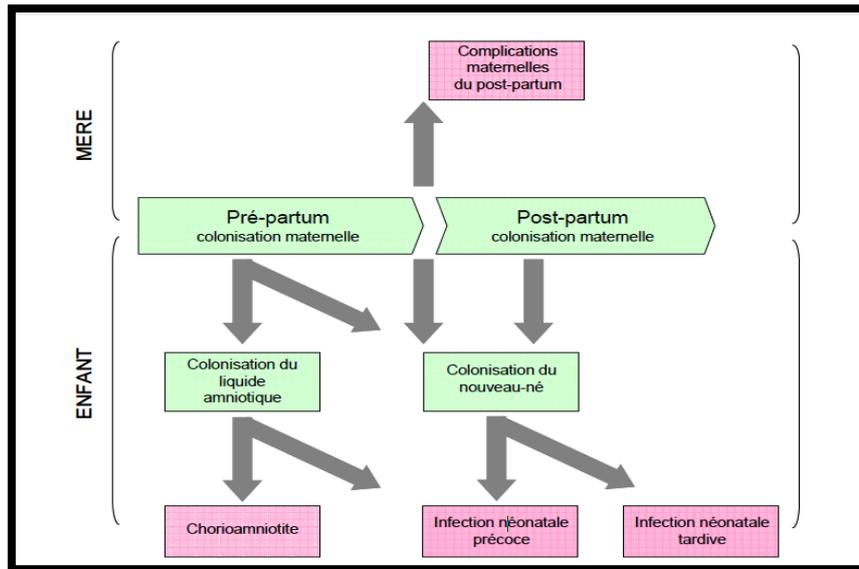


Figure 10: Schéma représentant les différentes entités des infections materno-foetales et leur transmission [218].

1.4. Incidence des infections materno-foetales

Streptococcus agalactiae est rapporté comme agent pathogène chez l'homme pour la première fois en 1938, avec trois cas d'infections fatales chez des femmes en *post-partum* [221].

Depuis les années 70s, *S. agalactiae* est devenu un agent pathogène important pour la période périnatale aux États-Unis et en Europe avec un taux de mortalité élevé [222]. Les infections périnatales à *S. agalactiae* concernent à la fois les nouveau-nés et les femmes enceintes.

1.5. Les infections chez le nouveau-né

Le streptocoque B représente la première cause d'infection bactérienne néonatale sévère. Dès 1973, Franciosi définit deux formes distinctes d'infections néonatales à SGB : le syndrome précoce et le syndrome tardif (**Tab. 1**).

1.5.1. La forme précoce

Survenant durant les sept premiers jours de vie du nouveau-né, principalement au cours des 24 premières heures de vie [223;224], cette forme représente 80 à 85 % de l'ensemble des infections néonatales [225], et correspond essentiellement à des infections respiratoires (54 %), des septicémies sans source identifiée (27 %), et des méningites (15 %) [224]. Cette infection résulte généralement d'une transmission verticale *in utero* à partir du tractus génital maternel ou lors du passage de la filière génitale au cours de l'accouchement [226]. La mortalité peut représenter jusqu'à 55 % des nouveau-nés infectés, et concerne plus

particulièrement les nouveau-nés prématurés ou de faible poids pour lesquels le taux de mortalité est estimé respectivement à 42 % et 36 % versus 6 % pour un enfant né à terme.

1.5.2. La forme tardive

Cette forme est observée entre le 7^{ème} jour et le 3^{ème} mois de vie du nouveau-né. Elle revêt un aspect clinique polymorphe : septicémie (46 %), méningite (37 %), et plus rarement infections urinaires, ostéite, arthrite, cellulite, ou infections pulmonaires [224].

L'origine du germe responsable de l'infection est incertaine ; une transmission horizontale par l'intermédiaire de la mère ou du personnel hospitalier et/ou une transmission materno-fœtale périnatale ont été décrites [227;228]. Contrairement à l'infection précoce, aucun facteur de risque n'est clairement défini pour la forme tardive de l'infection à *S. agalactiae* (**Fig. 11**).

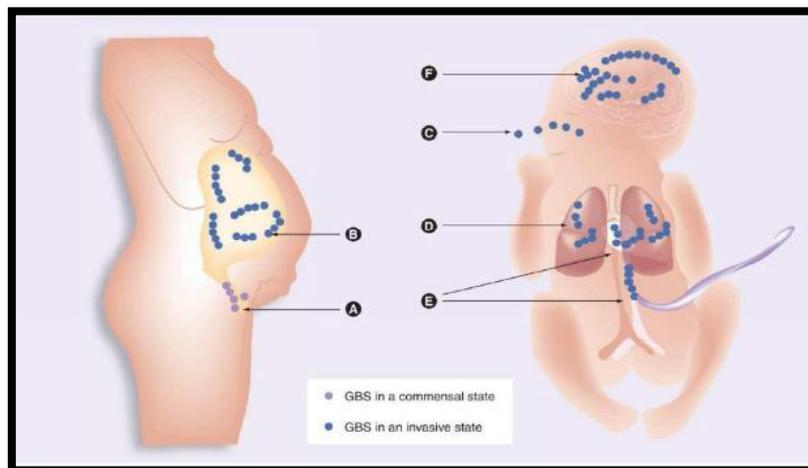


Figure 11: *S. agalactiae*, pathogène du nouveau-né, d'après [229].

(A) *S. agalactiae* réside en tant que commensal dans le tractus génital et gastro-intestinal inférieur de la femme. (B) *S. agalactiae* peut s'infiltrer dans le compartiment intra-utérin de la mère enceinte qui est un porteur asymptomatique. (C) Le nouveau-né aspire *S. agalactiae* dans l'utérus ou pendant l'accouchement. (D) *S. agalactiae* envahit les poumons du nouveau-né provoquant la pneumonie. (E) à partir des poumons, *S. agalactiae* accède à la circulation sanguine du nouveau-né provoquant la septicémie, et envahit de multiples organes néonataux, y compris le cœur. (F) *S. agalactiae* pénètre la barrière hémato-encéphalique, provoquant la méningite.

La mortalité de cette forme de l'infection est moindre que celle observée pour la forme précoce (2 à 6 %) [230], mais les séquelles neurosensorielles majeures sont fréquentes (50%), en particulier après une méningite [231].

Tableau 1: Caractéristiques des infections à SGB [232;233].

	Infection précoce	Infection tardive
Début	≤ à 7 jours (en moyenne 8 à 20 heures de vie)	≥ à 7 jours (en moyenne un mois)
Acquisition	Transmission verticale intra-partum	Transmission verticale - à l'accouchement - nosocomiale
Clinique	- Sepsis - Détresse respiratoire avec pneumonie (méningite 5 à 15%)	- Fièvre - Méningite - Bactériémie - Ostéomyélite
Sérotype	Tous (surtout III, Ia, II)	Le III surtout

1.5.3. Taux de mortalité

Le taux actuel de mortalité global des infections néonatales est de 9,6% avec un taux pour les infections précoces de 12,1% et pour les infections tardives de 6,8% [234]. Ces taux varient en fonction du terme et du poids de naissance. Aux Etats-Unis, le taux de mortalité est d'environ 4% à 6% avec pour les infections précoces, un taux de 4% à 6,8% (à terme 2 à 2,6%, chez les prématurés 10 à 30% en fonction de l'âge gestationnel) et pour les infections tardives, un taux de 2,8% à 4,7% (à terme 1,4% chez les prématurés 5,3%) [120;208]. En France, le taux de mortalité des infections précoces est de 6% à terme, de 42% chez les prématurés et de 36% chez les hypotrophes [219]. Pour les infections tardives, le taux de mortalité est compris entre 2 à 6%.

1.6. Les infections de la femme enceinte

Les infections à SGB de la femme enceinte ont une incidence de 0,12 cas pour 1000 naissances [120]. Elles se présentent dans la moitié des cas sous forme d'une infection génitale haute, infection du placenta ou du liquide amniotique, aboutissant à une mort fœtale. Les autres manifestations possibles sont une septicémie (31 % des cas), endométrite sans mort fœtale (8 % des cas), chorioamniotite sans mort fœtale (4 % des cas), une pneumonie ou un sepsis puerpéral (2% des cas chacun), une endocardite (1% des cas). Ces infections conduisent à un avortement spontané dans 61% des cas, et seulement 30% des enfants ne développeront pas de complications. Pour 81% de ces infections, aucune cause sous-jacente n'est retrouvée (tabac, asthme, diabète, obésité, consommation d'alcool ou de drogue) [120].

Les manifestations cliniques sont en rapport avec la densité de colonisation. Ainsi, une forte colonisation vaginale multiplie par six le risque de sepsis néonatal et par deux le risque d'infection intra-amniotique et une colonisation modérée multiplie par quatre le risque de sepsis néonatal [235].

1.6.1. Facteurs de risque

Parmi les facteurs de risques des infections néonatales précoces à streptocoque du groupe B [208;236] on retrouve:

- la colonisation des voies génito-urinaires par le streptocoque du groupe B,
- la rupture prématurée des membranes (RPM),
- la durée de la rupture des membranes supérieure à 12 heures,
- l'infection intra-amniotique,
- l'antécédent d'un enfant avec une infection invasive à streptocoque du groupe B,
- la température intrapartum supérieure à 37,5°C,
- l'âge gestationnel inférieur à 37 semaines d'aménorrhée,
- le jeune âge et l'ethnie de la mère,
- les manoeuvres obstétricales ou un nombre élevé d'examen vaginaux après le début du travail ou de la rupture des membranes,
- le faible niveau d'anticorps maternels spécifiques de la capsule du streptocoque du groupe B.

1.6.2. Sérotypes capsulaires des souches impliquées dans les infections néonatales

D'après de nombreuses études rapportées sur la répartition des sérotypes des souches du streptocoque du groupe B, les proportions restent stables dans le temps et les sérotypes prédominants impliqués dans les septicémies néonatales sont les sérotypes III, Ia, Ib, II et V [234].

En Europe, la distribution des sérotypes est similaire dans la plupart des pays, avec une prédominance du sérotype III [237-242], et du sérotype Ia aux Etats-Unis [243].

Les souches responsables d'infections néonatales précoces aux Etats-Unis se distribuent de façon similaire avec un tiers des souches de sérotype Ia, un tiers de sérotype III, et en augmentation depuis les années 90s, 14 à 19 % de sérotype V, 9 % de sérotype Ib, et 9 % de sérotype II [244].

Pour les souches isolées d'infections néonatales tardives, le moitié des souches sont de sérotype III, 27 % de sérotype Ia, 14 % de sérotype V, 5 % de sérotype Ib, et 3 % de sérotype II [244;245].

1.7. Prévention de l'infection précoce à streptocoque du groupe B

1.7.1. Dépistage du portage pendant la grossesse

a. Recommandations américaines

Le dépistage systématique à 35-37 semaines de grossesse du portage vaginal du streptocoque du groupe B est réalisé par écouvillonnage de la partie inférieure du vagin et du rectum [208]. L'écouvillon est ensemencé dans un bouillon sélectif, incubé pendant 18 à 24 heures à une température de 35 à 37°C sous 5% CO₂ ou en air ambiant. A 24 heures, il est repiqué sur une gélose appropriée (gélose trypticase soja + sang de mouton 5%, gélose Colombia avec colistine et acide nalidixique, ou une gélose chromogène commerciale). Le streptocoque doit être identifié à 24 - 48 h par agglutination et il est recommandé, pour les femmes allergiques aux bêta-lactamines, de réaliser un antibiogramme avec détection de la résistance inductible à la clindamycine. Le dépistage systématique de la bactériurie asymptomatique est recommandé chez les femmes enceintes.

b. Recommandations françaises

Le dépistage systématique du portage du streptocoque du groupe B est recommandé en fin de grossesse (entre 34 et 38 semaines d'aménorrhée) [38], par écouvillonnage de l'ensemble de la cavité vaginale. Le prélèvement rectal n'est pas recommandé dans le cadre du dépistage. L'ensemencement dans un bouillon d'enrichissement n'est pas nécessaire au dépistage des femmes à risque et le résultat doit être rendu en semi quantitatif [38;219].

Le dépistage systématique du streptocoque du groupe B est inutile chez les patientes à risque, car l'antibiothérapie prophylactique per-partum devra être systématique. De même, le traitement du portage asymptomatique à distance de l'accouchement n'est pas recommandé car il ne diminue pas le taux de portage à l'accouchement (**Fig. 12**). En cas d'allergie aux β -lactamines, les alternatives proposées par l'ANAES sont les céphalosporines (mais risque d'allergie croisée) et l'érythromycine.

La résistance aux macrolides est fréquente. Dans une étude française entre 1998 et 1999, 15% des souches étaient résistantes à l'érythromycine [8]. Aux Etats-Unis, une étude entre 1999 et 2005 rapporte un taux de résistance à l'érythromycine de 32% [120].

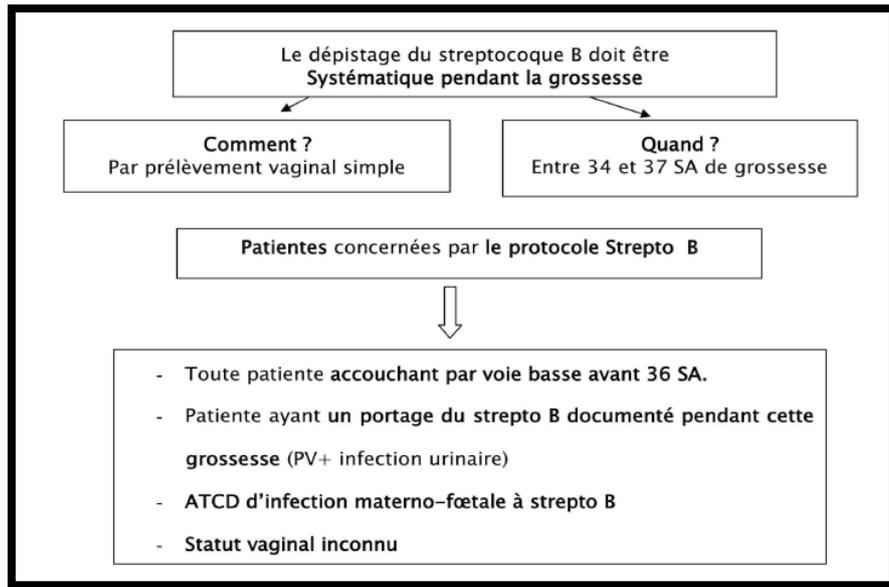


Figure 12: Dépistage systématique du SGB pendant la grossesse [246].

1.7.2. Antibio prophylaxie per-partum

Dans les années 1980, les essais cliniques ont montré que l'administration d'antibiotiques pendant le travail par voie intraveineuse chez les femmes à risque de transmission de streptocoque du groupe B réduit la transmission verticale du streptocoque du groupe B (diminution de la colonisation du nourrisson et des infections précoces) [247;248]. L'efficacité est de 86% à 89% chez les enfants nés de mères ayant reçu une prophylaxie intrapartum active contre streptocoque du groupe B [236].

a. Recommandations américaines

Les premières recommandations ont été émises dans les années 1990 par l'American Academy of Pediatrics (AAP) [35], l'American Congress of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) [37;249]. Depuis, ces recommandations sont révisées régulièrement et le dépistage de toutes les femmes enceintes à 35-37 semaines de grossesse a été institué pour optimiser l'administration de l'antibio prophylaxie intrapartum. D'après les dernières recommandations du CDC [208], les indications de l'antibio prophylaxie intrapartum contre le streptocoque du groupe B sont:

- un antécédent de nouveau-né avec une infection invasive à streptocoque du groupe B lors d'une précédente grossesse,
- une bactériurie à streptocoque du groupe B retrouvée au cours de n'importe quel trimestre de la grossesse en cours,
- un dépistage recto-vaginal positif en fin de grossesse,

- en cas de statut inconnu pour le streptocoque du groupe B au début du travail si l'un des éléments suivants est présent :

- un accouchement prématuré (AP) (âge gestationnel avant 37 semaines de grossesse),
- une rupture des membranes supérieure à 18 heures,
- une température intrapartum supérieure à 38°C,
- une PCR positive pour la recherche de streptocoque du groupe B dans le prélèvement vaginal réalisé au moment de l'accouchement.

En revanche, la prophylaxie intrapartum n'est pas indiquée s'il y a eu une colonisation ou une bactériurie à streptocoque du groupe B au cours d'une grossesse précédente, si le dépistage vaginal et rectal du streptocoque du groupe B est négatif en fin de grossesse et en cas d'accouchement par césarienne débuté avant le début du travail chez une femme avec membranes amniotiques intactes, indépendamment de leur statut vis-à-vis du streptocoque du groupe B ou de l'âge gestationnel.

b. Recommandations françaises

L'antibiothérapie prophylactique per-partum contre le streptocoque du groupe B est recommandée [38] dans les situations suivantes:

- un dépistage positif pour la grossesse en cours

- chez les patientes à risque :

- présence d'un antécédent d'infection néonatale à streptocoque du groupe B au cours d'une grossesse précédente,
- découverte d'une bactériurie à streptocoque du groupe B au cours de la grossesse en cours,

- en l'absence de dépistage du streptocoque du groupe B et si l'un des facteurs de risque suivants est présent :

- température maternelle au cours du travail supérieure à 38°C, durée de la rupture des membranes supérieure à 12 heures,
- accouchement survenant avant 37 semaines d'aménorrhée.

L'antibioprophylaxie n'est en revanche pas indiquée si la culture est négative même en cas d'accouchement prématuré, sauf en cas de rupture prématurée des membranes.

1.7.3. Modalités de l'antibioprophylaxie

La prophylaxie doit être débutée le plus précocement, au début du travail ou au moment de la

rupture des membranes, par voie intraveineuse, pendant une durée au moins supérieure à 4 heures [38;208]. Parmi les molécules utilisées, la pénicilline G reste l'antibiotique de référence pour la prophylaxie avec comme alternative l'ampicilline. L'ANAES propose le schéma suivant: amoxicilline en IV avec une dose de charge de 2g, puis 1g toutes les 4 heures jusqu'à l'expulsion.

En cas d'allergie aux bêta-lactamines, l'antibioprophylaxie doit être adaptée à l'antibiogramme: si la souche est sensible aux macrolides et apparentés, la clindamycine peut être utilisée à la dose de 900 mg, toutes les 8 heures, jusqu'à l'accouchement. En cas de résistance aux macrolides et apparentés, la vancomycine est l'alternative recommandée, à la dose de 1g en IV au début du travail puis 1g toutes les 12 h et 1g 12 h après la délivrance.

➤ Vaccination

L'immunisation des femmes pourrait être une alternative pour prévenir les infections néonatales précoces et tardives par le transfert transplacentaire des anticorps IgG [250;251]. Cette stratégie pourrait également être efficace pour la diminution de la mortalité et de l'infection maternelle [252;253]. La difficulté principale dans l'élaboration de vaccins efficaces pour la prévention des infections materno-foetales à *S. agalactiae* est l'existence de plusieurs sérotypes. Deux types d'antigènes ont été considérés comme candidats pour un vaccin: les polysaccharides capsulaires et les protéines de surface.

➤ Désinfection vaginale

La désinfection locale a pour but d'interrompre la transmission verticale de SGB. En effet, l'utilisation d'agent désinfectant actif sur cette bactérie, comme la chlorhexidine, a été envisagée. L'application vaginale de gel de chlorhexidine dès le premier trimestre de la grossesse ou au cours de l'accouchement a permis de réduire le nombre de nouveau-nés colonisés mais pas le nombre d'infections tardives [87].

➤ Immunoprophylaxie

L'immunoprophylaxie devrait être la méthode la plus prometteuse sur le plan de la durabilité et du rapport coût-efficacité tant pour la prévention des infections néonatales à début précoce que des infections tardives. Cette approche n'est malheureusement pas encore disponible, différents types de vaccins prometteurs restent en développement ou sont en cours d'évaluation chez des sujets sains.

1.8. Les infections génitales au cours de la grossesse liées au portage de SGB

Les infections génitales au cours de la grossesse sont imputables aux bactéries, aux virus et à d'autres organismes appelés protozoaires. Le dépistage et traitement des infections génitales est un des objectifs de la surveillance de la grossesse. Certains auteurs repèrent une association entre le portage de SGB chez les femmes enceintes ayant une infection génitale c'est le cas de l'étude publié par Orrett *et al.*, [254;255].

1.8.1. Rappel sur la flore vaginale

Le vagin est un milieu naturellement septique, la glaire cervicale joue un rôle de verrou microbiologique, empêchant normalement l'ascension d'agents pathogènes et assurant ainsi le maintien stérile de l'endocol, de la cavité utérine, des trompes et du péritoine pelvien [256].

La flore vaginale normale, ou flore de Döderlein, est un milieu en constante évolution. Présente dès les premiers jours de vie de la petite fille, elle reste pauvre jusqu'à la puberté; puis les oestrogènes vont induire la sécrétion de glycogène, substrat favori des lactobacilles qui s'y développent dès lors. Le pouvoir acidifiant de ces derniers est à l'origine d'un pH vaginal entre 3,8 et 4,5 (mesuré dans les culs-de-sac latéraux ou antérieur) et permet ainsi d'écarter toute multiplication de la plupart des agents pathogènes. La concentration normale des lactobacilles est de l'ordre de 10^5 à 10^8 bactéries par gramme de sécrétion vaginale. D'autres flores peuvent s'y mêler, d'origine digestive souvent, oropharyngée plus rarement [233].

A l'état normal physiologique, le vagin peut contenir des bactéries appartenant à divers groupes écologiques [257-259]. Un groupe de bactéries de portage fréquent (2 à 80 % des femmes selon les bactéries impliquées) comporte des bactéries assez régulièrement impliquées dans les IMF (Tab. 2).

Tableau 2: Bactéries maternelles à risque infectieux néonatal [260;261].

Bactéries des infections hématogènes
Listeria monocytogenes (listériose) <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus spp.</i> et autres entérobactéries (pyélonéphrite gravidique)
Bactéries vaginales
Groupe I : flore bactérienne de portage habituel (flore dominante) spécifiquement adaptée à la cavité vaginale sans risque néonatal majeur. Observée chez au moins 98 % des femmes à des concentrations de 10^6 - 10^8 bactéries/g de sécrétions vaginales, elle est essentiellement constituée de lactobacilles (flore de Döderlein) de une à quatre espèces/femme.

Groupe II : flore bactérienne vaginale issue de la flore digestive à risque infectieux néonatal. Elle est observée chez 2 à 80 % des femmes selon les espèces considérées. Il s'agit de : **Streptococcus agalactiae* et *Enterococcus*. **Enterobactéries* (*Escherichia coli* [+++] mais aussi *Proteus*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia* chez les patientes ayant reçu de multiples antibiothérapies ou ayant parfois été colonisées par des produits contaminés (dans ce cadre, il est exceptionnellement isolé *Pseudomonas* et *Acinetobacter*). **Staphylocoques coagulase* + et -. *Bactéries anaérobies (*Bacteroides spp.*, *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Veillonella spp.*, *Mobiluncus*). *Gardnerella vaginalis* et certaines corynébactéries *Mycoplasmes* (en particulier *Mycoplasma hominis*), *Ureaplasma urealyticum biovar parvo* (quatre sérotypes) et biovar T960 (dix sérotypes) ; et certains génogroupes d'*Haemophilus* spécifiquement adaptés à la flore génitale. *Candida albicans*

Groupe III : hôtes usuels de la flore oropharyngée colonisant exceptionnellement la cavité vaginal haut risque infectieux néonatal. Elle est observée chez 0,1 à 2 % des femmes selon les bactéries cause. Toutes les bactéries oropharyngées peuvent être isolées de la cavité vaginale mais le plus souvent il s'agit de : **Haemophilus influenzae et parainfluenzae*. **Streptococcus pyogenes*. *pneumocoques. *méningocoques et autres bactéries capnophiles.

1.8.2. Type de vaginites

Les trois infections vaginales les plus courantes sont l'infection à candida ou "infection à champignons" ou encore "infection à levures", la vaginose bactérienne et l'infection à trichomonas. Voici une description des multiples infections bactériennes susceptibles d'entraver la croissance du bébé en gestation [262;263].

a. Vaginite à candida (champignons ou levure)

L'infection à *Candida*, une forme courante de vaginites, est habituellement provoquée par un champignon surnommé *Candida*. 75% des femmes souffriront au moins d'une infection à champignons durant leur vie et 40% à 45%, en présenteront plus d'une. Une faible proportion de 5% des femmes présenteront plus de 4 infections à champignons durant une année.

L'infection à *Candida* se caractérise habituellement par des pertes inodores, épaisses, présentant la texture du fromage "cottage" blanc et surtout par des démangeaisons vaginales. D'autres femmes se plaignent également de brûlures lors des relations sexuelles. Quelquefois, des infections mixtes peuvent se manifester. L'infection à champignons peut se retrouver chez 40% des femmes porteuses de vaginites [264-266].

Bien que la preuve est incomplète, il ya quelques nouvelles données qui suggère que la candidose pendant la grossesse peut être associée à un risque accru de complications de la

grossesse, telles que la rupture prématurée des membranes, le travail prématuré, chorioamniotite et candidose cutanée congénitale [264;265]

b. Vaginose bactérienne

La vaginose bactérienne représente le type le plus fréquent d'infections vaginales. Plusieurs études mentionnent une incidence pouvant atteindre jusqu'à 50% des femmes porteuses de vaginites [267].

La vaginose bactérienne, tout comme l'infection à champignons, résulte d'une croissance exagérée d'une ou de plusieurs bactéries. Elle découle généralement d'un changement dans l'équilibre naturel du milieu vaginal. L'infection bactérienne se manifeste plus fréquemment chez les femmes qui ont plus d'un partenaire sexuel ou chez celles qui ont un nouveau partenaire [268]. Les femmes qui souffrent de vaginose bactérienne présentent un déséquilibre qui se traduit par une croissance exagérée du nombre de bactéries nuisibles et une diminution importante des lactobacilles qui protègent normalement le vagin [269].

La vaginose bactérienne se manifeste par une forte odeur vaginale de poisson. Elle n'entraîne pas habituellement, de démangeaisons, ni d'irritations caractéristiques de la vaginite à champignons, bien que ces symptômes peuvent également se manifester.

La relation entre vaginose bactérienne et RPMAT (rupture prématurée des membranes avant terme) et AP est bien établie. Des travaux ont validé l'intérêt de traiter la vaginose bactérienne en cas d'ATCD d'AP ou RPMAT. Mais il n'y aurait pas d'intérêt à dépister des patientes sans ATCD [269].

c. Vaginite à trichomonas

La vaginite à trichomonas est une maladie transmise sexuellement (M.T.S.), déclenchée par un organisme parasite appelé le Trichomonas (un protozoaire flagellé; animal microscopique constitué d'une seule cellule, ayant la forme d'une poire dont le corps est muni de 3 à 5 flagelles, sorte de cil, et qui mesure environ 7 à 10 micromètres, mais peut atteindre parfois une longueur de 25 micromètres.) [270-272].

Cet organisme peut se retrouver dans les serviettes sanitaires, sur les sièges de toilette ou dans les maillots de bain humides, mais il est rare que la maladie soit transmise autrement que par la voie des relations sexuelles. Les femmes souffrant de vaginite à trichomonas ont habituellement des pertes vaginales jaunâtres malodorantes. Elles se plaignent surtout de démangeaisons, de sensations de brûlure, d'irritations vulvaires et d'urines douloureuses. La vaginite à trichomonas compte pour environ 10 % des infections vaginales [270-272].

1.8.3. Diagnostic et traitement des infections

L'isolement de *Streptococcus agalactiae* (SGB), *Escherichia coli* K1, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* ou autres bactéries d'origine intestinale ou oropharyngée.

La présence dans un prélèvement vaginal chez la **femme enceinte** de ces bactéries en culture monomicrobienne avec ou sans conservation de la flore lactobacillaire de Döderlein correspondrait plus à un portage qu'à une réelle participation à un processus infectieux local de vaginite. Néanmoins, s'il existe une symptomatologie de vulvovaginite, une culture pure d'une de ces bactéries avec disparition ou forte diminution de la flore normale du vagin et absence de flore de vaginose peut expliquer l'inflammation observée et orienter un traitement spécifique. En dehors des situations à risque d'accouchement imminent (rupture prématurée des membranes, menace d'accouchement prématuré, suspicion de chorioamniotite), il n'est pas recommandé de traiter le portage asymptomatique vaginal de ces bactéries. En cas de suspicion de chorioamniotite ou de menace d'accouchement prématuré, l'antibiothérapie, adaptée à l'antibiogramme réalisé sur ces bactéries, paraît justifiée. La conduite à tenir devant la rupture prématurée des membranes sera abordée dans un chapitre spécifique.

En ce qui concerne le SGB, le traitement à distance de l'accouchement des femmes enceintes porteuses asymptomatiques ne doit pas être réalisé car il ne diminue pas le taux de portage à l'accouchement (grade A) [261].

❖ La Vaginoses

Le meilleur moyen pour diagnostiquer la vaginose bactérienne est l'examen direct des sécrétions vaginales par coloration de Gram. Les critères d'interprétation des résultats sont ceux de Spiegel, Nugent ou Thomasson (grade A).

Les recherches spécifiques par culture de *Gardnerella vaginalis* et des mycoplasmes qui participent avec les bactéries anaérobies au tableau de vaginose bactérienne ne sont pas justifiées au cours de la grossesse (grade A) [261].

« Chez les femmes ayant un antécédent d'accouchement prématuré, le traitement de la vaginose bactérienne par métronidazole diminue le taux de ruptures prématurées des membranes et d'accouchements prématurés (grade A). Dans la population générale, ce traitement n'a pas fait la preuve de son efficacité (grade A). » [261].

La méta-analyse de Guise ne montre pas de bénéfice à dépister toutes les femmes enceintes pour la vaginose et les traite [273]. L'étude de Carey menée chez des femmes enceintes ayant déjà eu un accouchement prématuré montre que le traitement de la vaginose bactérienne ne réduit pas le taux de prématurité ni celui des autres complications périnatales : incidence du

travail spontané, des infections intra-amniotiques ou du post-partum, ni le taux d'admission des nouveau-nés en unités de soins intensifs [274]. Toute vaginose bactérienne doit être traitée pendant la grossesse [261].

2. *Streptococcus agalactiae* chez l'adulte en dehors de la grossesse

2.1. Prévalence de la colonisation

Une colonisation à *S. agalactiae* peut être observée à tous les âges de la vie. Le taux de colonisation varie de 4 à 54% / 16 à 35 % [156;275-281] selon l'âge de la population étudiée, les sites d'isolement et la méthode de culture utilisée [156]. Les sites d'isolement de *S. agalactiae* sont principalement les voies génitales et la marge anale. Une colonisation est également possible au niveau de la peau et de la gorge [156;275;278]. L'activité sexuelle semble jouer un rôle important dans la transmission de *S. agalactiae* [156;275;278], alors que des contacts rapprochés sans relations sexuelles ne semblent pas associés à une augmentation de la transmission [278].

La prévalence du portage recto-vaginal est d'environ 25% chez les jeunes adultes en bonne santé hors grossesse et de 12% à 22% en fonction des études dans les populations plus âgées. Elle ne diffère donc pas de façon significative de celle observée chez les femmes enceintes (15% à 35%) (58,74). La répartition des sérotypes des souches de portage recto-vaginal est la suivante: Ia (22,8%), III (12,3%), V (47,3%), NT (12,3%). La prévalence du portage du streptocoque du groupe B au niveau cutané est de 2% [156]. Quant à la prévalence du portage pharyngé, elle est aussi de 2% chez les personnes âgées [277] et parmi les souches retrouvées au niveau de la gorge, on retrouve les profils alléliques suivants : ST-1, ST-8, ST-23 [156].

La prévalence est plus élevée chez les personnes actives sexuellement et celles qui ont de multiples partenaires sexuels, suggérant une acquisition associée à des contacts intimes [156;278;282]. Cette suggestion est affirmée par une étude montrant des souches identiques pour les partenaires sexuels co-colonisés [279].

2.2. Incidence et émergence des infections

Chez l'adulte, les manifestations de l'infection à *S. agalactiae* sont: bactériémie sans point d'appel (39 à 48%), infections de la peau et des tissus mous (22 à 25.5%), pneumopathie (11 à 12.5%), ostéomyélite (9%), infections articulaires (7.8 à 9%) et plus rarement péritonite, abcès, endocardite, péricardite, méningite et fasciite nécrosante [3;120].

L'incidence des infections chez l'adulte augmente régulièrement. Compte tenu de la baisse des infections néonatales, plus des deux tiers des infections à *S. agalactiae* aux États-Unis sont diagnostiquées chez l'adulte, le plus souvent en dehors de la grossesse [283].

Aux États-Unis, l'incidence est passée de 2,4 cas pour 100.000 personnes en 1982 à 7,3 cas pour 100.000 personnes en 2007 [3;120;283].

En Europe, elle est passée de moins de 0,5 pour 100.000 habitants en 1988 à 3,1 pour 100.000 habitants en 2006 [160;284].

Au Japon, une étude récente a montré que les infections chez l'adulte en dehors de la grossesse représentent près de 90 % des infections à *S. agalactiae* entre 1998 et 2007 dans un centre hospitalier [285].

Mais, d'après les différentes études, l'incidence des infections invasives à streptocoque du groupe B chez l'adulte varie de 3 à plus de 20 pour 100.000 personnes, en fonction de l'âge, du sexe, de la santé du patient et de la localisation de l'infection [286].

Le diabète (44%) est le facteur de risque principal. Les maladies cardiovasculaires (21%), l'obésité (16.8%), les néoplasies (14.8%), l'insuffisance rénale (13.2%), le tabagisme (12.5%), l'insuffisance respiratoire, les maladies neurologiques, l'immunodépression, les maladies hépatiques et l'alcoolisme sont d'autres facteurs de risque décrits [3].

Les infections invasives de l'adulte sont le plus souvent extrahospitalières (communautaires), plus rarement d'origine nosocomiale (entre 6 et 52 % selon les études) [50].

- Les infections nosocomiales représentent, selon les études entre 6% et 52% des infections à streptocoque du groupe B [50]. Parmi les infections nosocomiales, 45% des patients avaient subi un geste invasif (chirurgie, cystoscopie, ou biopsie), 18% avaient des cathéters centraux et 9% des cathéters urinaires [287].

2.3. Démographie et taux de mortalité

L'incidence des infections invasives à streptocoque du groupe B est particulièrement élevée chez les personnes âgées de plus de 65 ans [3;120]. En effet, l'âge moyen des patients varie de 59 à 63 ans en fonction des études [283;288-291] et les bactériémies surviennent dans 84,8 % des cas chez le sujet de plus de 50 ans. Cette bactérie est donc bien un pathogène opportuniste pour les sujets les plus fragiles [292].

2.4. Sérotype capsulaire dans les infections invasives chez l'adulte

Chez l'adulte, près de 70 % des infections à *S. agalactiae* aux États-Unis et au Canada, sont associées à des souches de sérotypes Ia, III, et V [3;120;147;283;287;293]. Le sérotype VI a

une importance notable en Asie [294]. En France pendant la période 2007-2010, les sérotypes III, V et Ia représentaient 71,8% des cas [294]. Les trois sérotypes Ia, III, et V prédominent aussi parmi les souches isolées de colonisation asymptomatique [156;277].

2.5. Conditions prédisposantes et facteurs de risque des infections chez l'adulte

Bien que l'infection à streptocoque du groupe B puisse survenir chez des adultes en bonne santé, la majorité des cas survient chez les patients qui ont d'importantes pathologies sous-jacentes [50;295]. La fréquence des pathologies sous-jacentes est de 69,2% à 92% [41;50]. Parmi les plus fréquemment rencontrées, on retrouve :

- le diabète (15 à 60 % des patients selon les études) plus particulièrement chez ceux présentant une insuffisance vasculaire périphérique,
- le cancer (7 à 23 %) avec comme origine fréquemment retrouvée, les seins, la peau, une origine hématologique,
- les hépatopathies dont la cirrhose et l'éthylisme chronique (7 à 19%),
- l'insuffisance rénale chronique et les uropathies (20,3%),
- les maladies cardiovasculaires (11,3%),
- les maladies respiratoires chroniques (6%),
- un traitement immunosuppresseur (4%) dont corticostéroïdes,
- les maladies neurologiques.

On retrouve aussi dans le contexte clinique un antécédent de chirurgie (12 à 17 %) ou une notion de décubitus ou d'hospitalisation de longue durée [277;284;289]. La neutropénie est aussi évoquée dans certaines publications [295].

En résumé, les adultes à risque de contracter une infection grave à streptocoque du groupe B semblent être les adultes ayant un déficit immunitaire [120;286]. Les personnes âgées représentent plus de 40% des personnes atteintes par des infections invasives à streptocoques du groupe B probablement en raison de l'augmentation des pathologies sous-jacentes associées avec l'âge [289].

2.6. Les manifestations cliniques

Les principales formes cliniques des infections invasives de l'adulte en dehors de la grossesse d'après [41;50] sont les suivantes: des infections de la peau et des tissus mous (13% à 42%): abcès, cellulites, fasciites, infections de plaies ou d'ulcères, des infections ostéo-articulaires (7% à 22%) : arthrites, bursites, ostéomyélites, spondylarthrites, infections sur prothèse articulaire, des infections pulmonaires (3 à 13%), surviennent généralement chez des patients

plus âgés ou des adultes souffrant d'un dysfonctionnement du système nerveux central ou de pathologie ORL locale.

La pneumonie est souvent associée aux soins, le taux de mortalité est élevé et l'isolement concomitant d'un autre organisme, en particulier *Staphylococcus aureus*, est fréquent, des bactériémies sans point d'appel infectieux (8 à 43%), des infections des voies urinaires (8 à 33%), des péritonites (3 à 10%), des méningites (2 à 9%), des endocardites (4 à 10%) et d'autres infections : péricardites, myocardites, endophtalmies, infections sur cathéters intraveineux.

2.7. Les infections récurrentes

Environ 5 % des adultes infectés par *S. agalactiae* en dehors de la grossesse, présentent au moins un deuxième épisode [281;296]. Dans plus d'un tiers des cas, les patients présentent des infections profondes telles une endocardite ou une ostéomyélite vraisemblablement présentes mais non diagnostiquées au cours du premier épisode [283].

Le portage gastro-intestinal ou génito-urinaire d'une souche particulière de *S. agalactiae*, à laquelle l'hôte est sensible (une souche virulente, ou un hôte immunodéficient, ou les deux), peut constituer un réservoir pour l'infection invasive récurrente [281;297]. L'acquisition répétée de la souche par contact intime avec un porteur de *S. agalactiae* doit aussi être envisagée [50].

2.9. Les infections polymicrobiennes

Dans près d'un tiers des cas d'infections, et notamment pour les infections de la peau et des tissus mous et les bactériémies, *S. agalactiae* est associé à d'autres germes [3;285;294;298-305]. *Staphylococcus aureus* est souvent en cause, moins fréquemment *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, ainsi que des staphylocoques à coagulase négative, et des Entérobactéries.



Travail personnel



Partie 2: Matériel et Méthodes

1. Cadre et objectifs de l'étude

Ce travail présente une étude prospective, portant sur 93 souches de *Streptococcus agalactiae*, encore appelés streptocoque du groupe B (SGB). Quarante-quatre souches isolées auprès des femmes enceintes au cours des trois trimestres de la grossesse dans des cabinets de gynécologues à la ville de Guelma, Algérie et quarante-neuf souches collectés dans le laboratoire de Microbiologie de l'Hôpital de la Timone de Marseille, France à partir de différents échantillons.

Compte tenu de la place grandissante de *S. agalactiae* comme agent étiologique de pathologies infectieuses de la femme enceinte et l'adulte [3], les connaissances concernant la nature des souches impliquées dans ces infections est actuellement parcellaire. Contrairement à de nombreuse région du monde, il existe peu d'informations documentées sur le marquage épidémiologique menées sur *S. agalactiae*, la caractérisation moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques, sérotypes et génotypes (Séquences Types; STs) et la relation clonale des souches de *S. agalactiae* isolées en Algérie et particulièrement à Guelma. C'est la raison pour laquelle nous avons effectué ce travail.

Dans le but d'évaluer la situation du problème posé par le SGB dans notre région, nous avons exploré de manière prospective le degré de colonisation chez 494 femmes enceintes par cette bactérie et essayé de dégager les éventuels facteurs de risques associés à ce portage ainsi que les principales caractéristiques des souches isolées. Le dépistage des femmes enceintes colonisées par le SGB est donc une étape clé dans la prévention des infections néonatales.

Par le présent travail, nous avons parallèlement caractérisé en comparant des souches de *S. agalactiae* isolées de différents prélèvements (prélèvement vaginal, d'urine et d'hémoculture) au niveau du laboratoire de Microbiologie de l'Hôpital de la Timone (Marseille, France) avec celles isolées à Guelma, Algérie.

Pour cela nous avons identifiés les souches isolées par la spectrométrie de masse MALDI-TOF MS (Microflex), étudié la sensibilité aux antibiotiques des isolats par des techniques phénotypiques puis la détermination moléculaire des gènes de résistance et leur séquençage. Les séquences obtenues sont analysées par le logiciel « Codon Code Aligner » et soumises via

Internet, à l'aide du logiciel Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et la base de données ARG-ANNOT, pour comparaison avec les séquences homologues, contenues dans la banque informatique internationale dénommée «GenBank».

Durant notre étude, deux aspects nous ont paru intéressants à étudier et à analyser. Le premier étant la caractérisation des souches de SGB par typage moléculaire et le second étant le génotypage par Multi Locus Sequence Typing (MLST) des souches étudiées disponible sur le site (<http://pubmlst.org/sagalactiae/>).

Les examens bactériologiques ont été réalisés au niveau du laboratoire central de microbiologie de l'Hôpital IBN ZOHR de Guelma. Les techniques de Biologie Moléculaire ont été menées en partenariat avec l'Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes, UMR CNRS-6236, IRD189, IFR48, Faculté de Médecine et de pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France.

2. Souches bactériennes

Quatre-vingt-treize souches de *S. agalactiae* ont été prévues dans cette étude, dont 44 ont été recueillies entre Janvier 2011 et Février 2012 auprès des femmes enceintes dans deux cabinets de gynécologues à Guelma, Algérie et 49 souches de SGB collectés d'Octobre 2013 jusqu'à Janvier 2014, au laboratoire de Microbiologie de l'Hôpital de la Timone de Marseille, France à partir de différents échantillons (prélèvements vaginaux «n=30», d'urine «n=10» et d'hémoculture «n=9»). La conservation des souches a été réalisée en milieu cryo-billes (réf. AEB400100, AES Laboratoire, Combourg, France) à -80°C.

3. Analyse préliminaire

3.1. Recueil des données et dépistage (Guelma. Algérie)

Le dépistage du SGB a été réalisé de manière prospective chez 494 femmes enceintes en consultation prénatale durant les trois trimestres de la grossesse, indépendamment du motif de consultation et de l'âge de la grossesse, y compris celles qui sont en travail. Les femmes qui ont refusé le prélèvement n'ont pas été incluses dans le travail.

Les données cliniques concernant ces femmes sont collectées pour l'ensemble des patientes en utilisant des fiches de recueil standardisées (**Tab. 3**), remplies à l'aide d'un interrogatoire des patientes.

3.1.1. Fiche de prélèvement

La fiche de recueil portait sur:

- Les caractéristiques sociodémographiques: âge, niveau socio-économique (incluant le niveau d'étude et les revenus financiers), parité, âge gestationnel,
- Les antécédents gynéco-obstétricaux: antécédents d'interruption volontaire de grossesse, fausse couche spontanée, grossesse extra-utérine, mort fœtale in utero, menace d'accouchement prématuré.
- Les événements intervenus lors de la grossesse actuelle: grossesse unique ou multiple, diabète gestationnel, l'hypertension artérielle (HTA), anémie ou autre.
- Infections uro-génitales au cours de la grossesse.
 - **Les critères d'exclusion;**
- Femme enceinte sous antibiotique (dans le dernier mois avant le dépistage.) ou autres traitement au cours de la grossesse.
- Femme enceinte qui refuse volontairement de participer à l'étude.

Tableau 3: Fiche d'évaluation du portage de streptocoque du groupe B

Fiche D'évaluation Du Portage De Streptocoque Du Groupe B	
Numéro :	Date ://
Nom :	Âge :
Niveau socio-économique :	
Niveau d'étude : Primaire ◊ Secondaire ◊ Supérieur ◊	
Les revenus financiers (une fourchette salariale) < 15000DA > et >30000DA	
Gestité :	Parité : Profession :
Poids :	Taille :
Antécédents:	
Diabète/autre ◊	Interruption volontaire de grossesse ◊
Fausse couche spontanée ◊	Menace d'accouchement prématuré ◊
Grossesse extra-utérine ◊	Mort foetale in utéro ◊
Pyélonéphrite aigue gravidique ◊	Portage de streptocoque B ◊
Mort per-partum ◊	Mort néonatale ◊
Tabagisme ◊	
Paramètres De La Grossesse Actuelle :	
Age Gestationnel :	
Grossesse gémellaire ◊	
Diabète gestationnel ◊ :	Equilibré : Oui ◊ Non ◊
Menace d'accouchement prématuré ◊ àSA	

3.1.2. Démarche du diagnostic;

Toutes patientes prélevées ont obéi aux conditions suivantes:

- Absence de toute toilette intime, tout traitement local (crème, ovules, savons, gel) ainsi que tout rapport sexuel dans les 24heures précédant l'examen,
- Le prélèvement est effectué généralement avant la première miction matinale,
- Le prélèvement est réalisé avant ou à distance de tout traitement antibiotique,
- Pas de prélèvement pendant la période menstruelle car la flore est modifiée et souvent polymorphe.

Après admission et recueil des renseignements cliniques, la patiente est installée sur le lit d'examen gynécologique.

3.2. Prélèvements

Le prélèvement a été réalisé en chargeant deux écouvillons stériles (CITOSWAB) au niveau du tiers inférieur du vagin (sans atteindre le cul de sac vaginal) [261]. Les écouvillons utilisés sont dotés d'un milieu de transport (Portagerm BioMérieux, France).

Les échantillons prélevés ont été acheminés au laboratoire de microbiologie dans un délai maximum de trois heures afin d'éviter leur dessèchement. Ensuite les écouvillons destinés à la recherche de SGB sont placés dans un milieu d'enrichissement sélectif Todd Hewitt (Biomérieux, France) et incubé à 37°C pendant 24h.

L'échantillon recueilli est soumis rapidement aux analyses. Le 1^{er} écouvillon est destiné pour diagnostiquer une mycose, une vaginose à *Gardnerella vaginalis* et/ou la recherche d'une vaginite à *Trichomonas vaginalis*. Le second a pour but de rechercher les streptocoques de group B.

3.2.1. Technique d'analyse de laboratoire

Toutes les manipulations sont réalisées selon « Les techniques bactériologiques classiques ».

- **Macroscopie** : Les écouvillons reçus étaient soit purulents, hématiques ou inchangés.
- **Microscopie**
 - **Examen direct avant culture**

Il intègre l'état frais et la coloration de Gram

- **Etat frais**

Il est réalisé entre lame et lamelle (Objectif 40) sur des leucorrhées à partir du spéculum de prélèvement. Nous avons apprécié la morphologie des bactéries, leur mobilité, la présence

éventuelle d'un parasite et leur mobilité (Trichomonas), des levures et l'appréciation de la cytologie.

- Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée pour départager les bactéries en Gram positif (coloration violette) et Gram négatif (coloration rose), apprécier leur morphologie (cocci ou bacille ou levure);

Cet examen nous a permis aussi de distinguer les différents éléments de la flore vaginale, cellules épithéliales colonisées par des coccobacilles qui prennent mal la coloration de Gram «clue cells». La présence des clue cells oriente vers *Gardnerella vaginalis* qui sera ensuite confirmé par le test à la potasse.

Cet examen donne des renseignements sur l'affinité tinctoriale des différents éléments.

- La cytologie a permis de noter la présence ou l'absence des cellules épithéliales, hématies, leucocytes voire autres cellules.

Remarque: La coloration de Gram a été faite après l'ensemencement pour éviter la contamination de notre produit d'analyse.

➤ Mise en Culture

Les écouvillons sont ensemencés sur une gélose au sang de mouton, Sabouraud Chloramphénicol, Gélose nutritive (GN) et une gélose chocolat (Oxoid, France).

Les boîtes de GN et Sabouraud Chloramphénicol sont incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 48h. La gélose au sang et la gélose chocolat sont d'abord mises dans une jarre en atmosphère enrichi de 5 à 10% de CO₂ et ensuite incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 48h.

Après une incubation les germes ayant cultivé sur les milieux sont identifiés par leurs caractères morphologiques, biochimiques et antigéniques.

3.3. Diagnostic des infections

3.3.1. Vaginoses bactériennes (VB)

Aujourd'hui le diagnostic repose toujours sur des critères cliniques: **critères d'Amsel**, ainsi que microscopiques: **score de Nugent**.

Au laboratoire le diagnostic de VB a été évalué par la méthode de Nugent [306] décrit dans le **tableau 4**. Ce diagnostic sera quasi certain si trois critères sont présents:

- leucorrhées grisâtres malodorantes.

- test positif à la potasse ou «Sniff test» (Il consiste à ajouter sur le prélèvement étalé sur lame une goutte de potasse à 10 %).
- pH des sécrétions vaginales > 4,5; à l'aide d'un papier pH spécial.
- présence d'un aspect de " clue cells " à l'examen direct des leucorrhées au microscope.
- Flore de vaginose: disparition des lactobacilles et prolifération des autres morphotypes (Score de Nugent \geq 7).

Tableau 4: Évaluation du score de Nugent de la flore vaginale.

Quantité par champs > (immersion de l'objectif 100) >	> 30	6 à 30	1 à 5	< 1	0
Morphotype lactobacilles (L): Bacilles à Gram + à bords parallèles	0 	1 	2 	3 	4
Morphotype Gardnerella et anaérobies (G): Bacilles à Gram variable, corynéformes, polymorphes	4 	3 	2 	1 	0
Morphotype Mobiluncus (M): Bacilles incurvés à Gram variable (coup d'ongle)	2 	2 	1 	1 	0

➤ **Interprétation du score de Nugent:**

En explorant par examen direct microscopique, après coloration de Gram des sécrétions vaginales prélevées au niveau du cul-de-sac postérieur ou latéral du vagin on peut établir le score de Nugent qui divise la flore vaginale en trois groupes:

- **Groupe 1** (score comprise entre 0 et 3): flore normale, à prédominance de lactobacilles, parfois elle est associées à d'autres morphotypes bactériens mais présents en petite quantité.
- **Groupe 2** (score comprise entre 4 et 6): flore intermédiaire, avec des lactobacilles peu abondants et associées à d'autres morphotypes bactériens peu différenciés en petite quantité. Il s'agit d'une flore vaginale altérée, mais elle n'est pas en faveur d'une vaginose bactérienne.
- **Groupe 3** (score compris entre 7 et 10): flore évocatrice d'une vaginose bactérienne. Les lactobacilles ont disparu, au profit d'une flore anaérobie abondante et polymorphe.

Cette exploration microscopique est actuellement plus sensible et spécifique que le diagnostic clinique des vaginoses bactériennes [307].

3.3.2. Vaginite

Inflammation vaginale d'origine bactérienne, parasitaire, mycosique ou virale. L'examen direct à l'état frais permet de retrouver : *Trichomonas vaginalis* (Une goûtte des sécrétions est mélangée à une goûtte de sérum physiologique préchauffé à 37°C).

Le frottis coloré par coloration de Gram ou au bleu de méthylène retrouve des polynucléaires plus ou moins altérés. Le diagnostic positif est apporté par la culture avec mise en évidence d'une flore prédominante soit à germes banaux, soit à *Candida albicans*.

Pour identifier le genre *Candida albicans*, Nous avons utilisés **la technique de filamentation** dans le sérum.

➤ **Technique**

Quelques colonies ont été prélevées et mises dans un tube contenant 0.5 ml de sérum humain. Le mélange est incubé à 37°C pendant 3 heures. La lecture a été faite entre lame et lamelle à l'objectif 40X.

➤ **Résultat**

La présence d'un tube germinatif ou filamentation indique la présence de *C. albicans* et l'absence de filamentation signe la présence de *Candida spp.*

L'interprétation des données sont mentionné sur une fiche de résultats (**Tab. 5**).

Tableau 5: Fiche de résultats.

FICHE DE RESULTAT « PRELEVEMT VAGINAL »	
N°	
Nom.....	Prénom.....
Age.....	
Examen demandé.....	
Date de prélèvement.....	Maladies associées.....
Paramètres Microbiologiques :	
Examen direct :	
Résultats :	
✓ Leucocytes :	
✓ Levures:	
✓ Clue celles :	
✓ Flore de Doderlein :.....	
✓ Cellules épithéliales :.....	
✓ Culture :	

3.4. Analyse des données

Le taux de portage chez la femme enceinte est calculé en rapportant le nombre de cas de colonisation par SGB chez les femmes enceintes durant la durée d'étude au nombre total des patientes.

Les données recueillies ont été saisies dans Microsoft Office Excel 2010 et analysées par le logiciel informatique Epi-info (http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm). Les résultats ont été présentés en pourcentages, tableaux et figures.

4. Analyse secondaire

4.1. Caractérisation des souches de *S. agalactiae*

4.1.1. Isolement et identification

Au laboratoire, chaque écouvillon a été déchargé dans un bouillon d'enrichissement sélectif Todd-Hewitt (Bio-Mérieux, France) contenant l'acide Nalidixique (15 µg/ml) et la colistine (10 µg/ml) puis incubés à 37°C pendant 24 heures (pour faciliter l'isolement des Streptocoques du groupe B des prélèvements polymicrobiens).

Les souches ont été mises en culture sur gélose Columbia au sang de mouton (Bio-Mérieux, France) et incubées en atmosphère enrichie en CO₂ à 37°C pendant 18 à 24 heures. Parallèlement, des CHROM agarTM StrepB (Bio-Rad, France) ont été ensemencées et incubées en aérobie à 37°C pendant 24 heures.

L'identification a été réalisée sur la base des critères suivants: hémolyse (bêta) sur gélose au sang, colonies roses opaques sur le CHROMagarTM StrepB, Cocci à Gram positif en longue chaînette dont la réaction catalase est négative, identification biochimique par la galerie rapide API 20-Strep (BioMérieux, Meylan, France), Camp Test et le sérogroupage de Lancefield par agglutination avec le l'antisérum anti-B (Slidex Strepto-Kit, BioMérieux, France). En cas d'agglutination positive, le diagnostic de SGB a été retenu. Finalement, re-identification des souches par la spectrométrie de masse MALDI-TOF MS (Microflex).

a. API 20-Strep: est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant (**Tab. 6**). Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques, entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants.

Tableau 6: Traduction des profils numériques de *Streptococcus agalactiae* en caractères biochimique.

AP 20 Strep	VP	HIP	ESC	PYRA	AGAL	BGUR	BGAL	PAL	LAP	ADH
SGB	100	99	1	1	4	79	1	96	99	99
RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	HEM
98	0	1	1	50	87	0	1	35	4	75

% de réactions positives après 4/24 h à 36°C ± 2°C

b. Sérogroupage de Lancefield (Slidex Strepto-Kit, BioMérieux, France).

Le PASTOREX™ STREP est un test d'agglutination rapide permettant une détermination du groupe des streptocoques selon la classification de Lancefield. Il comporte des suspensions de latex permettant d'identifier les groupes A, B, C, D, F et G.

L'identification des antigènes spécifiques de groupe par des antisérums homologues nécessite une extraction préalable. PASTOREX™ STREP utilise une méthode simple d'extraction enzymatique. L'antigène présent dans l'extrait obtenu est identifié à l'aide de particules de latex recouvertes des anticorps spécifiques de groupe. Ces particules s'agglutinent fortement en présence de l'antigène homologue alors qu'elles restent en suspension homogène en l'absence de celui-ci.

➤ **Préparation des extraits**

- 5 à 10 colonies des SGB ont été prélevées et mises dans un tube à hémolyse contenant 300ul de solution d'extraction enzymatique ;
- Le mélange est incubé à 37°C pendant 15 minutes en l'agitant toutes les 5 minutes.

➤ **Identification**

- chaque flacon est agité pour remettre en suspension les particules de latex ;
- une goutte de chaque latex est déposé dans les cercles de la carte d'agglutination.
- A l'aide d'une pipette, une goutte d'extrait a été déposée dans chacun de ces cercles ;
- le contenu de chaque cercle est homogénéisé à l'aide d'un bâtonnet que nous avons changé pour chaque réaction ;
- la carte est agitée selon un mouvement orbital pendant une minute maximum et le résultat est observé à l'œil nu.

➤ **Résultat**

La formation des agglutinats rouge sur fond vert au niveau de l'un des cercles signe un résultat positif. L'absence d'agglutination avec l'un des réactifs déposé dans les cercles est noté *Streptocoque non groupable*.

Les souches ayant agglutinées avec le réactif B sont soumis à une épreuve de CAMP test.

➤ **Contrôle qualité du test**

- Contrôle des suspensions de latex

L'immunoréactivité des réactifs peut être contrôlée à l'aide du témoin antigène positif, qui doit entraîner une agglutination franche de chaque suspension de latex en moins d'une minute.

- Contrôle de l'enzyme

L'activité de la solution enzymatique peut être contrôlée à l'aide d'une souche de groupe connu. L'extrait antigénique de cette souche devra entraîner une agglutination franche de la suspension de latex homologue.

- Contrôle de spécificité

La spécificité des réactifs peut être contrôlée par l'absence d'agglutination de l'extrait enzymatique avec chaque suspension de latex.

c. CAMP Test

Le Camp-test contribue à l'identification des *Streptococcus agalactiae* et des *Listeria*. Il est le seul *Streptococcus* bêta-hémolytique qui donne un test de CAMP positif. Il doit son nom aux initiales des chercheurs qui ont mis au point la technique: Christie-Atkins-Munch-Pertersen [45].

➤ Principe

Les streptocoques de group B donnent habituellement sur gélose au sang, des colonies entourées d'une zone étroite d'hémolyse à bords flous. Cette hémolyse est, seulement pour les hématies de mouton, exaltée par la présence d'une toxine staphylococcique.

CAMP-test est effectué pour détecter la production par le groupe B mais pas d'autres streptocoques, d'une protéine extracellulaire diffusible (facteur CAMP) qui agit en synergie avec la β -lysine produite par *Staphylococcus aureus* pour provoquer une meilleure lyse des globules rouges sur une gélose au sang [45].

On observe le même phénomène pour *Listeria* testée avec *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi*, pour *Listeria monocytogenes*, seulement avec *Rhodococcus equi*.

➤ Technique

- Faire une strie de *Staphylococcus aureus* (ATCC 7625) productrice de toxine staphylococcique qui traverse la boîte en allant par le centre sur une gélose au sang de mouton,
- La souche du *Streptocoque B* à tester estensemencée selon une strie perpendiculaire à l'ensemencement du *Staphylococcus aureus* et qui s'arrête à 2 mm de celle-ci,
- Incuber 24h en aérobose,

➤ Lecture

Un Camp-test positif se traduit par l'observation d'un croissant indiqué par une zone en forme d'arrowhead- shaped de bêta-hémolyse à la jonction des deux organismes (Fig. 16).

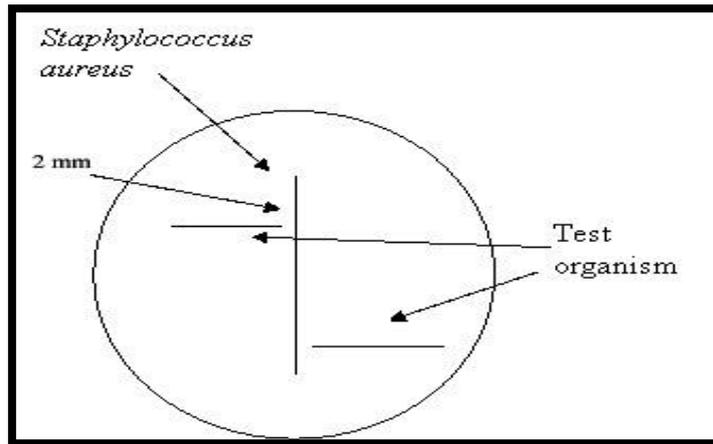


Figure 16: Motif stries pour le test de CAMP [45].

d. La spectrométrie de masse MALDI-TOF MS (Microflex)

Le MALDI-TOF est un spectromètre de masse, couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI= **M**atrix-**A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onisation) et un analyseur à temps de vol (TOF= **T**ime-**O**f-**F**light mass spectrometry) [308]. La principale fonction de la spectrométrie de masse MALDI TOF (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany), en microbiologie clinique, est l'identification des microorganismes par l'analyse de leurs protéines totales. La spectrométrie de masse combinée à une désorption- ionisation laser assistée par une matrice, d'une bactérie isolée, permet de réaliser cette identification en quelques minutes et avec une haute précision [308].

Le protocole appliqué pour identifier les souches bactériennes, au niveau du laboratoire de l'URMITE est le suivant:

➤ **Nettoyage de la plaque cible:**

❖ **Matériel**

- Hotte chimique
- Pipette réglable
- Eprouvette graduée
- Papier de précision (type Kim Wipes)
- Ethanol 70%
- Trifluoroacetic acid TFA 80%
- Eau HPLC

❖ **Méthode**

Le nettoyage de la plaque consiste à rincer la plaque avec de l'eau chaude, et à verser de l'éthanol à 70% que l'on frotte avec du papier. Ensuite, on plonge la cible dans l'éthanol

pendant 15 min, puis on la frotte avec 500µl de TFA (Acide TriFluorocétique) à 80% et enfin on la rince avec de l'eau utilisée pour l'HPLC et on la laisse sécher à l'air libre.

➤ **Préparation de la matrice:**

La matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie des faisceaux laser incident.

❖ **Matériel**

- Hotte chimique
- Bain à ultrasons
- Centrifugeuse
- Réactifs: Alpha-cyano-a-hydroxy-cinnamic acid (HCCA), Acétonitrile, TFA a 10%.

❖ **Méthode**

Dans cette étude, nous avons utilisé, sous une hotte chimique, un protocole de préparation de la matrice. Dans un tube à Eppendorf, on dispose les éléments suivants en respectant la procédure suivante :

- 2 spatules d'alpha- cyano- 4 hydrocinnamic acide
- 500 µl d'acetonitril HPLC
- 250 µl de TFA à 10% (acide trifluorocétique)
- 250 µl d'eau HPLC
- Soniquer pendant 10 minutes dans un Bain à ultrasons
- Centrifuger 5 minutes à 13000 RPM
- Transférer le surnageant dans un tube à Eppendorf propre.

Ainsi la matrice prête à être utilisée.

➤ **Préparation du Témoin Positif (T+)**

❖ **Matériel**

- Hotte chimique
- Poste de sécurité microbiologique (PSM)
- Pipette réglable
- Eppendorf

❖ **Méthode**

- Préparer 1mL de « solution stock » : 475µL d'eau HPLC + 25µL d'Acide Trifluoracétique (TFA) + 500µL d'Acétonitrile HPLC.
- Mélanger la solution stock.

-Ajouter 500µL de cette « solution stock » dans un tube de Bacterial Test Standard (#255343, Bruker).

-Fermer les tubes et mélanger. **Laisser reposer 5 minutes.**

-Le BTS est prêt à l'emploi et peut être conservé en aliquots de **10 µL** pendant 6 mois à -20°C.

Remarque: le témoin négatif est la matrice seul (1.5µL de matrice).

➤ **Préparation des échantillons pour l'analyse spectrométrique (Fig. 17):**

❖ **Matériel**

-Poste de sécurité microbiologique (PSM)

-Cône fin

-Cible (Plaque métallique)

-Matrice

❖ **Méthode**

- Sous un PSM (poste de sécurité microbiologique), on prélève les bactéries à identifier, à partir d'une culture bactérienne de 24 heures, pour les déposer sous forme d'un fin frottis d'environ 5 mm², sur les spots de la plaque métallique servant de cible aux tris du laser. Pour chaque souche, on fait 4 spots pour réduire le risque d'erreur.

- Déposer les échantillons dans la zone appropriée de façon la plus homogène possible et de façon à obtenir une fine couche sur la cible (support métallique en acier inoxydable avec 96 puits à l'aide d'une pointe de cône).

- On dépose 1.5 µl de matrice sur chaque spot.

- On laisse sécher sous la hotte pendant 15 minutes pour permettre sa co-cristallisation avec l'échantillon bactérien.

➤ **Insertion de la cible et lancement du MALDI TOF (Fig. 17)**

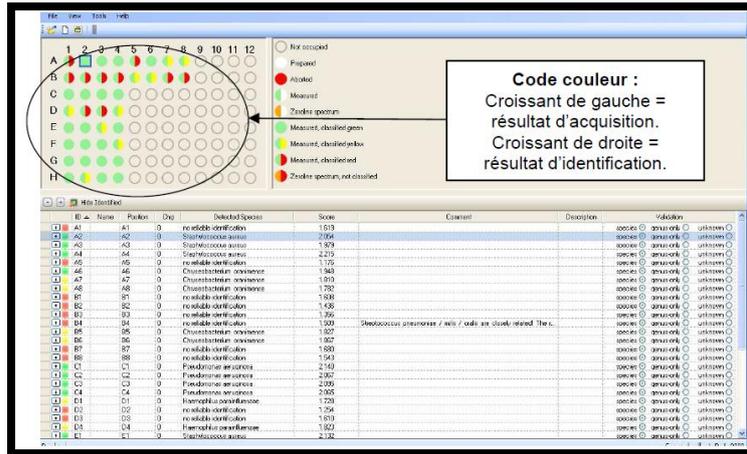
- La cible était ensuite introduite dans l'appareillage (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) et exposée sous-vide, aux tris du laser.

- Remplir la fiche du logiciel MALDI Biotyper Automation Control.

- Lancer le spectromètre de masse: Microflex (**Fig. 18**).



-a-



-b-

Figure 17: Insertion de la cible MALDI et interprétation des résultats.

a- Insertion de la cible et lancement du MALDI TOF. **b-** Code couleur des analyses et identifications Biotyper.

➤ **Interprétation des résultats de l'analyse spectrométrique:**

❖ **Validation des résultats d'identification Biotyper :**

Les résultats d'une cible sont exploitables seulement si les témoins T+ et T- sont valides :

- **T+ doit correspondre à *Escherichia Coli* avec un score > 1.9,**

- **T- doit correspondre à un score sans identification < 1.7.**

Les résultats d'identification des bactéries sont donnés, sous Biotyper RTC, par un score entre 0 à 3.

Score	0 – 1.7	1.7 - 1.9	1.9 - 3
Couleur	Rouge	Jaune	Vert
Identification bactérienne	Aucune bactérien	Genre	Espèce bactérienne

- Le MALDI TOF identifie les micro-organismes en utilisant le logiciel Biotyper 2.0. La spectrométrie de masse permet de mesurer une unique empreinte moléculaire d'un organisme, plus précisément, le logiciel Biotyper MALDI mesure les protéines très abondantes qui se trouvent dans tous les micro-organismes. Les motifs caractéristiques de ces protéines très abondantes sont utilisés pour identifier d'une manière fiable et précise un micro-organisme particulier, en faisant correspondre le modèle respectif à une base de données étendue, ouverte, pour déterminer l'identité du micro-organisme jusqu'au niveau d'espèce.

L'identification est correcte lorsque la valeur du score identifiée par la MALDI TOF est >1.9 [308]. L'acquisition des spectres se lance automatiquement avec le logiciel FlexControl.

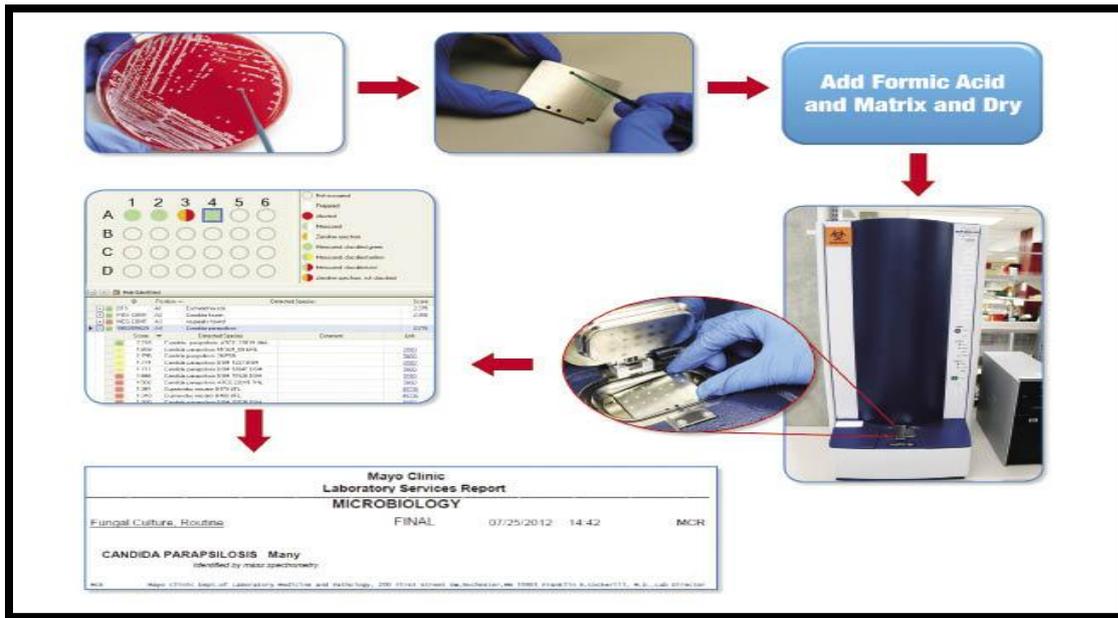


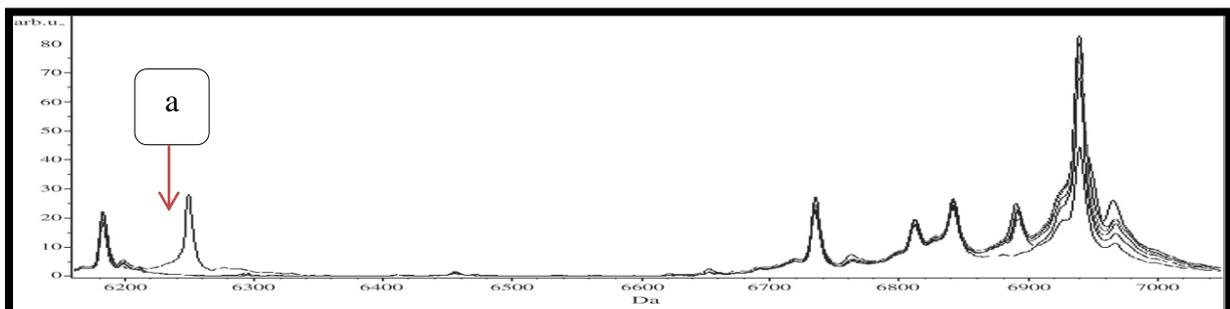
Figure 18: Protocole de la spectrométrie de masse MALDI-TOF MS.

4.1.2. Biomarqueage

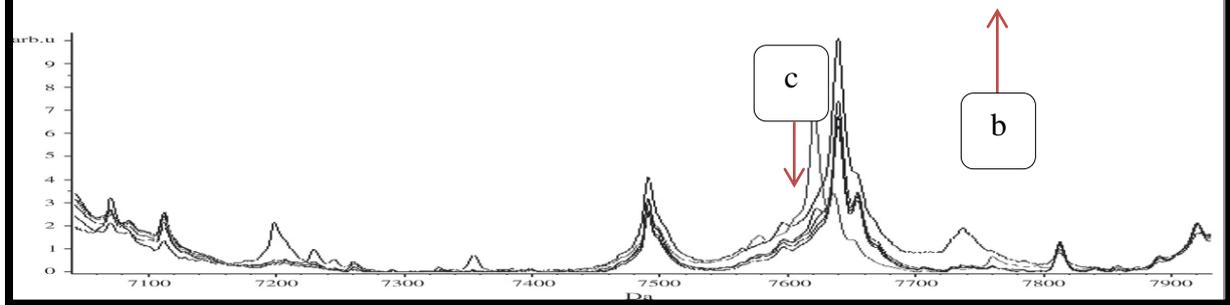
- Parallèlement, nous avons utilisé le MALDI-TOF MS comme un outil de biomarqueage des souches de SGB pour reconnaître les clones de virulence ST-1 et ST-17 à l'étape de l'identification des espèces comme décrit par Lartigue *et al.*, [23] (**Fig. 19**). Les logiciels Flex Analysis et Excel sont utilisées pour l'extraction et l'analyse des pics (**Annexe 1**).

Intensité
U.arb

A



B



m/z

Figure 19: Pics discriminants des souches de SGB analysés par MALDI-TOF MS [23].

(m/z) : Le rapport masse (Da) sur charge (U.arb.).

Les intensités absolues des ions (en U.arb, Unités arbitraires) sont représentés sur l'axe des y, et les masses de l'ion (Da) sont indiqués sur l'axe x. La valeur m/z représente rapport masse sur charge. Cette valeur correspond à la masse moléculaire de la protéine à une seule charge positive. **A**-Pic qui distinguent les souches ST-1 des quatre autres grandes souches de (ST-8, ST-17, ST-19 et ST-23) dans l'intervalle de 6200 à 7000 Da. Flèches vers le haut montrent un pic de masse à 6250 Da (**a**) et pas de pic de masse à 6888 Da (**b**), l'identification du clone ST-1. **B**-Pic qui distinguent les souches ST-17 des quatre autres grandes souches de (ST-1, ST-8, ST-19, et ST-23) dans l'intervalle de 7100 à 7900 Da. Flèche vers le bas montre le pic de masse à 7625 Da (c), l'identification des souches ST-17.

4.2. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques (Antibiotype)

La sensibilité aux antibiotiques de nos isolats a été évaluée en utilisant la méthode de diffusion de disques sur gélose Muller-Hinton additionné de 5% de sang (Bio-Mérieux, France), conformément aux recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) [309]. Les géloses ont été ensemencées à l'aide d'un écouvillon à partir d'une suspension de germes à 0.5 Mac Farland (une densité optique égale 0.2 à 650 nm) diluée au 1/10 de façon à obtenir une concentration finale de 10⁷ UFC/ml, conformément aux recommandations de la CA-SFM.

Des disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface des géloses, à l'aide d'un distributeur automatique. Les antibiotiques testés sont les suivants: L'oxacilline, la céftriaxone, la pénicilline G, l'amoxicilline, l'ampicilline, la vancomycine, la gentamicine, l'érythromycine, la tétracycline, la clindamycine, la rifampicine et la pristinamycine (Oxoid, France). Les boîtes ont été mises à incuber pendant 18 à 24 heures à 37 °C.

À l'aide d'un pied à coulisse, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés par deux fois. L'interprétation en Sensible (S) Intermédiaire (I) ou Résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le CA-SFM [309].

Pour les souches résistantes aux macrolides, les phénotypes de résistance ont été caractérisés par la méthode de diffusion du double disque (D test) avec des disques papier d'érythromycine (15 µg) et de clindamycine (2 µg) placés à 18-20 mm l'un de l'autre à la surface d'une gélose de Muller Hinton enrichi de 5% de sang de mouton. Après une nuit d'incubation à 35°C en aérobie, les zones d'inhibition autour des disques déterminent le phénotype de résistance de la souche; la résistance constitutive MLS_B (cMLS_B), la résistance inductible MLS_B (iMLS_B) et le phénotype de résistance M, comme décrit précédemment

[10;58]. L'observation d'un antagonisme érythromycine-clindamycine permettait de caractériser la souche résistante à la clindamycine

D'après les recommandations du CASFM 2014; devant une souche résistante à l'érythromycine et sensible à spiramycine, lincomycine ou clindamycine, rechercher le caractère inductible de cette résistance (antagonisme érythromycine-clindamycine). En l'absence d'induction, répondre sensible à spiramycine, lincomycine ou clindamycine. En présence d'induction, répondre résistante à spiramycine, lincomycine ou clindamycine.

Les souches étaient caractérisées sensibles à la tétracycline, l'érythromycine et la lincomycine lorsque leur diamètre d'inhibition était supérieur ou égal respectivement à 23 mm, 26 mm et 21 mm [309].

*Considérant qu'il n'existe pas de résistances acquises aux bêtalactamines et aux glycopeptides pour *S. agalactiae*, seules les gènes de résistance à l'érythromycine et la tétracycline ont été testés pour chaque souche.

➤ **Multiexperiment Viewer (MeV)**

Les résultats de l'antibiogramme et le support génétique lié à cette résistance sont interprétés avec le logiciel MeV (<http://www.tm4.org/mev.html>). Les souches résistantes, intermédiaires et sensibles sont remplacées par 1, 0 et -1 respectivement par le MEV.

Le MeV génère des présentations informatives et interdépendantes de données d'expression et d'annotation des expériences simples ou multiples.

4.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test

Le principe de la CMI par E-test est basé sur la combinaison des deux concepts: dilution et diffusion. Le système E-test consiste en une bande en plastique, non poreuse, calibrée par un gradient pré-établi de concentration d'antibiotiques, couvrant 15 dilutions pour déterminer la CMI en µg/ml d'une souche testée en milieu gélosé.

Le gradient couvre une gamme de concentrations allant de 0,016 à 256 µg/ml ou 0,002 à 32 µg/ml selon l'antibiotique. L'inoculum a été préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues d'une culture pure de 18 à 24 heures, dans de l'eau physiologique. La suspension a été calibrée à l'échelle 0.5 Mac Farland. L'ensemencement a été effectué par écouvillonnage sur la gélose Muller Hinton. Lorsqu'une bandelette E-test est appliquée sur une boîte de gélose ensemencée, l'antibiotique est immédiatement libéré de la surface du support et se dépose sur la surface de la gélose.

Un gradient continu est exponentiel de concentrations en antibiotique se crée juste en dessous du support. Après 18 à 24 heures d'incubation, ce qui rend la croissance bactérienne visible. Une ellipse d'inhibition symétrique, axée sur le support, se forme. Les bords de l'ellipse d'inhibition indiquent la valeur de CMI, exprimée en µg/ml.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'érythromycine et la clindamycine ont été déterminées en utilisant la méthode E-test (BioMérieux, France).

5. Analyse Moléculaire

5.1. Extraction d'ADN à partir des cultures bactériennes

L'extraction de l'ADN génomique de tous les isolats a été réalisée en utilisant le kit de tissus EZ1® ADN (Qiagen, Courtaboeuf, France) avec l'extracteur EZ1 avancée XL et la carte de bactéries d'ADN (Qiagen) selon les instructions du fabricant (**Figures 20 et 21**).

➤ Méthode

- Pipeter 20 µl de Protéase QIAGEN (ou la protéinase K) est le mettre dans un tube à Eppendorf de 1.5 ml.
- Ajouter 180 µl d'échantillon (suspension bactérienne) dans le tube Eppendorf de 1,5 ml.
- Ajouter 180 µl de Buffer AL (tampon) à l'échantillon.
- Mixer (vortex) pendant 15 s. afin d'assurer une lyse efficace. Il est essentiel que l'échantillon et le Buffer AL soient bien mélangés pour obtenir une solution homogène.
- Incuber ce mélange pendant 30 min à 70°C.

➤ Procédure d'extraction

- Homogénéiser les cartouches de réactifs avant de les introduire dans les rails du support.
- Suivre les instructions données par l'appareil.
- Volume de l'échantillon : 200µl.
Volume d'élution : 50µl, 100µl ou 200µl
- S'assurer que chaque élément (tubes ou tips) est correctement positionné.
- Pour les solides : réaliser une lyse externe
 - 180µl d'échantillon liquide ou un « morceau »
 - 180µl Tampon G2
 - 20µl PK (Proteinase K)
 - 2 h ou overnight à 56°C
- Transférer 200µl dans un tube échantillon (Fond plat) (**Figures 4 et 5**).

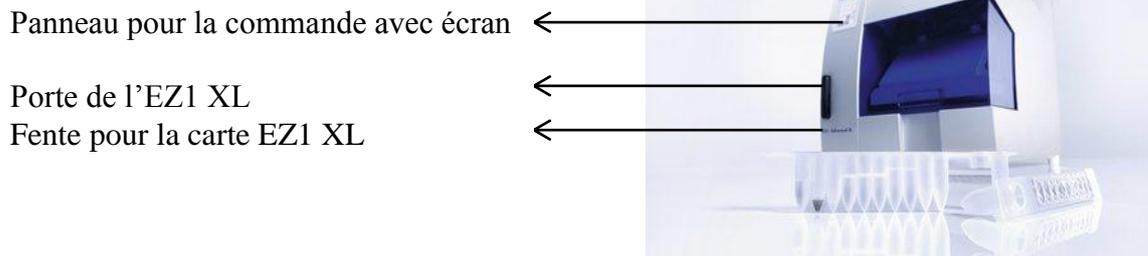


Figure 20: Extracteur EZ1 XL.

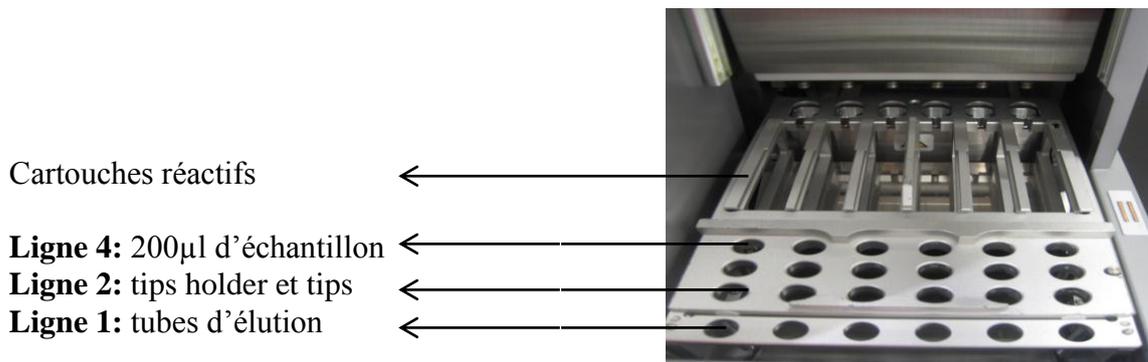


Figure 21: Procédure d'extraction par EZ1.

5.2. Préparation des amorces (primers)

- centrifugation short speed des tubes (3 secondes).
- ajouter le même volume indiqué dans le tube en Nano-Mole en µl d'eau stérile.
- laissez reposer le tube pendant 15 minutes pour permettre à l'ADN de précipiter.
- prélever 5µl de cette suspension et les déposer dans un autre tube contenant 495µl d'eau stérile.
- homogénéisation du mélange au vortex.
- conservation à -20°C.

5.3. Polymérase Chain Réaction (PCR) standard

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour se faire, une série de réaction permettant la réplification d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

Pour avoir une répllication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes. (i) Il faut dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin; (ii) borner et amorcer la répllication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques; (iii) réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire. A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin.

➤ **Matériel**

-Plaque de PCR (BioRad).

-Thermocycleur (Labnet International Multigene Gradient Optimax Thermal Cycler Tc29600-G 1002066).

-Mélange réactionnel

➤ **Protocole d'une PCR standard/Principe**

Le protocole utilisé pour effectuer une PCR standard est le suivant: dans une plaque BioRad on dépose 25 µl du mélange réactionnel (décrit dans le **tableau 7** ci-dessous) dans chaque puits, cette dernière est introduite par la suite dans le thermocycleur.

Tableau 7: Composition des mélanges réactionnels pour les PCR standards.

Mix PCR pour une réaction	Quantité PCR standard
Quantitect Probe PCR Master Mix	12,5 µl
Amorce Forward	0.5 µl
Amorce Reverse	0.5 µl
H2O physiologique	6,5 µl
ADN à amplifier	5 µl
Volume total	25 µl

5.4. Support génétique de la résistance

Devant toute souche résistante à l'érythromycine et à la tétracycline, une PCR standard a été réalisé pour détecter le support génétique responsable de cette résistance.

Les gènes de résistance aux MLS *erm(A)*, *erm(B)* et *mef A/E* ainsi que les gènes de résistance à la tétracycline *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(L)* et *tet(K)*, ont été amplifier par PCR en utilisant des amorces spécifiques illustré dans le **tableau 8** [310].

A chaque réaction de PCR standard nous avons utilisé un ADN d'une souche produisant le gène à tester comme témoin positif.

➤ PCR d'amplification

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un thermocycleur ABI 2700 (Applied Biosystems). Une réaction de PCR classique comprend une étape de dénaturation initiale de l'ADN double brin pendant 15 min à 95 C°. Cette étape est suivie de 35 cycles d'amplification de l'ADN d'intérêt avec 30 secondes à 95 C° (dénaturations), 50 secondes à 62 C° (appariement des amorces, température variable selon le T_m des amorces) et 1 min 30 secondes à 72 C° (élongation, temps variable selon la taille du fragment à amplifier). Une étape finale de 7 min à 72 C° permet de terminer la synthèse des brins inachevés (**Tab. 8**).

Tableau 8: Liste des oligonucléotides utilisés dans ce travail, d'après [310].

Gène(s)	Séquence primer (5'-3')	Taille de l'amplicon (bp)
<i>erm(A)</i>	CCCGAAAAATACGCAAAATTTCAT ¹	590
	CCCTGTTTACCCATTTATAAACG ²	
<i>erm(B)</i>	TGGTATTCCAAATGCGTAATG	745
	CTGTGGTATGGCGGGTAAGT	
<i>mef(A/E)</i>	CAATATGGGCAGGGCAAG	317
	AAGCTGTTCCAATGCTACGG	
<i>tet(M)</i>	GTGGACAAAGGTACAACGAG	406
	CGGTAAAGTTCGTCACACAC	
<i>tet(O)</i>	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC	515
	TCCCACTGTTCCATATCGTCA	
<i>tet(K)</i>	GATCAATTGTAGCTTTAGGTGAAGG	155
	TTTTGTTGATTTACCAGGTACCATT	
<i>tet(L)</i>	TGGTGGAAATGATAGCCCATT	229
	CAGGAATGACAGCACGCTAA	

¹ Forward (direct), ² Reverse (inverse).

➤ Electrophorèse sur gel d'agarose

Pour vérifier la présence d'une bonne amplification du gène cible, les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1,5% dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE (TRIS, Borate, EDTA) à 0,5%. La migration se fait pendant 30 minutes sous un voltage de 135V.

➤ **Protocole de préparation du gel d'agarose**

- Dans une bouteille ou flacon en verre stérile, mélanger 6g de poudre d'agarose avec 400ml du Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 0.5 X.
- Faire fondre le mélange au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un mélange parfaitement transparent.
- Laisser refroidir.
- Ajouter la Solution de bromure d'éthidium BET (3 fois 31.5 µl pour 50 ml) et mélanger bien.
- Couler le gel dans le support du gel après avoir mis les peignes.
- Laisser refroidir jusqu'à solidification de gel.

➤ **Electrophorèse des produits d'amplification**

- Retirer les peignes après polymérisation du gel.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Remplir la cuve d'électrophorèse avec le tampon TBE 0.5X (le gel doit être totalement émergé).
- Déposer 4µl d'ADN marqueur de poids moléculaire [100 Base-Paire Ladder (Gibco-BRL, 15 628-019)] dans le premier puits.
- Mélanger 4 µl du produit amplifié (ADN) avec une goutte du Blue Juice
- Déposer le produit amplifié avec un témoin négatif et un témoin positif
- Fermer le couvercle de la cuve. Brancher la cuve au générateur. Mettre l'alimentation sous tension à 135V et régler la durée de migration (environ 30 min).
- Une fois la migration finie, Placer le gel dans le système d'imagerie à UV pour la visualisation des bandes.

➤ **Révélation des bandes d'ADN aux rayons UV**

Le gel d'agarose est ensuite exposé sous rayons ultra-violet pour visualiser les bandes d'ADN. La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié a été comparée avec le marqueur de poids moléculaire (100 paires de base) en utilisant le témoin.

5.5. Séquençage

Le séquençage a été réalisé selon la méthode de Sanger modifiée [311], en utilisant le kit Big Dye Terminator® V1,1 kit de séquençage de cycle (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) et le séquenceur Automate ABI PRISM 3130 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA), selon les recommandations du constructeur.

Cette technique est une PCR abortive au cours de laquelle sont introduits des acides nucléiques modifiés (ddNTP) dont l'incorporation aléatoire va bloquer la réaction de polymérisation; les quatre bases sont marquées par un fluorochrome différent. La taille des fragments abortifs obtenus est déterminée à l'aide d'un séquenceur de leurs tailles comme une électrophorèse classique, mais il présente l'avantage d'être couplé de succession des acides nucléiques marqués permet l'obtention de la séquence du fragment d'ADN étudié.

Une PCR Big Dye est réalisée en utilisant le protocole décrit dans le tableau 9. Les produits de cette réaction sont ensuite purifiés en utilisant du séphadex. Cette méthode est basée sur la purification par chromatographie d'exclusion pour piéger des ddNTP libres en excès qui sont de bas poids moléculaire sur une colonne Sephadex. Les produits purifiés sont séquencés en utilisant le séquenceur Automate ABI 3130.

Les séquences sont ensuite analysées avec le logiciel Codon Code Aligner. La séquence ainsi corrigée est comparée avec celle des séquences existantes dans la base de données GenBank en utilisant le programme BLAST (BlastN) disponible au Centre national pour le site Web d'information et Biotechnologie ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) , BLAST) et la base de données ARG-ANNOT (résistance aux antibiotiques Gene-annotation), un nouvel outil bioinformatique qui a été créé afin de détecter de nouvelles résistances aux antibiotiques existants et putatif (AR) des gènes dans les génomes bactériens [312].

➤ **Purification**

- Matériel

- Plaquette à filtre
- Eau Ultra-Pure (UP)
- Pompe sous vide
- Agitateur secoueur de microplaques

- Méthode

Après électrophorèse, on vérifie sur le système d'imagerie à UV, la présence des bandes ADN.

On ajoute au produit PCR 100 µl d'eau ultra pure, puis on transfère le tout dans une plaquette à filtre pour faire la première purification. Ensuite, on dépose cette plaquette à filtre sur une pompe sous vide pendant 20 min (filtration sous vide). Enfin, on ajoute 50 µl d'eau ultra pure et agite pendant 20 min sur un agitateur.

Le produit est purifié et prêt pour la PCR Big Dye.

➤ PCR BigDay

- Matériel

-Plaqué pour Thermocycleur

-Thermocycleur (Labnet International Multigene Gradient Optimax Thermal Cycler)

-Mélange réactionnel (Tableau 9)

- Méthode

Cette PCR consiste à amplifier le Forward et le Reverse séparément pour les séquencer par la suite. Le protocole utilisé pour effectuer une PCR Big Dye est le suivant : dans une plaqué de thermocycleur Bio-rad on dépose 20 µl du mélange réactionnel (décrit dans le **tableau 9** ci-dessous) dans chaque puits.

Tableau 9: Composition du mélange réactionnel pour la PCR Big Dye.

Composants pour Forward	Composants pour Reverse	Quantité PCR BigDye
Buffer	Buffer	3 µl
Mix Big Dye	Mix Big Dye	2 µl
Amorce F	Amorce R	1 µl
ADN à amplifier	ADN à amplifier	4 µl
H2O UP	H2O UP	10 µl
Volume total	Volume total	20 µl

Buffer; Tampon BDV1

Pour chaque amorce, on fait 2 mélanges réactionnels séparés, un pour le Forward et l'autre pour le Reverse, exécuté selon le programme porté dans le **tableau 10**.

Tableau 10: Programme de l'amplification de la PCR Big Dye.

Température	96°C	96°C	50°C	60°C	4°C
Temps	5 min	10 sec	5sec	5mn	∞

➤ Purification par Sephadex

- Matériel

-Plaqué a filtre

-Plaqué pour séquençage

-La poudre Sephadex

-Eau Ultra-pure (UP)

-Centrifugeuse

- Méthode

Dans une plaque à filtre spécifique à la purification par Sephadex G 50 de la marque sigma, on met la poudre de Sephadex dans les puits de la plaque auxquels on ajoute 300 µl d'eau ultra pure et laisser reposer 2 à 3 heures.

Après avoir mis la plaque à filtre au-dessous d'une plaque contenant des puits, on réalise une centrifugation à 12000 rpm pendant 10 min à 10°C pour récupérer l'excédent d'eau dans les puits qui sera jeté.

On met par la suite, les produits PCR Big Dye dans la plaque à filtre qui sera placée sur une deuxième plaque à puits pour collecter après centrifugation (à 12000 rpm pendant 10min à 10°C) les produits PCR purifiés. Cette plaque est ensuite recouverte par un tapis de protection.

Le produit récupéré est alors prêt à être séquencer.

➤ Séquençage

Sur la machine du séquenceur Automate ABI PRISM 3130, remplir les fiches pour séquençage sur le logiciel. Mettre la plaque pour le séquençage sur le support et la déposer dans le séquenceur **Automate ABI 3130**. Lancer le séquençage.

➤ Analyse des séquences

Les séquences brutes obtenues par le séquençage ont été analysées et corrigées par le logiciel codon code Aligner. Les séquences obtenues sont soumises via Internet à l'aide du logiciel Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), pour comparaison avec les séquences homologues contenues dans la banque informatique internationale dénommée «GenBank ». Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité de la souche à identifier avec les espèces les plus proches [313]. Ensuite déterminer leur affiliation phylogénétique. Après avoir aligné les séquences, les arbres phylogénétiques ont été construits avec le programme Mega4 selon la Méthode du « Neighbor-joining » [314].

5.6. Sérotypage moléculaire

➤ Principe

Le sérotypage moléculaire a été réalisé par combinaison de deux méthode;

- PCR multiplex selon la méthode décrite par Poyart *et al.*, [143], pour identifier les types capsulaires; Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII et VIII. Il s'agit d'une technique de PCR multiplex ciblant différents gènes impliqués dans la synthèse du polysaccharide capsulaire de I à VIII en deux temps [58].

- PCR multiplex selon la méthode décrite par Imperi et *al.*, [16], pour identifier le type capsulaire IX.

Ces techniques ont été modifiées par notre laboratoire en utilisant des PCR monoplexe en combinant les deux techniques (dont le but de minimiser les faux positifs).

Les amorces utilisées dans cette étude sont mentionnées dans le tableau ci-dessous (**Tab. 11**).

Les amorces *cps-F* (IX) et *cps-R* (IX) ciblent une partie d'un gène conservé chez streptocoque du groupe B (*cps*): les amplicons sont identiques pour tous les sérotypes et servent de contrôle interne à la réaction. Les autres amorces ciblent des régions variables. Les amplicons ont été identifiés après migration en gel d'agarose [16;41].

Tableau 11: Liste des oligonucléotides utilisés pour le sérotypage [16;143].

Gène(s)	Séquence primer (5'-3')	Cible génique (s)	Taille de l'amplicon (bp)
Ia-F	GGTCAGACTGGATTAATGGTATGC	<i>cps1aH</i>	521 and 1,826
Ia-R	GTAGAAATAGCCTATATACGTTGAATGC	<i>cps1aH</i>	
Ib-F	TAAACGAGAATGGAATATCACAAACC	<i>cps1bJ</i>	770
Ib-R	GAATTAACCTCAATCCCTAAACAATATCG	<i>cps1bK</i>	
II-F	GCTTCAGTAAGTATTGTAAGACGATAG	<i>cps2K</i>	397
II-R	TTCTCTAGGAAATCAAATAATTCTATAGGG	<i>cps2K</i>	
III-F	TCCGTACTACAACAGACTCATCC	<i>cps1a/2/3I</i>	1,826
III-R	AGTAACCGTCCATACATTCTATAAGC	<i>cps1a/2/3I</i>	
IV-F	GGTGGTAATCCTAAGAGTGAAGTGT	<i>cps4N</i>	578
IV-R	CCTCCCAATTCGTCCATAATGGT	<i>cps4N</i>	
V-F	GAGGCCAATCAGTTGCACGTAA	<i>cps5O</i>	701
V-R	AACCTTCTCCTTCACACTAATCCT	<i>cps5O</i>	
VI-F	GGACTTGAGATGGCAGAAGGTGAA	<i>cps6I</i>	487
VI-R	CTGTCCGACTATCCTGATGAATCTC	<i>cps6I</i>	
VII-F	CCTGGAGAGAACAATGTCCAGAT	<i>cps7M</i>	371
VII-R	GCTGGTCGTGATTTCTACACA	<i>cps7M</i>	

VIII-F	AGGTCAACCACTATATAGCGA	cps8J	282
VIII-R	TCTTCAAATTCGCTGACTT	cps8J	
IX-F	CAATCCTAAGTATTTTCGGTTCATT	cpsL	688
	ACATGAACAGCAGTTCAACCGT	cpsG	272
	CTGTAATTGGAGGAATGTGGATCG	cpsI	229
IX-R	TAGGAACATGTTTCATTAACATAGC.	cpsL	688
	ATGCTCTCCAAACTGTTCTTGT	cpsG	272
	AATCATCTTCATAATTTATCTCCCATT	cpsI	229

➤ PCR d'amplification

Dix polysaccharides capsulaires (CPS) distincts ont été décrits. Les CPS est couramment utilisé pour le typage des souches. Le programme de PCR comprenait un cycle de dénaturation pendant 15 minutes à 95 C°, suivie de 40 cycles de dénaturation pendant 30 secondes à 95 C°, l'hybridation des amorces à 50 à 50 C°/60 C°, et une extension à 72C° pendant 1 minute, et une extension finale pendant 7 min à 72 C°.

➤ Révélation par électrophorèse

La révélation des amplicons a été réalisée par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% en tampon TBE (TRIS, Borate, EDTA) à 0,5%. Le gel a été mis à migrer dans du tampon TBE pendant 30 minutes à 135 Volt. Les résultats ont été lus par transillumination et mettent en évidence des bandes de différente taille en fonction du sérotype.

5.7. MultiLocus Sequence Typing

Le principe de MLST repose sur le séquençage de 7 loci correspondant à 7 gènes de ménage (housekeeping genes) connus chez *S. agalactiae*, appelés: *adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK*, et *tkl*. Pour chaque locus, un numéro d'allèle différent a été affecté à chaque séquence nucléotidique distincte. Cette numérotation a été établie par ordre d'identification des variants nucléotidiques [19]. Toute mutation dans la séquence nucléotidique, silencieuse ou non, a défini ainsi un nouvel allèle dont le numéro d'identification est déposé sur le site MLST de *S. agalactiae* (<http://pubmlst.org/sagalactiae/>). La combinaison de numéros correspondant aux allèles des 7 loci étudiés définit un profil allélique ou «Séquence Type» (ST). Pour la détermination du profil allélique, l'ordre d'affectation des numéros aux 7 loci a été fixé arbitrairement. La numérotation des profils alléliques a également été établie par ordre

d'identification de ceux-ci (ST-1, ST-2, etc.). La base des données référençant les profils alléliques déposés est accessible en ligne (<http://pubmlst.org/sagalactiae/>).

➤ Principe de la méthode utilisée

Sept gènes de ménage mentionné dans les **tableaux 12 et 13** ont été amplifiés par PCR puis séquencés. La combinaison d'allèles de ces sept loci constitue un profil allélique ou Séquence Type (ST) [19].

Tableau 12: Gènes de ménage pour la technique MLST [19].

Locus	Fonction du gène	Taille du fragment séquencé (bp)	% G + C	Position dans le génome du SGB (bp)
<i>adhP</i>	Alcohol dehydrogenase	498	43.1	72286
<i>pheS</i>	Phenylalanyl tRNA synthetase	501	37.1	912817
<i>atr</i>	Amino acid transporter	501	36.9	560085
<i>glnA</i>	Glutamine synthetase	498	35.7	1868862
<i>sdhA</i>	Serine dehydratase	519	41.4	2179923
<i>glcK</i>	Glucose kinase	459	42.6	538770
<i>tkt</i>	Transketolase	480	38.9	287111

➤ PCR d'amplification

Le programme de PCR comprenait un cycle de dénaturation pendant 15 minutes à 95 C°, suivie de 40 cycles de dénaturation pendant 30 secondes à 95 C°, un anelage d'amorce de 50 à 50 C°, et extension à 72 C° pendant 1 minute, et une extension finale de 7 min à 72 C°.

Tableau 13: Amorces utilisé pour la technique MLST [19].

Nom et séquence de l'amorce				
Gène(s)	Locus	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')	Taille de l'amplicon (pb)
<i>adhP</i>	amplification	GTTGGTCATGGTGAAGCACT	ACTGTACCTCCAGCACGAAC	672
<i>adhP</i>	séquencage	GGTGTGTGCCATACTGATTT	ACAGCAGTCACAACCACTCC	498
<i>pheS</i>	amplification	GATTAAGGAGTAGTGGCACG	TTGAGATCGCCCATTGAAAT	723
<i>pheS</i>	séquencage	ATATCAACTCAAGAAAAGCT	TGATGGAATTGATGGCTATG	501

<i>atr</i>	amplification	CGATTCTCTCAGCTTTGTTA	AAGAAATCTCTTGTGCGGAT	627
<i>atr</i>	séquençage	ATGGTTGAGCCAATTATTTTC	CCTTGCTCAACAATAATGCC	501
<i>glnA</i>	amplification	CCGGCTACAGATGAACAATT	CTGATAATTGCCATTCCACG	589
<i>glnA</i>	séquençage	AATAAAGCAATGTTTGATGG	GCATTGTTCCCTTCATTATC	498
<i>sdhA</i>	amplification	AGAGCAAGCTAATAGCCAAC	ATATCAGCAGCAACAAGTGC	646
<i>sdhA</i>	séquençage	AACATAGCAGAGCTCATGAT	GGGACTTCAACTAAACCTGC	519
<i>glcK</i>	amplification	CTCGGAGGAACGACCATTAA	CTTGTAACAGTATCACCGTT	607
<i>glcK</i>	séquençage	GGTATCTTGACGCTTGAGGG	ATCGCTGCTTTAATGGCAGA	459
<i>tkt</i>	amplification	CCAGGCTTTGATTTAGTTGA	AATAGCTTGTTGGCTTGAAA	859
<i>tkt</i>	séquençage	ACACTTCATGGTGATGGTTG	TGACCTAGGTCATGAGCTTT	480

➤ Révélation par électrophorèse et purification des amplicons

La vérification de l'amplification des allèles a été effectuée grâce à une migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1.5% (additionné de Blue Juice) pendant une heure dans un tampon TBE (TRIS, Borate, EDTA) à 0,5%. Les fragments amplifiés ont ensuite été visualisés par transillumination UV. Les fragments obtenus ont des tailles allant de 589 à 859 paires de bases en fonction des gènes (**Fig. 22**).



Figure 22: Schéma représentant les bandes électrophorétiques des sept gènes de ménage [41].

➤ Lecture des séquences

Les séquences nucléotidiques ont été lues avec le logiciel Codon Code Aligner qui est un logiciel d'analyse de séquence permettant d'importer, de visualiser, d'éditer et d'exporter des données de séquence.

Les nucléotides lus avec certitude sont représentés en noir, alors que ceux avec un doute sont représentés en rouge (**Fig. 23**). La séquence peut ensuite être comparée à la base de données PubMLST.



Figure 23: Capture d'écran de l'onglet « Analyzed » du logiciel CodonCode Aligner.

► Détermination des allèles et profils

La détermination des allèles et des profils a été réalisée sur le site PubMLST (<http://pubmlst.org/sagalactiae>) qui héberge les bases de données MLST et des outils d'analyse accessibles au public permettant, entre autre, de déterminer les allèles et les STs d'après les séquences d'ADN.

Pour la détermination des allèles, le résultat de la recherche donne le numéro de l'allèle de la base de données possédant la séquence la plus proche de celle analysée, ainsi que les différences entre les deux (mismatches et gaps), s'il y en a.

Une fois tous les allèles déterminés pour une souche, on peut soumettre le profil. Le résultat de la recherche donne le numéro du Séquence Type de la base de données avec le plus de correspondance avec le profil analysé.

5.8. Détermination des complexes clonaux

Pour la détermination des complexes clonaux, nous avons utilisé le logiciel eBURST v3 (<http://eburst.mlst.net/>) qui est une application permettant d'émettre une hypothèse sur la façon dont chaque complexe clonal a pu émerger et se diversifier. L'algorithme identifie des groupes de STs et essaye d'identifier le génotype fondateur de chaque groupe [149].

Un groupe est composé de STs ayant un niveau de similitude dans leur profil allélique et pouvant partager un même « fondateur ». Un groupe est considéré comme un complexe clonal si tous les membres possèdent des allèles identiques pour 6 des 7 loci avec au moins un autre membre du groupe. Le principal fondateur d'un groupe est défini comme le ST qui possède 6

loci sur 7 identiques avec le plus grand nombre d'autres STs. Dans de nombreux cas, le fondateur primaire est aussi le ST le plus répandu au sein du groupe.

Les résultats de l'analyse comprennent, le nombre total de groupes ou complexes clonaux, pour chaque groupe: le nombre d'isolats et de ST dans le groupe et le fondateur principal ainsi que la liste de tous les STs du groupe, avec le nombre d'isolats pour chaque ST, le nombre de descendants directs (SLV) et indirects (DLV et TLV). La distance moyenne entre ST d'un même groupe est également représentée. Les ST qui partagent moins de six allèles avec les autres STs sont indiqués comme ST uniques ou singletons.

Dans le diagramme (**Fig. 24**), chaque groupe est représenté avec le fondateur principal en bleu et les STs fondateurs de sous-groupe en jaune. La surface du cercle est proportionnelle à la prévalence du ST dans la population étudiée. Tous les descendants des fondateurs sont représentés disposés en cercle.

Tous les STs reliés entre eux possèdent les mêmes allèles pour six des sept loci avec au moins un autre isolat dans le groupe et sont donc considérés comme appartenant au même complexe clonal. La population entière peut être représentée sur un diagramme unique, appelé «Instantané de la population» [41;149].

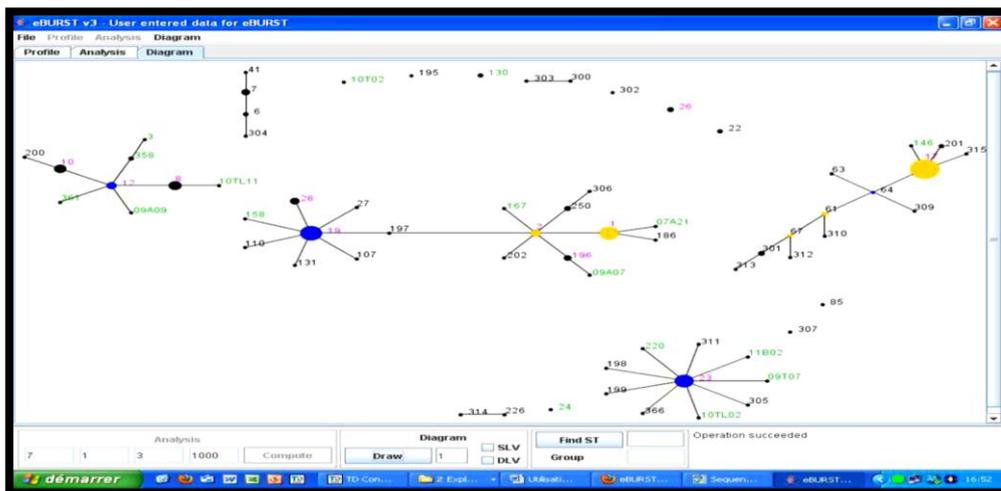


Figure 24: Capture d'écran de la fenêtre « Diagram » du logiciel eBURST [41].

5.9. Réalisation des arbres phylogénétiques

Les arbres phylogénétiques ont pour but de comprendre les relations de parenté. Ils ont été réalisés avec les logiciels MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 5) ou Neighbour Joining (Neighbor Joining–NJ) qui sont des méthodes dites de distance, c'est-à-dire basées sur les similarités entre paires de séquences.

➤ Méthode utilisant les séquences nucléotides

MEGA est un logiciel qui permet la réalisation d'arbres phylogénétiques. Le format des données à charger est un supergène obtenu par concatémérisation des sept gènes de ménage dans un ordre bien précis (Exp; *adhP* –*pheS* –*atr*–*glnA*–*sdhA*–*glcK* et *tkl*), mis au format adéquat pour être analysé avec le logiciel. Une fois les données mises en forme et chargées, les arbres phylogénétiques réalisés peuvent être visualisés et modifiés (**Fig. 25**).

La souche; *S. agalactiae* **2603 ST-110** été prise comme une souche de référence dans la genèse d'un arbre phylogénétique.

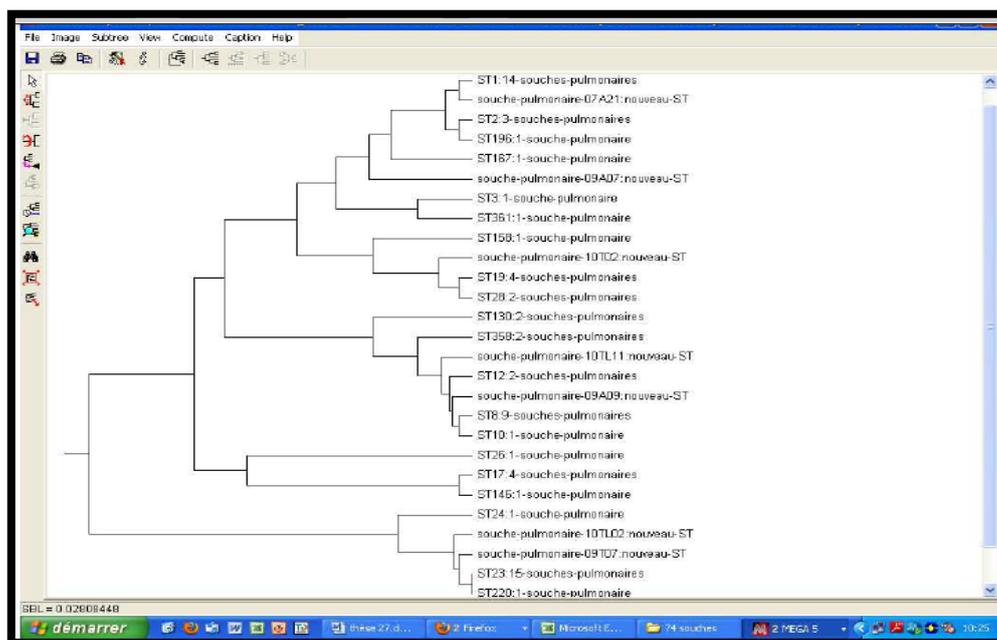


Figure 25: Capture d'écran de la fenêtre de visualisation des arbres phylogénétiques du logiciel MEGA [41].

5.10. Conservation des souches

Les souches sont conservées dans un premier temps à -70°C dans un mélange LB-Glycérol 40%. Après, la conservation a été réalisée en milieu cryo-billes (réf. AEB400100, AES Laboratoire, Combourg, France) à -80°C.

5.11. Analyses statistiques

La saisie des données et les représentations graphiques ont été réalisées à partir du logiciel "Excel". Le test exact de Fisher (test du Chi²) a été utilisé pour évaluer les différences dans la répartition des isolats. L'analyse statistique a été exécutée en utilisant la version 7 de logiciel

Matériel et Méthodes

d'Epi-info selon les recommandations de CDC disponible sur le site (http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm), une valeur de p de ≤ 0.05 a été considérée comme significative.



Résultats



Partie 3: Résultats

Notre étude a porté sur 93 souches de *Streptococcus agalactiae* collectées dans une période entre Janvier 2011 et Février 2012 auprès de 494 femmes enceintes dans deux cabinets de gynécologie à la ville de Guelma, Algérie et d'Octobre 2013 jusqu'au Janvier 2014, au laboratoire de Microbiologie de l' Hôpital de la Timone à Marseille, France à partir de différents échantillons (prélèvement vaginal, d'urine et d'hémoculture).

1. Analyse préliminaire

1.1. Portage de *S.agalactiae*

Le streptocoque du groupe B (SGB) ou *Streptococcus agalactiae* est une des principales bactéries responsables d'infections néonatales graves. Nous avons évalué de manière prospective la colonisation vaginale par cette bactérie dans notre région et essayé de dégager les facteurs de risque associés à ce portage ainsi que les particularités des souches isolées.

1.2. Fréquence de portage

Une recherche de SGB a été réalisée chez 494 femmes enceintes au cours des trois trimestres de la grossesse par un prélèvement vaginal et des renseignements concernant l'étude des facteurs de risque ont été consignés sur une fiche de prélèvement. Ces femmes ont été recrutées sur des critères d'inclusion et d'exclusion par un échantillonnage consécutif non exhaustif et non probabiliste.

Parmi les 494 parturientes dépistées, 44 avaient un prélèvement positif au SGB ce qui correspond à un taux global de portage de 8.91% \approx 9%.

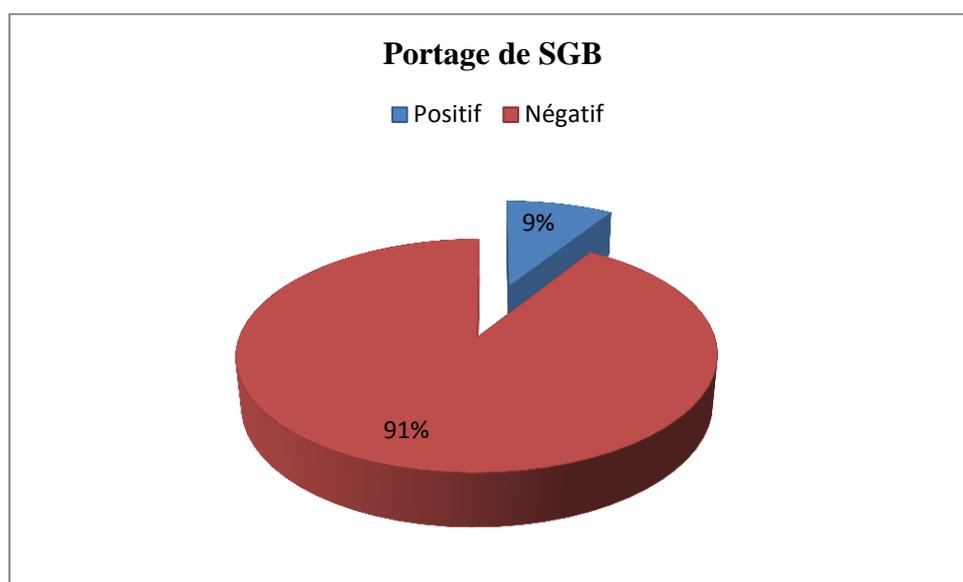


Figure 26: Fréquence globale du portage de SGB.

1.3. Analyse des données (Terrain)

1.3.1. Age gestationnel (trimestres de grossesse)

La majorité des parturientes incluent dans cette étude (217/494) étaient au troisième trimestre (soit 44%), alors que seulement 141 et 136 étaient respectivement aux premiers et deuxièmes trimestres (28.5 % et 27.5%) (**Fig. 27**).

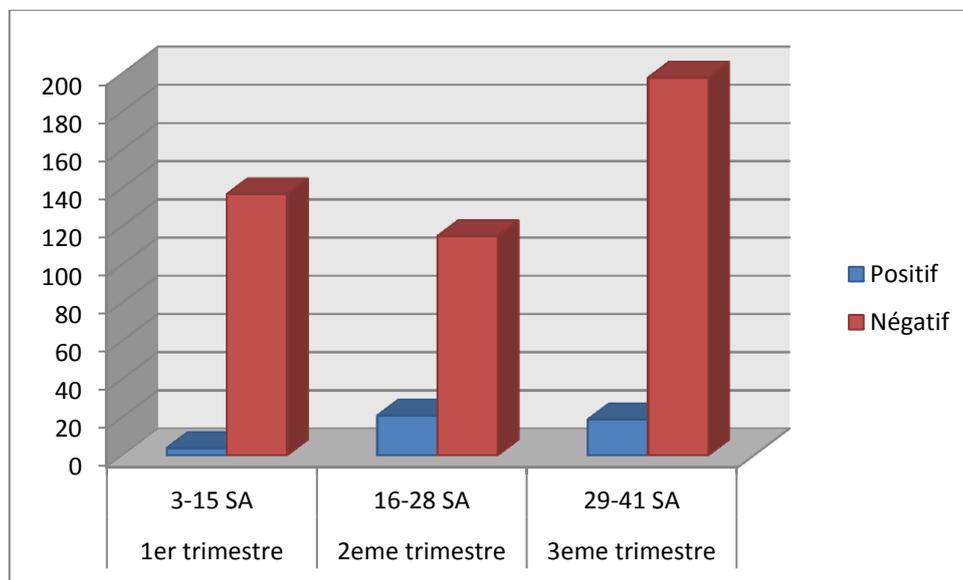


Figure 27: Fréquence du portage de SGB au cours des trois trimestres de la grossesse.

Le taux du portage de SGB est élevé au 2^{ème} trimestre de grossesse, entre 16-28 SA (21 patientes sur 136 soit 15.4%) par rapport aux deux autres trimestres. Au 3^{ème} trimestre, 19 sur 217 soit 8.7% des patientes étaient porteuses (entre 29-41SA) et seulement quatre patientes sur 141 (entre 3-15SA) soit 2,8% était porteuse au premier trimestre (**Fig. 28**).

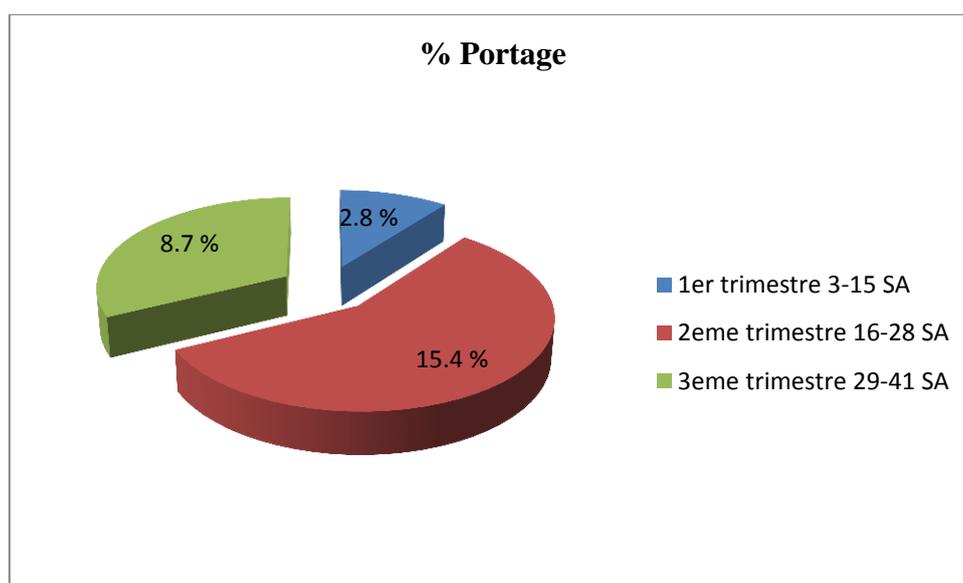


Figure 28: Répartition du portage de SGB au cours des trois trimestres de la grossesse.

A partir de ces données, on note que la distribution du portage de SGB par tranches d'âge gestationnel n'est pas en fonction de la taille des échantillons constituant les tranches.

En outre, l'évolution du portage de SGB au cours des trois trimestres de la grossesse est illustrée dans la Figure ci-dessous.

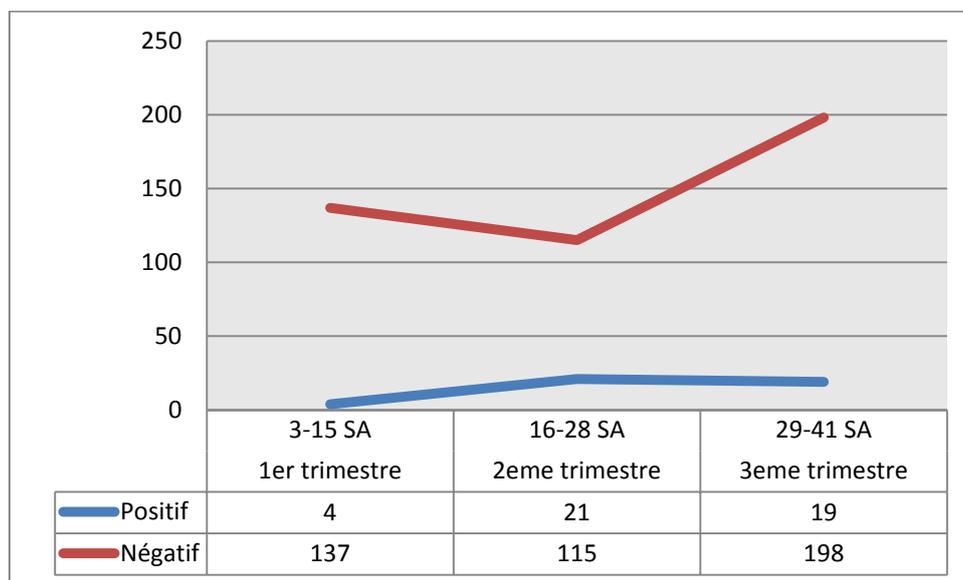


Figure 29: Evolution du portage de SGB au cours des trois trimestres de la grossesse.

L'analyse des résultats a dévoilé la présence d'une association significative entre le portage de SGB, le 1^{er} et le 2^{ème} trimestre de la grossesse, avec un p value < 0.05 (**0.0027** et **0.0016** respectivement).

➤ **Lo portage de SGB au cours du 3^{ème} trimestre de la grossesse (29 SA-41 SA)**

Le taux de portage au cours du 3^{ème} trimestre est de 8.7% (**Figs. 30** et **31**) dont 10.7 % inclut seulement la période du 34^{ème} jusqu'à 38^{ème} SA.

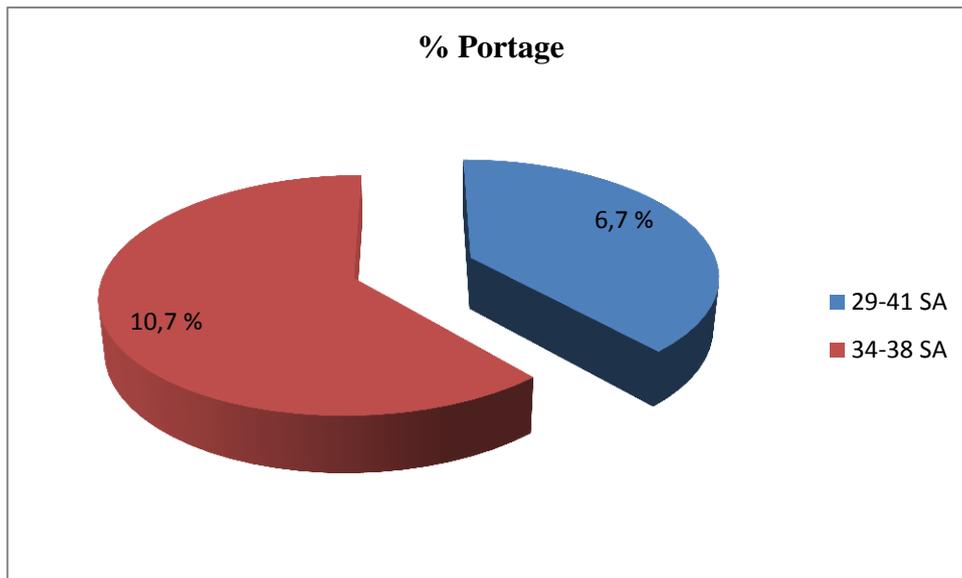


Figure 30: Répartition du portage de SGB au cours du 3^{ème} trimestre.

Le taux du portage de SGB est plus au moins élevé entre la 34^{ème} et la 38^{ème} SA (10.7%) par rapport au portage global du portage dévisagé dans toute la population (9%).

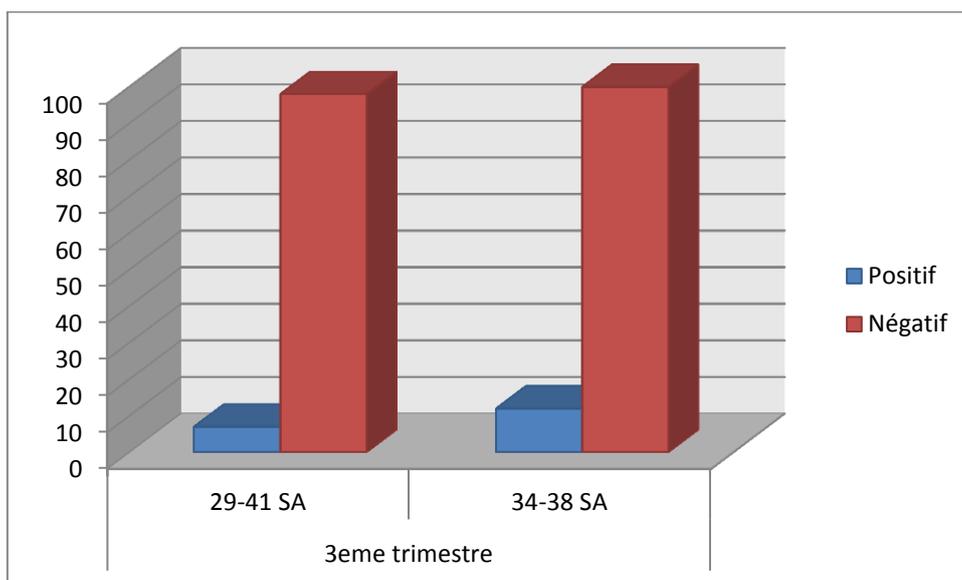


Figure 31: Taux du portage de SGB au cours du 3^{ème} trimestre.

La différence statistique entre les deux groupes en terme de portage (entre 34-38SA), n'est pas significative avec un p value >0.05 (p= 0.44).

***La distribution du portage de GSB en fonction du nombre de prélèvements (PV >1)**

Sur les 494 femmes enceintes dépistées, 89 (18%) femmes ont un prélèvement vaginal en plus, soit entre le 1^{er} et/ou le 2^{ème} et/ou le 3^{ème} trimestre de la grossesse (**Fig. 32**).

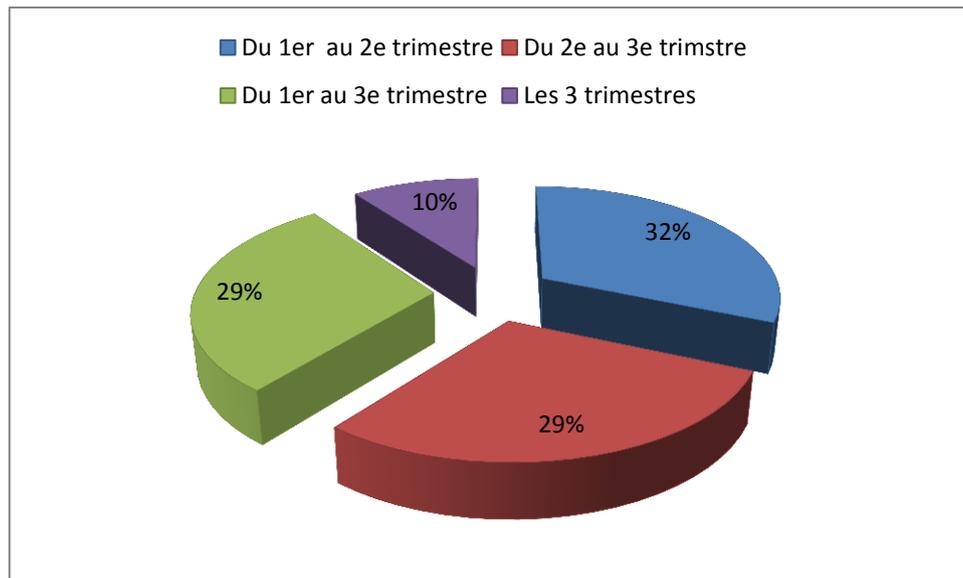


Figure 32: Distribution des patientes en fonction du nombre de prélèvements positifs par trimestres.

Sur les 89 parturientes, neuf (10.1%) présentent un seul portage de SGB où plus au cours des trois trimestres (**Tab. 14**).

Tableau 14: Evolution du portage de SGB au cours des trois trimestres en fonction du nombre de prélèvements.

Trimestres	1 ^{er} et 2 ^{ème} trimestres		2 ^{ème} et 3 ^{ème} trimestres		1 ^{er} et 3 ^{ème} trimestres		Les 3 trimestres		
	SGB+	SGB+	SGB+	SGB+	SGB+	SGB+	SGB+	SGB+	SGB+
Portage du SGB	1 seule femme		3 femmes		*		*		
	SGB+	SGB-	SGB+	SGB-	SGB+	SGB-	SGB-	SGB+	SGB-
	*		1 seule femme		1 seule femme		1 seule femme		
	SGB-	SGB+	SGB-	SGB+	SGB-	SGB+	Autres		
	*		2 femmes		*		*		

* absence de prélèvement

Note: Les résultats ci-dessus ne peuvent pas être extrapolés dû au faible nombre des patientes ayant un PV >1 au cours des deux où des trois trimestres de la grossesse.

1.3.2. Age

L'âge moyen des parturientes était de 28-35 ans (avec 19 ans pour la plus jeune et 41 ans pour la plus âgée). Toutes les tranches d'âges sont touchées par le SGB, avec des extrêmes d'âge variant entre moins de 25 ans et plus de 40 ans.

La tranche d'âge la plus touchée par le SGB dans notre étude est la population entre 26 et 30 ans (21 SGB/210 patientes, 10%) et la population plus-au-moins âgée, entre 31 et 35 ans (13 SGB/118 patientes; 11%) (**Fig.33**).

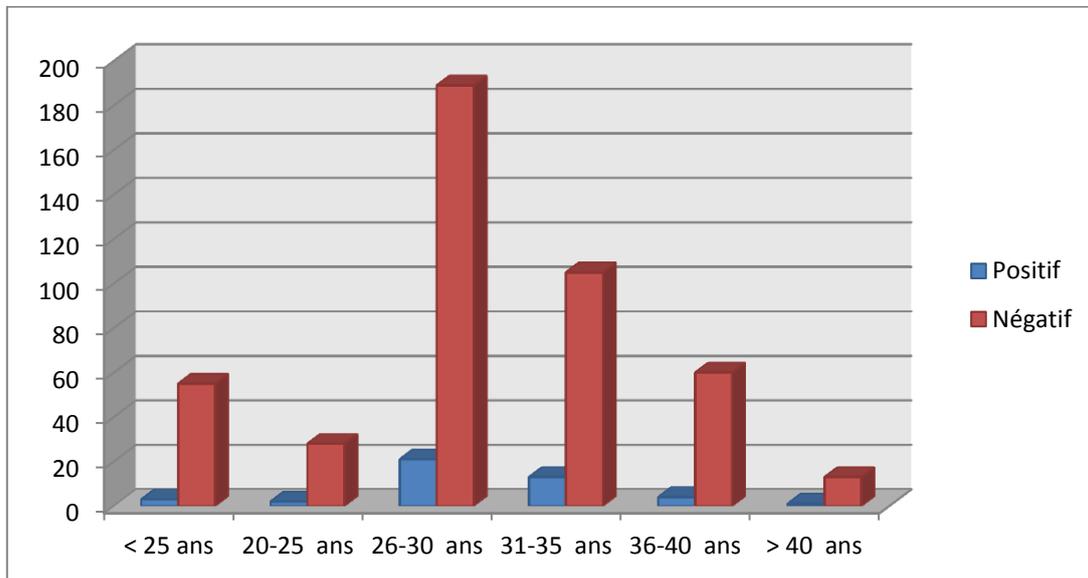


Figure 33: Répartition du portage de SGB en tranches d'âge.

La répartition en tranches d'âge en fonction des résultats des prélèvements (**Fig. 33**) montre une légère augmentation de patientes porteuses dans la tranche d'âge de 26 à 35 ans. Cette différence entre les groupes en terme d'âge, n'est pas significative ($p > 0.05$; $p = 0,46$ et 0.35 entre 26-30 ans et 31-35 ans respectivement).

1.3.3. Parité

La parité de notre population est répartie comme suit (**Fig. 34**);

- 31% de nullipares
- 57% de multipares (1-3)
- 12% de multipares (>4)

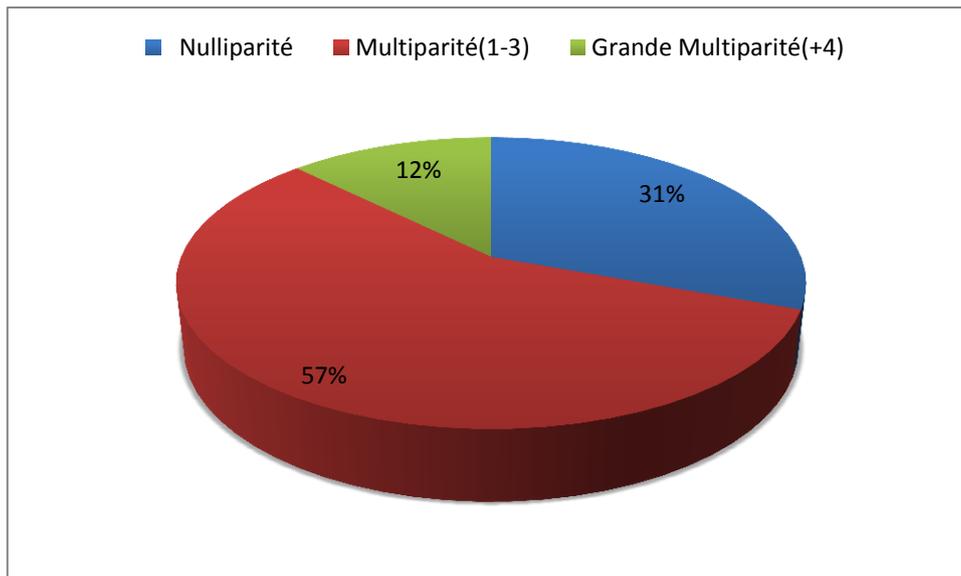


Figure 34: Distribution des patientes en fonction de la parité.

Le taux de portage de SGB en fonction de la parité est de (**Fig. 35**);

- 8.6% chez les nullipares (13 SGB/151 femmes);
- 9.2% chez les multipares (1-3) (26 SGB/281 femmes);
- 8% chez les multipares (>4) (5 SGB/62 femmes).

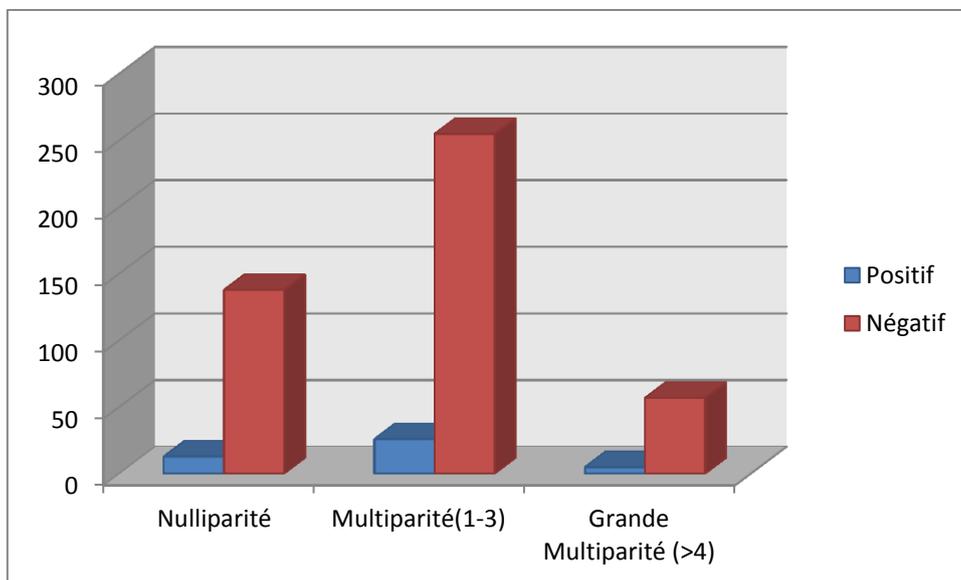


Figure 35: Parité selon les résultats positifs des prélèvements.

La différence entre les trois groupes, en terme de parité, n'est pas significative ($p > 0.05$; $p = 0.87, 0.75$ et 0.8 respectivement).

1.3.4. Niveau socio-économique (S-E) (incluant le niveau d'étude et les revenus financiers)

La distribution des patientes en fonction du niveau S-E est présenté comme suit (Fig. 36);

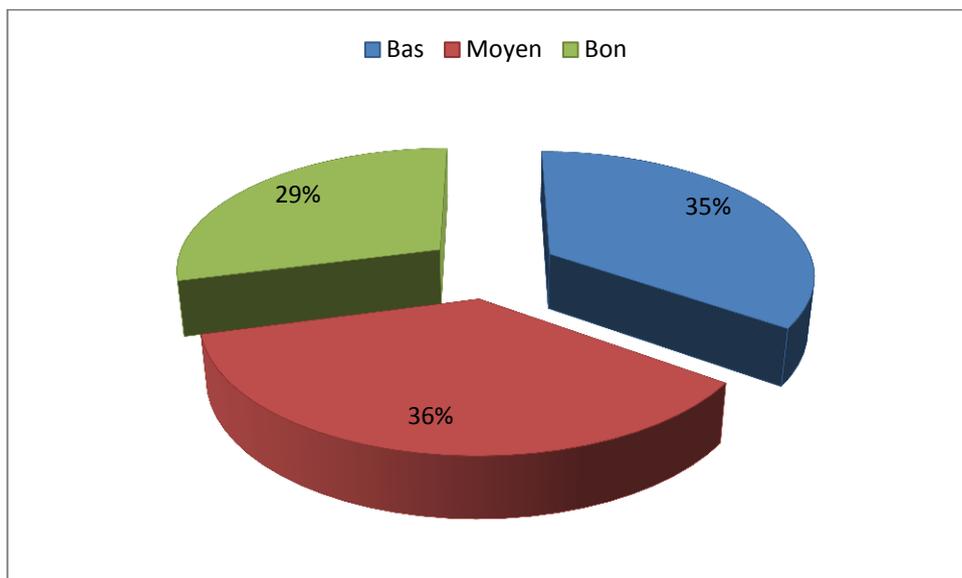


Figure 36: Distribution des patientes en fonction du niveau S-E.

Sur les 494 femmes, 172 (35%) patientes ont un faible statut socio-économique (faible niveau d'étude) dont 22 (13%) avec prélèvement positif et 150 (87.2%) avec prélèvement négatif. Le faible niveau socio-économique est retenu comme facteur de risque de portage du SGB vu la significativité ($p < 0.05$) entre les deux groupes (Le faible niveau S-E vis-à-vis le portage de SGB 22/44 cas positif, $p = 0.026$) (Fig. 37)

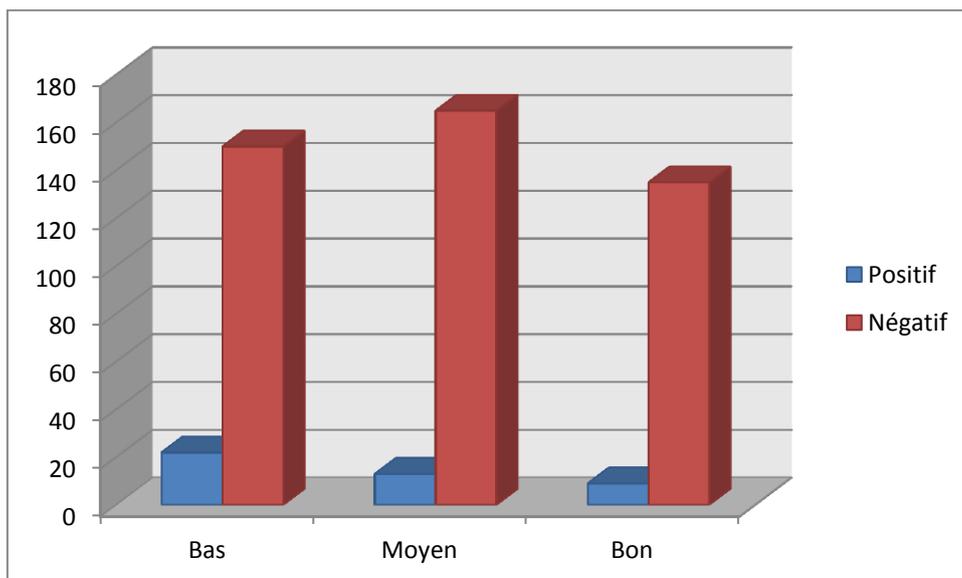


Figure 37: Niveau S-E selon les résultats des prélèvements.

1.3.5. Nombre de toilettes intimes (<5 fois / >5 fois)

Aucune association statistiquement significative n'est retrouvée entre le portage du SGB et la toilette intime ($p > 0.05$; $p = 0.08$) (Fig. 38)

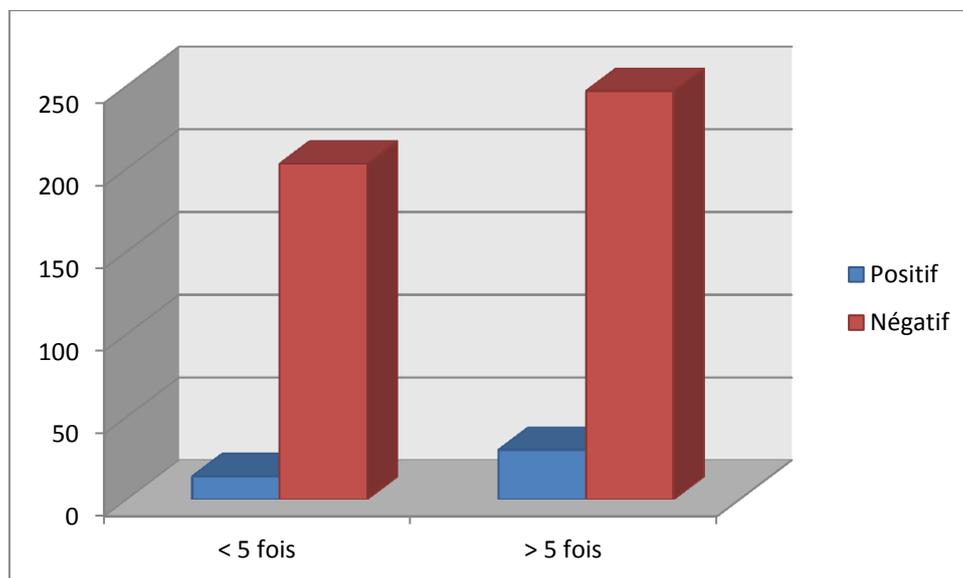


Figure 38: Répartition du portage en fonction du nombre de toilette intime.

1.3.6. Antécédents

➤ Fausses couches

L'antécédent de fausse couche est retrouvé chez 79 patientes (16%): Quatre (5.1%) des patientes avec prélèvement positif et 75 (94.9%) avec prélèvement négatif sans différence statistiquement significative.

➤ GEU (Grossesse Extra-Utérine)

Treize patientes (2.6%) présentent un antécédent de GEU dont douze femmes avaient des prélèvements négatif, et une seule patiente présente un prélèvement positif.

➤ Diabète

Deux patientes (0.4%), dont le prélèvement est négatif, ont un antécédent de diabète.

➤ L'hypertension artérielle (HTA)

Cinquante-six patientes (11.3%) présentent une hypertension artérielle dont 7 (12.5%) avec prélèvement positif, et 49 (87.5%) avec prélèvement négatif. Sur les 56 patientes, 15 femmes enceintes (26.8%) présentent une hypertension artérielle gravidique.

Note: l'HTA gravidique apparue généralement à partir de la vingtième semaine d'aménorrhée.

➤ **Anémie**

Quatre-vingt-treize femmes présente une anémie (18.8%) avec un prélèvement négatif dont 43 (46.2%) présente une anémie ferrosol.

➤ **Autres antécédents médicaux**

Aucune association significative entre l'allergie, l'asthme, RAA, l'obésité...etc et le portage de SGB n'est observé dans notre population.

➤ **Mort néonatale**

Vingt-huit patientes (5.6%), dont le prélèvement est négatif, ont un antécédent de mort néonatale.

➤ **Tabagisme**

Aucune de nos patientes n'est tabagique.

➤ **Autres**

Aucune de nos patientes n'a rapporté la notion d'interruption volontaire de grossesse ou de mort perpartum ou de pyélonéphrite gravidique.

1.3.7. Paramètres inhérent à la grossesse actuelle

➤ **Age gestationnel**

L'âge gestationnel a varié entre 3 et 41SA+2 Jours. (Analyser précédemment)

➤ **Menace d'accouchement prématuré (MAP)**

Quatre patientes (0.8%) présentent une menace d'accouchement prématuré, dont le prélèvement est négatif.

➤ **Pyélonéphrite aiguë gravidique**

Aucune patiente n'a présenté une pyélonéphrite gravidique au cours de la grossesse.

➤ Grossesse gémellaire

Nous avons recensé trois cas (0.6%) de grossesse gémellaire dont le prélèvement est négatif.

➤ Diabète gestationnel

Quatre de nos patientes (0.8%) ont présenté de diabète gestationnel au cours de la grossesse actuelle.

➤ Récapitulatif

La figure ci-dessous résume quelques facteurs de risques étudiés sur notre population.

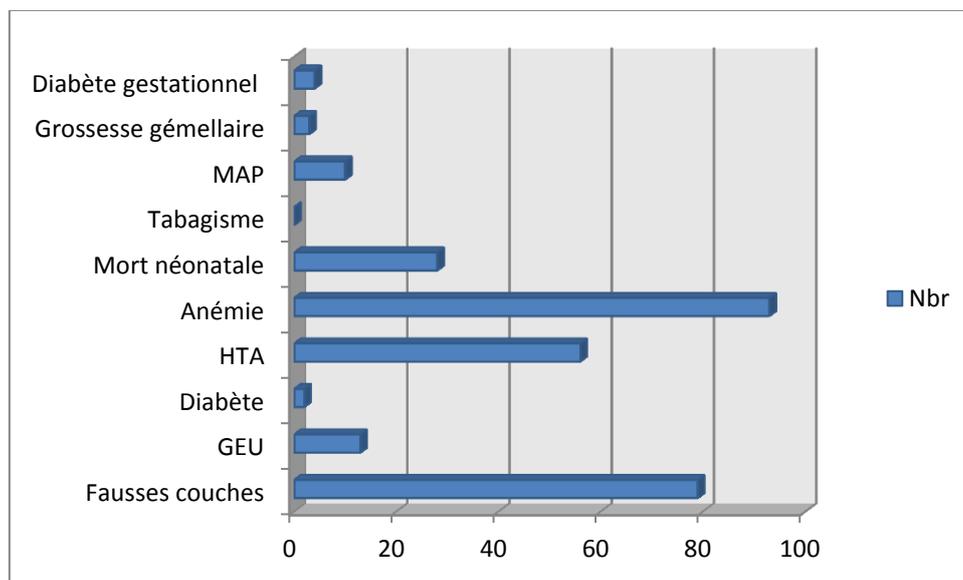


Figure 39: Antécédents selon résultats des prélèvements.

La **Figure 40** résume les résultats de notre étude sur différents antécédents pathologiques des patientes infectées.

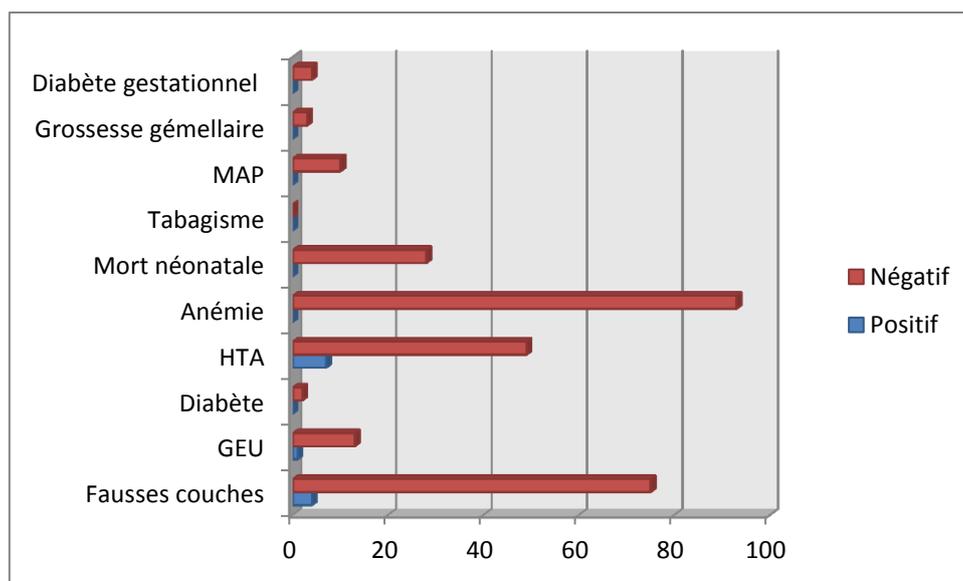


Figure 40: Répartition du portage de SGB en fonction des antécédents

Sur **44** femmes porteuses de SGB:

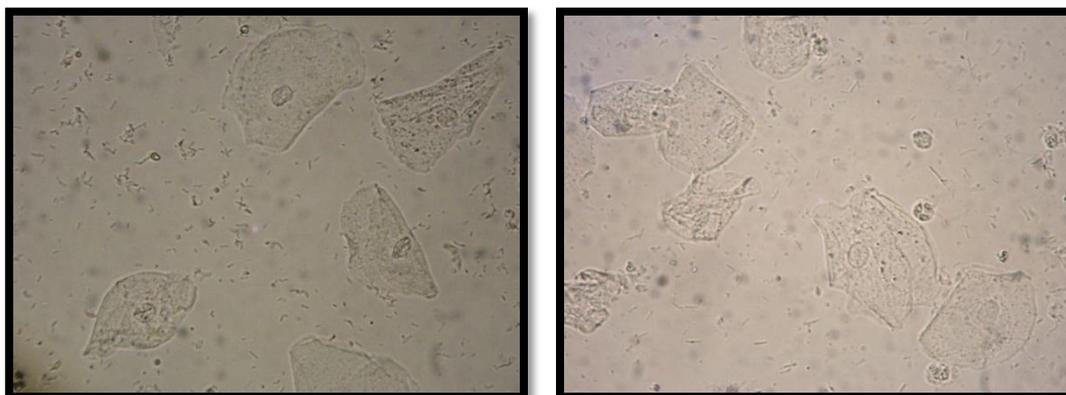
- 4 femmes (soit 9.09%) avaient connu une fausse couche.
- 2 femmes (soit 4.54%) avaient connu un avortement
- 1 seule femme avait une GEU.
- 7 femmes (soit 15.9%) avaient un HTA dont 2 femmes avaient un HTA gravidique.

***Aucun des antécédents précités n'est associé significativement au portage du SGB.**

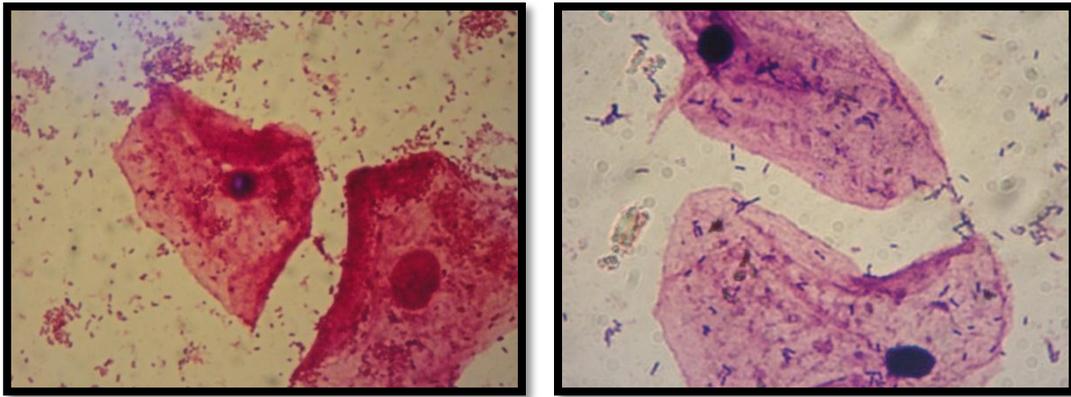
1.3.8. Les infections génitales

➤ Flore normal

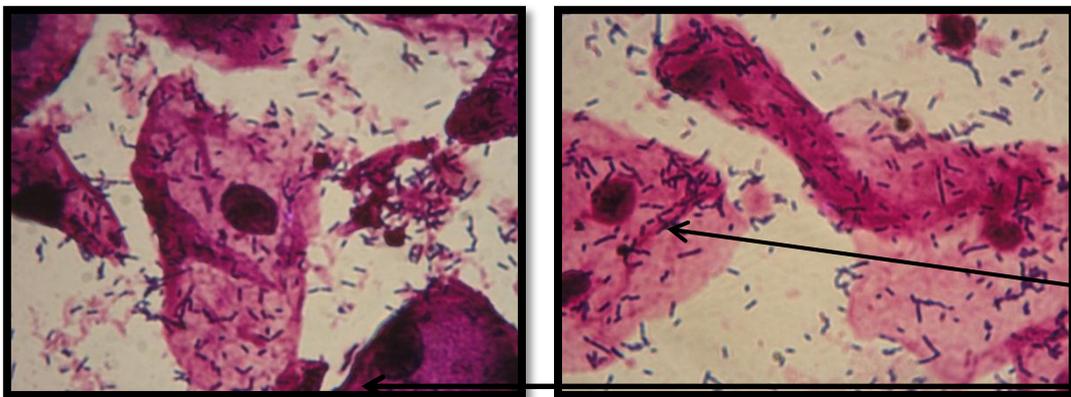
Sur les 494 patientent incluse dans cette étude, la répartition des scores de Nugent ne variait pas de manière significative. Au total et en moyenne, 54% (267/494) des patientes avaient une flore jugée normale (score compris entre 0 et 3) et 10.5% (52/494) avaient une flore jugée comme intermédiaire (score compris entre 4 et 6). (**Fig. 41**).



-Observation microscopique à l'état frais-

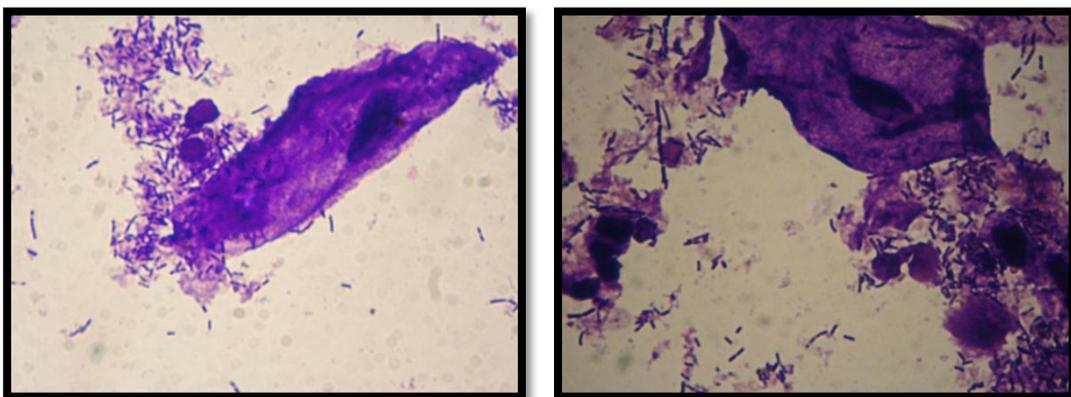


-Observation microscopique après coloration de Gram-



Lacobacilles

-Observation microscopique après coloration de Gram-



-Observation microscopique après coloration de Gram-

Figure 41: Observations microscopiques d'une flore normale à l'état frais et après coloration de Gram des frottis vaginaux.

La pointe de la flèche montre l'espèce *Lactobacillus* attaché à une cellule épithéliale.

➤ Flore déséquilibrée

Au totale 175/494 (35.4%) femmes enceintes ont donné lieu à la mise en évidence et/ou l'isolement de levure et/ou vaginose et/ou *Trichomonas vaginalis* qui se répartissent comme suit (**Fig. 42**):

- Vaginite à *Trichomonas vaginalis*: 4%
- vaginite Mycosique à *Condidia albicans*: 61.1%
- Vaginose: 34.9%

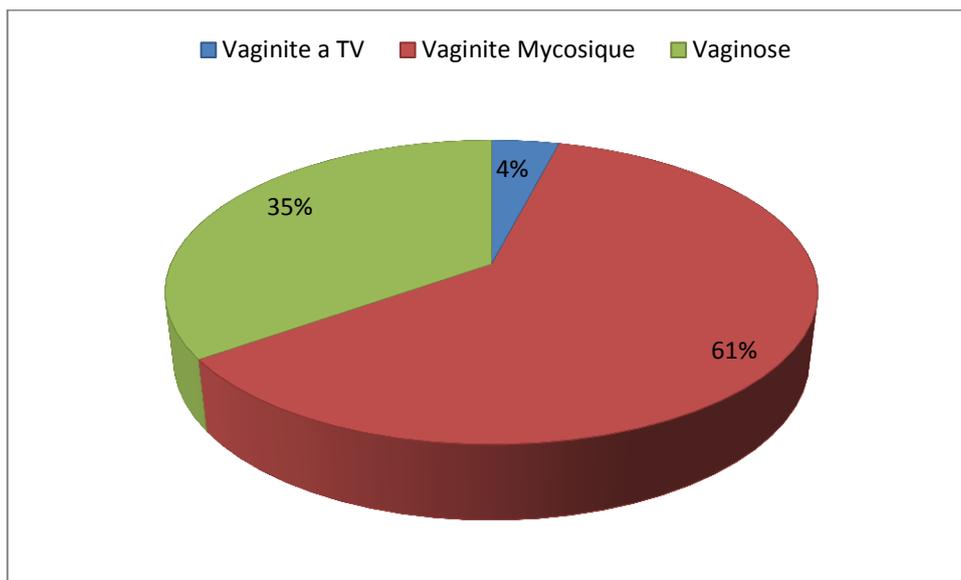


Figure 42: Répartition des infections vaginales.

Le taux le plus élevé des infections observé dans notre population est la vaginite mycosique suivie par une vaginose et une vaginite à *T.vaginalis*.

➤ Diagnostic des infections

L'examen direct des frottis à l'état frais et après la coloration de Gram nous a permis d'observer s'il existe un déséquilibre de la flore bactérienne normale du vagin à partir de la détermination de la présence ou l'absence des leucocytes, levures, Clue-celles, flore de Doderlein et les cellules épithéliales ainsi que la mise en culture des frottis.

➤ Vaginite à *T. vaginalis*

L'examen direct montre des formes végétatives ovotides et mobiles de *Trichomonas vaginalis* Chez 7/175 femmes (**Fig. 43**).

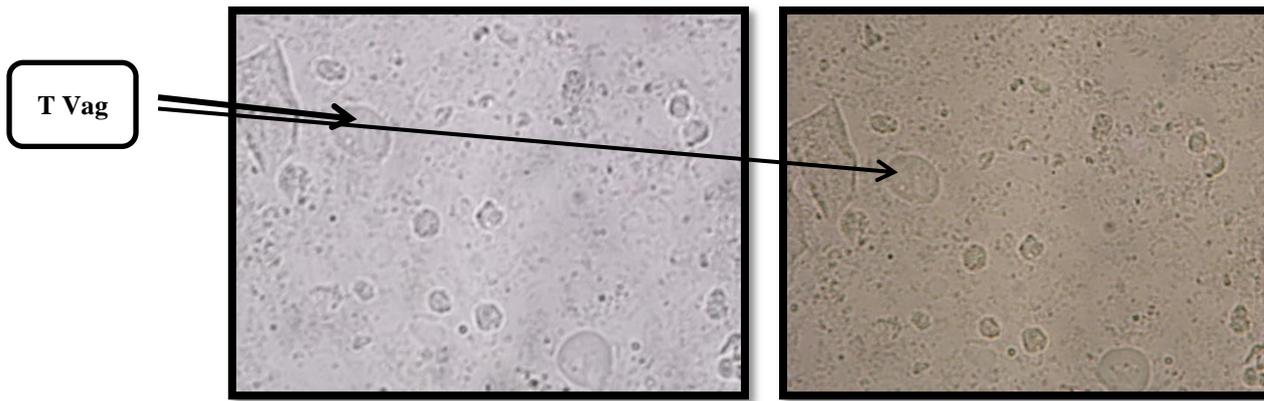


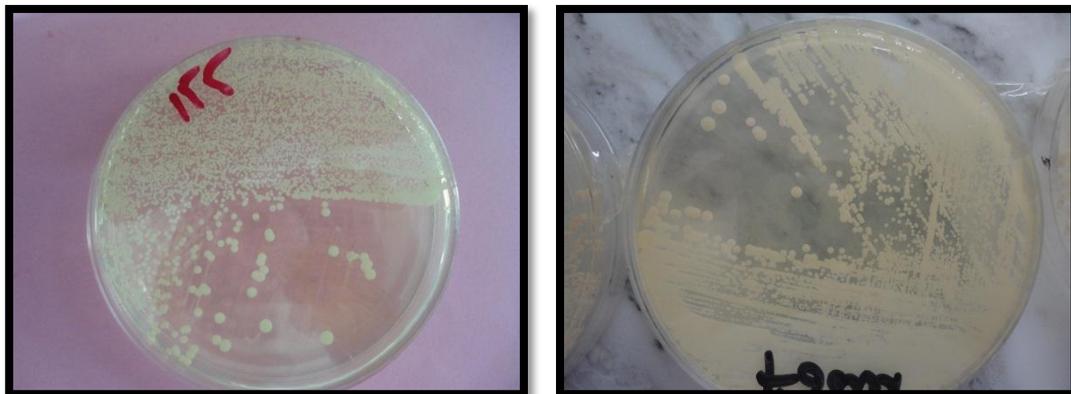
Figure 43: Examen microscopique à l'état frais de *T. vaginalis* (TV).

➤ **Vaginite mycosique**

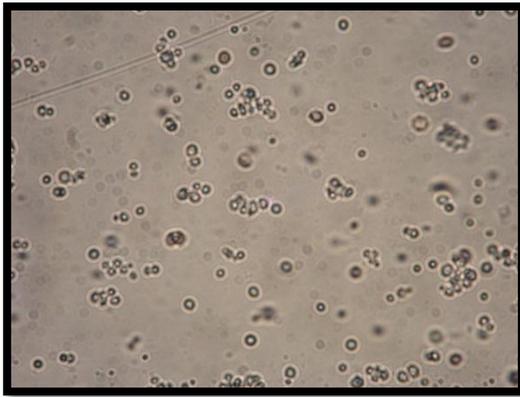
L'examen des sécrétions vaginales à l'état frais et après la coloration de Gram, au microscope en phase liquide, les levures sont observés sous forme (**Fig. 44**);

- ovoïde à l'état frais et après la coloration de Gram.

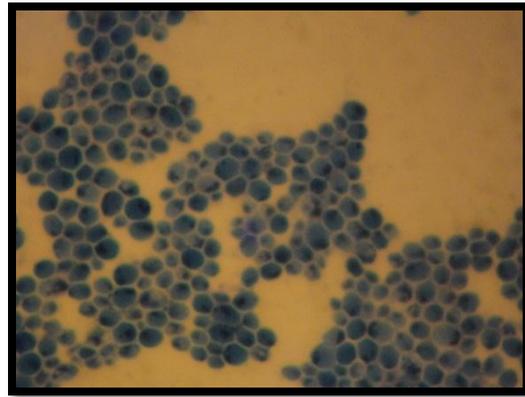
- colonies blanchâtres et muqueuses sur milieu Sabouraud.



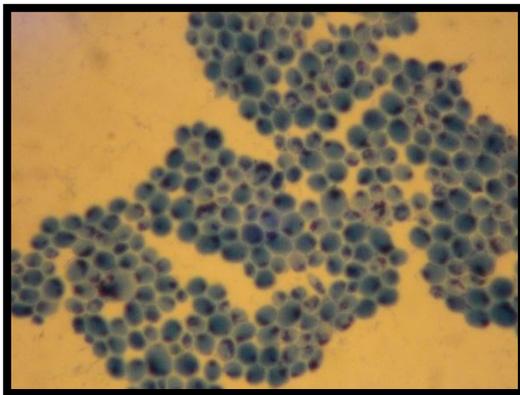
-Observation macroscopique des levures-



-Observation microscopique à l'état frais-



-Observation microscopique après coloration-



-Observation microscopique après coloration au bleu de méthylène-

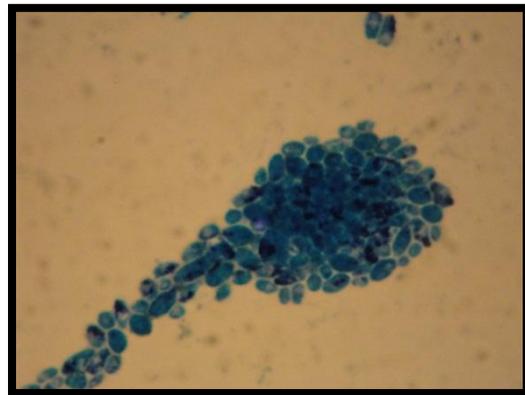


Figure 44: Observation macroscopique et microscopique des levures.

- Spores et filaments mycéliens liés aux cellules épithéliales (**Fig. 45**).

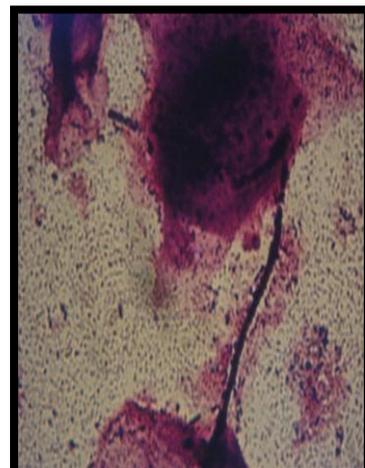
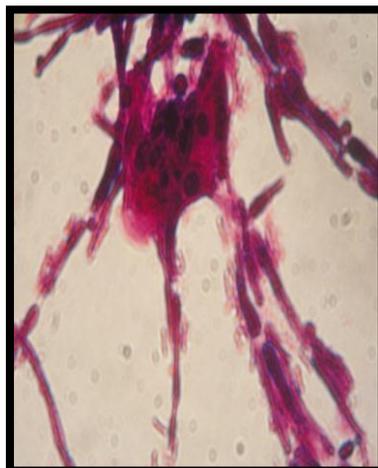
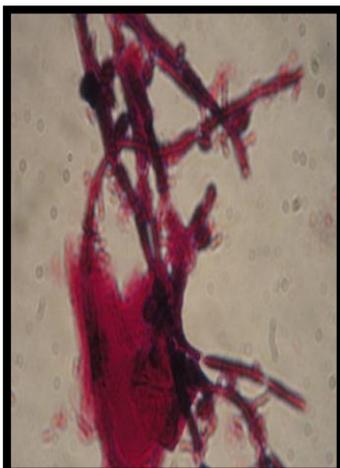


Figure 45: Examen microscopique (Gram) des levures

➤ Vaginose

La plupart des laboratoires utilisent un schéma diagnostique objectif qui quantifie le nombre de lactobacilles et de bactéries pathogènes. Ceci aboutit au calcul d'un score qui est utilisé pour déterminer la présence ou non de l'infection. Le score de Nugent est le système le plus couramment utilisé.

- Soixante-et-un patientes (12.3%) présentaient un score de Nugent entre 7 et 10, indiquant l'existence d'une vaginose bactérienne. Les résultats sont illustrés dans la **Figure 46**.

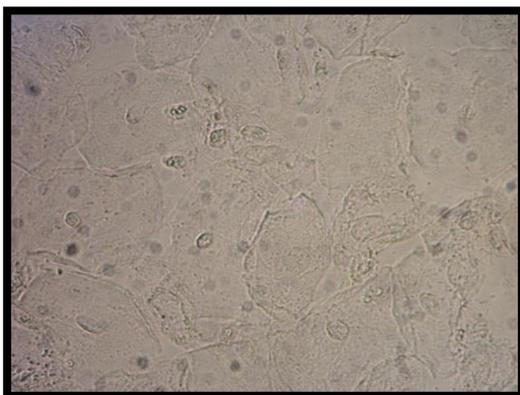
- Présence de "*clue cells*" (cellules épithéliales complètement recouvertes de petits bacilles adhérent à la membrane cellulaire) à l'examen microscopique direct à l'état frais et après coloration de Gram.

- En parallèle, ces femmes présentent:

* un pH vaginal supérieur à 4,5,

* odeur caractéristique de «poisson pourri» imputable à la libération d'amines lors du test à la potasse ou «Sniff test».

* présence des leucorrhées au microscope.

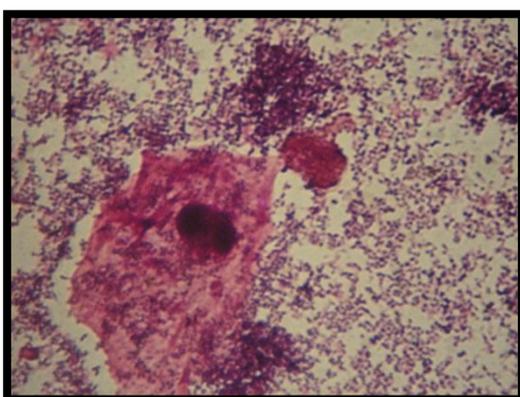


-a-Observation microscopique à l'état frais-

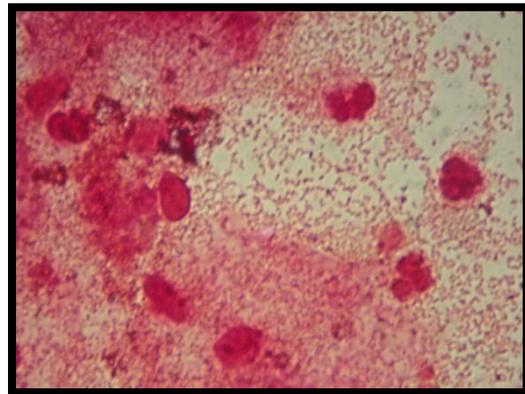
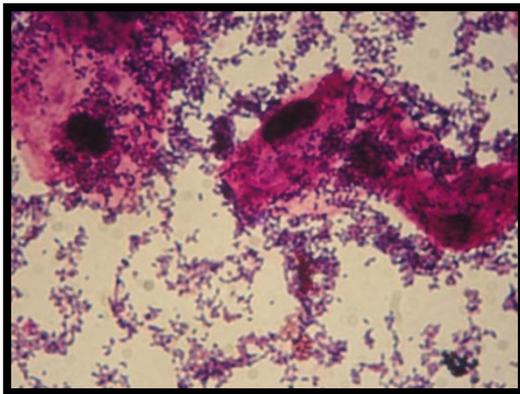


Cellules
épithéliale

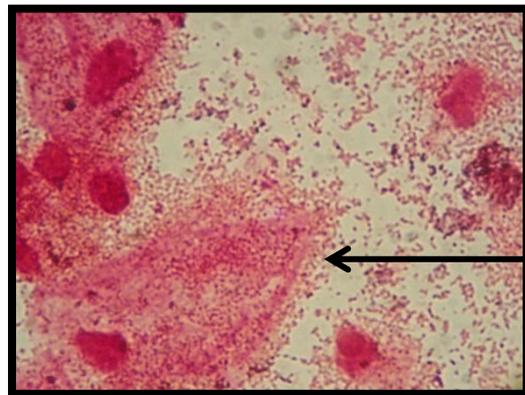
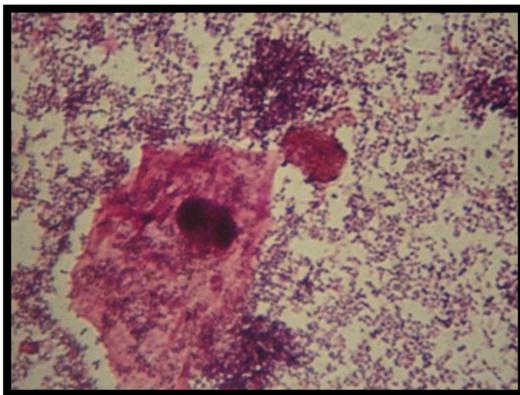
-b-Observation microscopique après coloration-



-c-Observation microscopique après coloration de Gram-

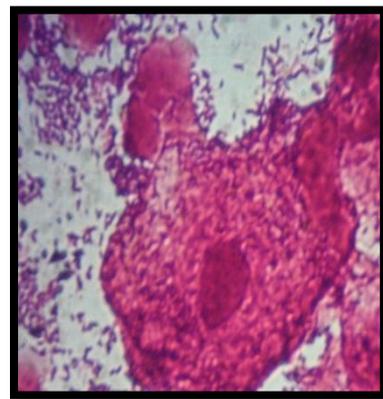
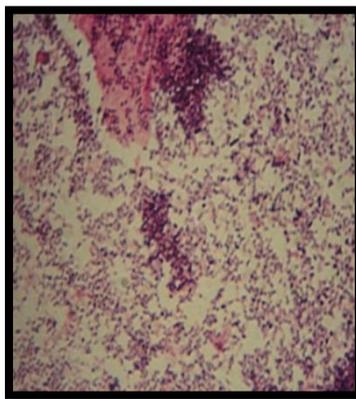
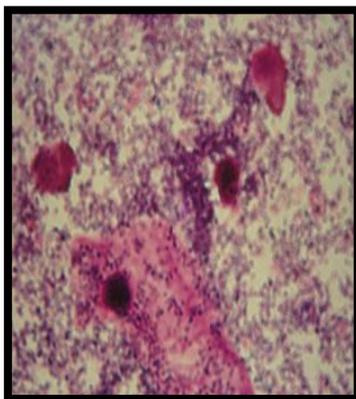


-d-Observation microscopique après coloration de Gram-



Clue-cells

-e-Observation microscopique après coloration de Gram-



-f-Observation microscopique après coloration de Gram-

Figure 46 (a-b-c-d-e-f): Observations microscopiques d'une flore de vaginose bactérienne après coloration de Gram des frottis vaginaux.

Il y'a une prolifération de plusieurs espèces bactériennes et également des cellules épithéliales, clue-celles, avec absence de *Lactobacillus*.

➤ Association entre le portage de SGB et les différents types d'infection.

La figure ci-dessous montre la répartition des femmes ayant un portage positif à SGB en associant avec chaque type d'infection.

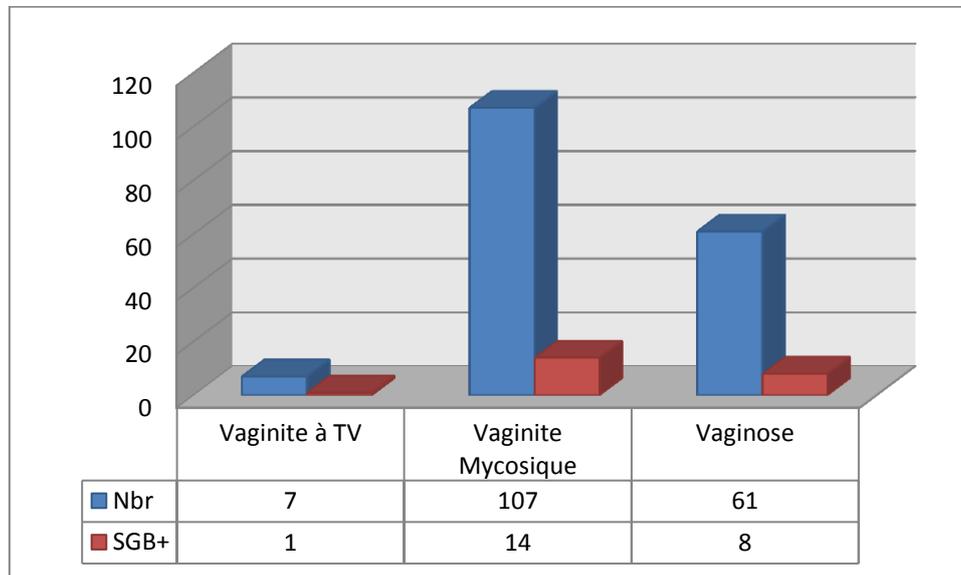


Figure 47: Distribution du portage de SGB par rapport aux infections.

Ces données montrent que: **14.2%**, **13.08%** et **13.1%** des femmes porteuses de SGB présentent une infection de type; vaginite à *T.vaginalis* ($p>0.05$, $p=0.88$), vaginite mycosique ($p>0.05$, $p=0.79$) et une vaginose ($p>0.05$, $p=0.65$) respectivement (**Fig. 47**).

- Aucune association statistique significative n'est observée ($p>0.05$).

En outre, ces données montrent que:

Sur les 175 cas infectés, nous avons constaté la présence d'infections mixtes;

- 24 femmes (13.7%) présentent une association entre deux infections dont 2/24 (8.3%) présentent une association entre vaginite à *T. vaginalis* et vaginite mycosique et 22/24 (92%) entre la vaginite mycosique et la vaginose (**Fig. 48**).

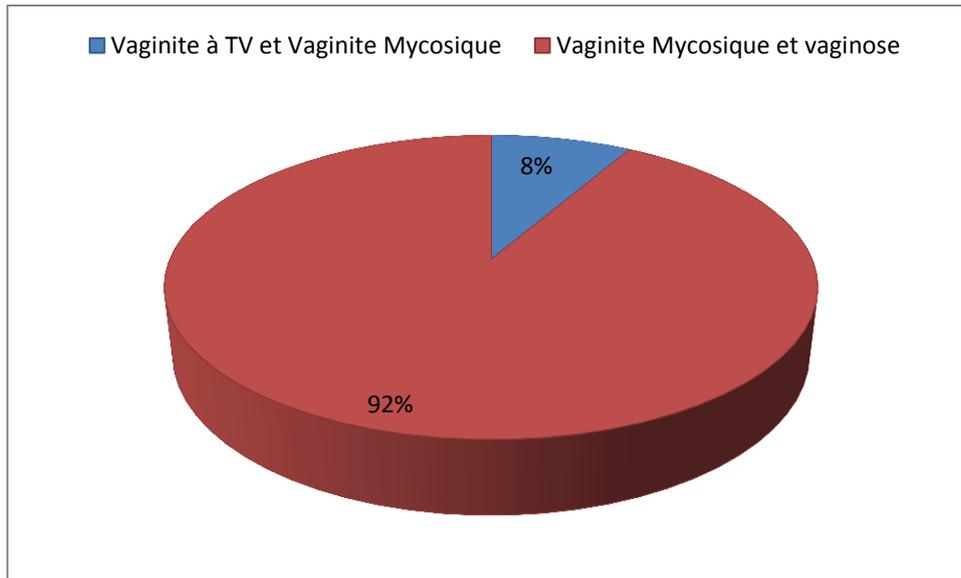


Figure 48: Distribution des infections mixtes.

Sur l'ensemble des patientes présentant ces infections; 5 femmes sont porteuses de SGB (20.8%) (**Fig. 49**).

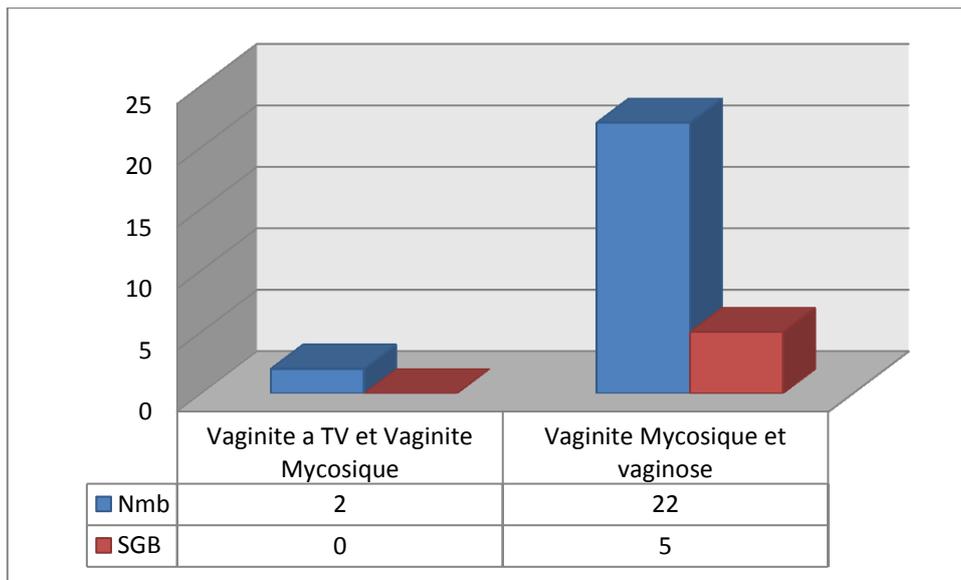


Figure 49: Distribution des infections mixtes en fonction du portage de SGB.

Le portage de SGB est pas significativement associé au portage des infections mixtes entre vaginite à *T. vaginalis* et vaginite mycosique ($p > 0.05$). Par contre une faible significativité entre la vaginite mycosique et la vaginose et le portage de SGB ($p \approx 0.05$).

2. Analyse secondaire

2.1. Identification

2.1.1. Enrichissement

Les frottis génitaux sont placés dans un milieu d'enrichissement sélectif Todd Hewitt et incubé à 37°C pendant 24h. Les croissances sont obtenues sur bouillon sélectif, on obtient en fin de croissance un trouble visible à l'œil (**Fig. 50**).

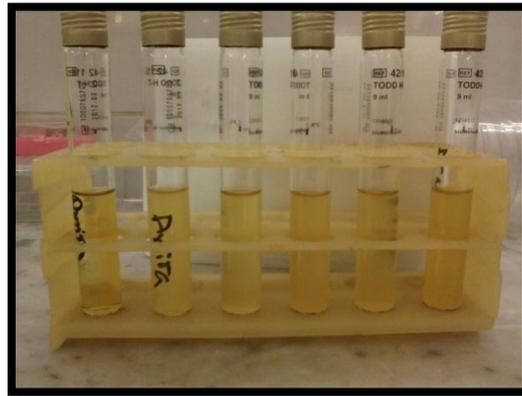


Figure 50: Bouillon d'enrichissement TW après 24 h d'incubation

2.1.2. Culture

Le SGB produit une hémolyse de type bêta appréciée sur gélose au sang. Elle apparaît comme une zone claire, assez large (3-4mm) autour des colonies. Parallèlement, des colonies mauves opaques apparaissent sur le milieu sélectif CHROMTM agar Strep (**Fig. 51**).

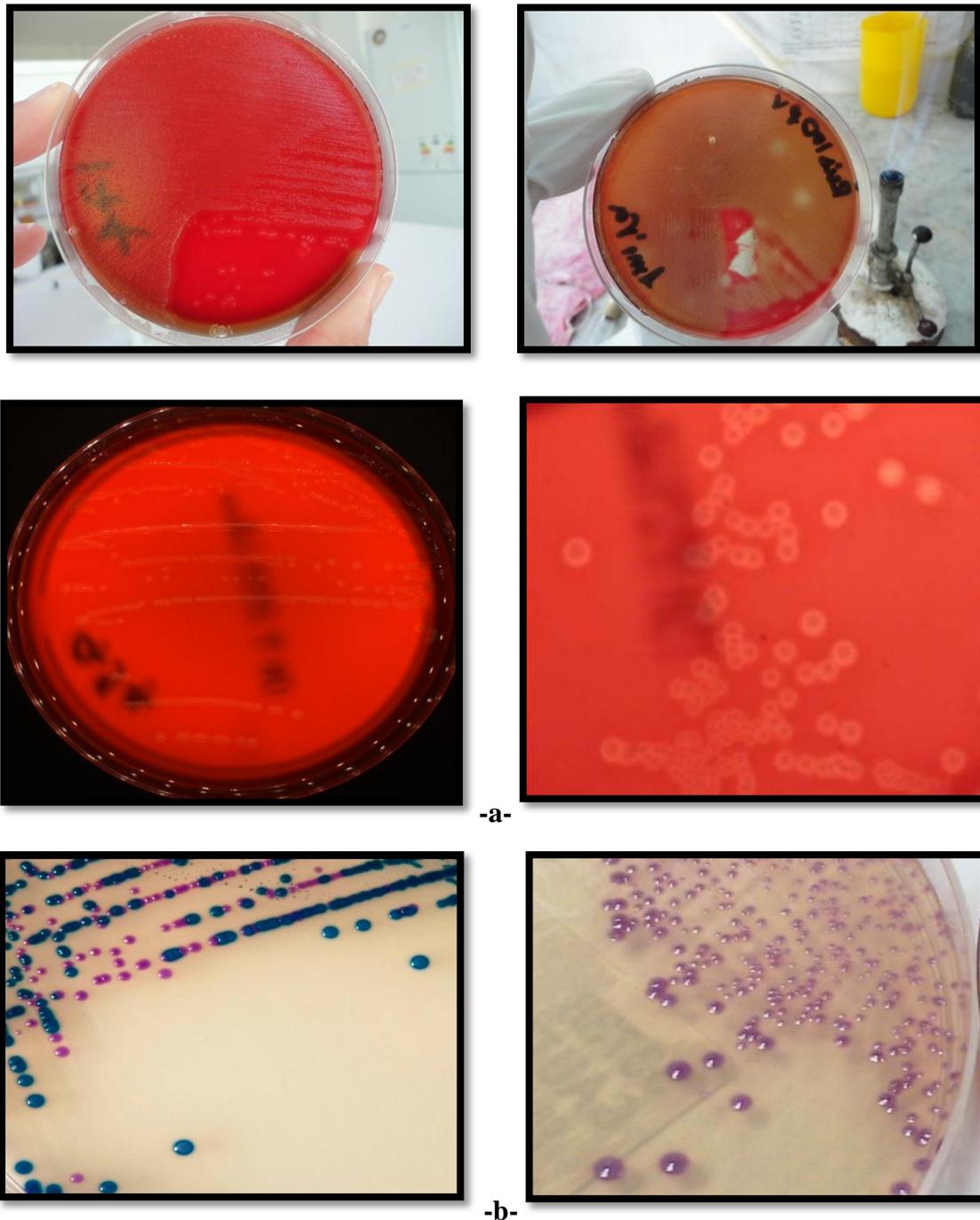


Figure 51: Culture de SGB sur géloses Columbia+5% de sang de mouton (sans et avec milieux d'enrichissement) **-a-** et sur la gélose chromogène CHROM agarTM StrepB **-b-**.

L'observation microscopique des colonies de SGB, montre des coques Gram positifs de 0,5 à 1 μ m de diamètre, présentant un groupement typique en diplocoques (deux coques) ou en chaînettes de longueur variable, immobiles, dépourvus de spores (**Fig. 52**) dont la réaction catalase et oxydase est négative.

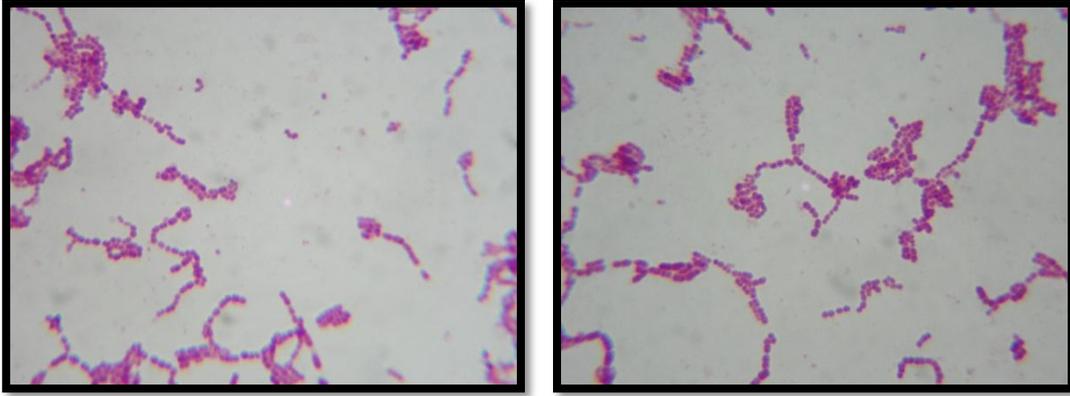


Figure 52: Observation microscopique des colonies de SGB après la coloration de Gram.

2.1.3. Identification

➤ Api 20 Strep

L'identification des souches isolées par système Api 20 Strep (BioMérieux, Meylan, France) répond réellement aux profils numériques spécifiques à l'espèce *S. agalactiae*. Leucine aminopeptidase + (LAP), pyrrolidonyl arylamidase – (PYRA), hippurate + (HIP) et esculine (ESC) (**Fig. 53**).



Figure 53: Profil Api 20 Strep.

➤ **Sérogroupage**

La seconde technique affirme la présence de l'antigène de groupe B de Lancefield.

Les résultats son interprété comme suit (**Fig. 54**);

Réaction positive: formation d'agglutinats rouge sur fand vert.

Réaction négative: suspension homogène brune.

Réactions non interprétable: faibles agglutinats sur fond brun.

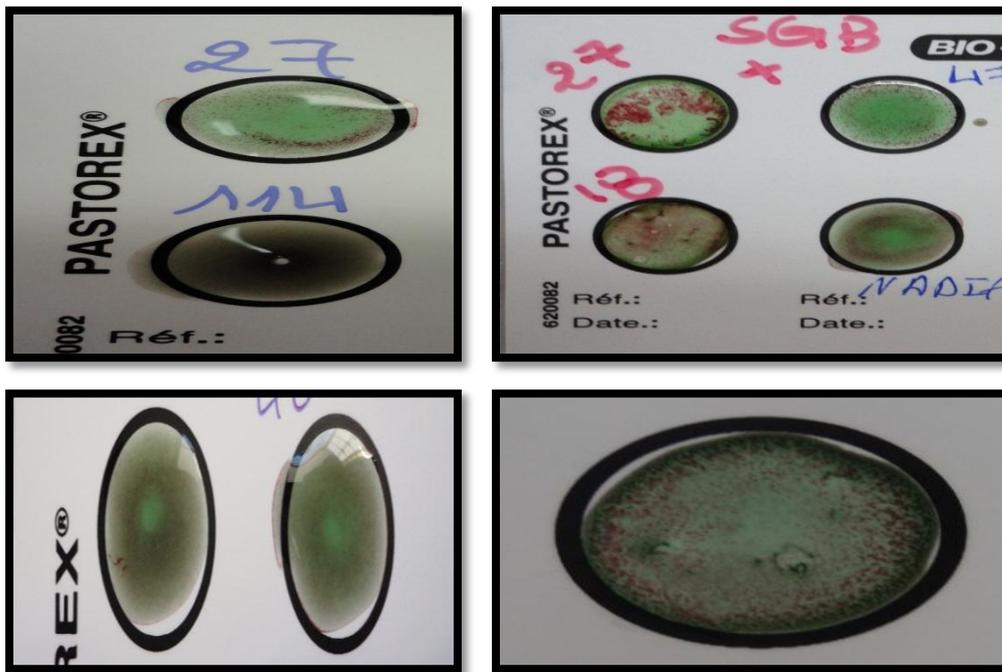


Figure 54: Identification de *S. agalactiae* par sérogroupage de Lancefield.

➤ **Camp test**

Le CAMP test a été utilisé pour une re-identification; aucune souche n'a donné un résultat négatif. Nous avons remarqué une augmentation de l'hémolyse au niveau de la zone d'intersection de la souche à tester du SGB et celle du *Staphylococcus aureus* (sécrétrice d'une hémolysine); "résultat positif" (**Fig. 55**).

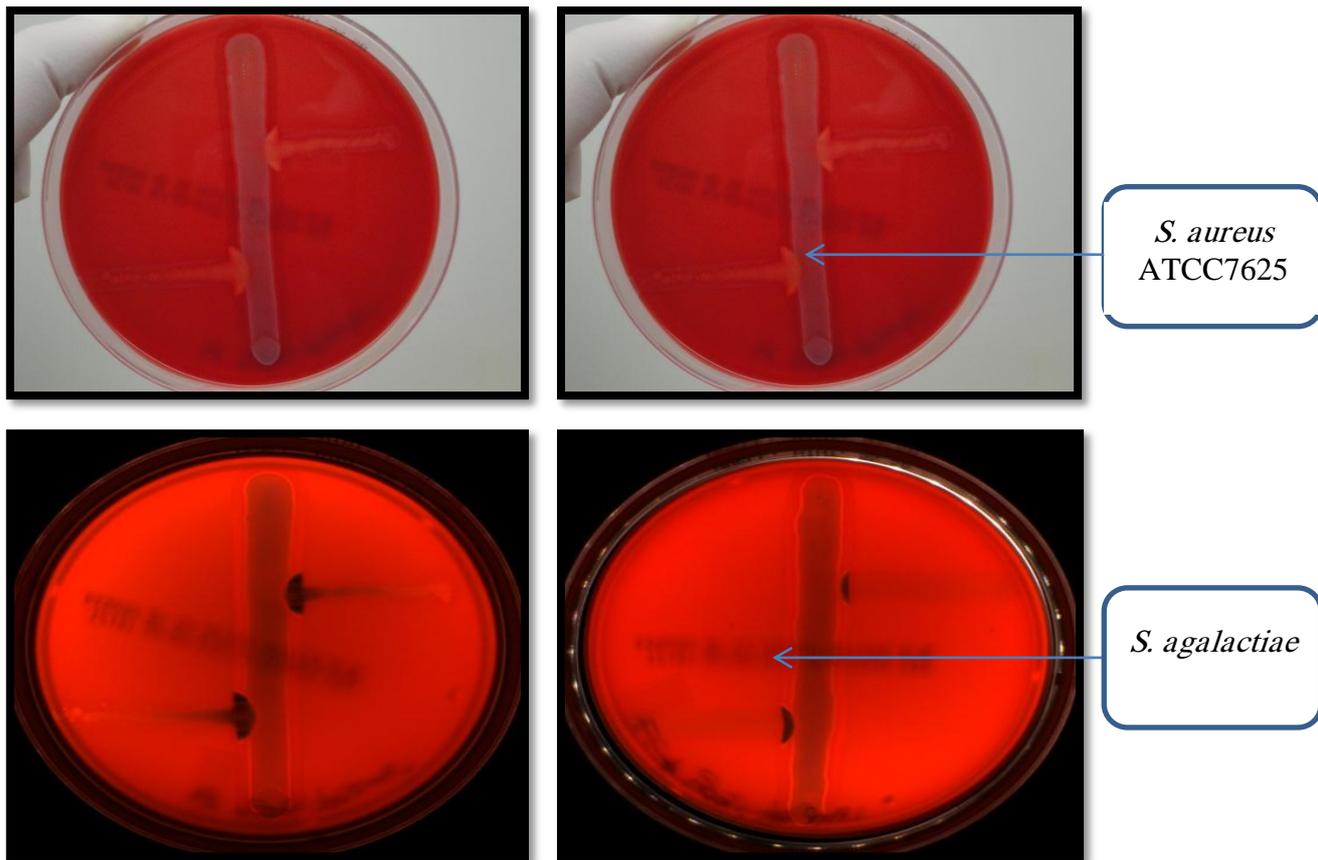


Figure 55: Identification de *S. agalactiae* par Camp test.

➤ **MALDI TOF-MS**

Finalemment une confirmation de l'identification par la spectrométrie de masse MALDI TOF-MS de toutes les souches. Les résultats d'identification des bactéries donnent de très bons scores allant de 1.9 à 3 (**Tab. 15**).

Tableau 15: Résultats d'identification par MALDI-TOF MS.

Strains	Results	Score						
8 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.243	105 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.199	267 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	1.977
18 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.238	114 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.253	277 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.117
25 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.215	123 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	1.964	291 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.053
27 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.242	126 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.134	296 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.103
34 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.271	129 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.138	321 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.079
43 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.177	133 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.088	329 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.205
48 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.291	145 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.115	349 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.026
56 (+++)(A)	Streptococcus agalactiae	2.308	150 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.19	354 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.081
58 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.136	151 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.133	355 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.137
72 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.247	153 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.037	366 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.089
100 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.277	201 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.198	371 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.029
104 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.142	246 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.115	478 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.112
			262 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.238	487 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	1.974
						494 (++) (A)	Streptococcus agalactiae	2.059

2.2. Analyse des données

Le tableau ci-dessous résume les données majeures et les différences entre les souches de SGB isolées à Guelma et à Marseille.

➤ Age

L'âge des patients source varie de 1 an à 87 ans, où la tranche de 26 ans à 40 ans est la plus exposée du fait qu'elle soit la population la plus active. La tranche d'âge >40 ans pouvant présenter des tares (diabète, hypertension, ...etc.) (Tab. 16).

➤ Source de prélèvement

Comme le montre le **tableau 16**, les souches de *S. agalactiae* ont été isolées à partir de divers prélèvements, principalement des prélèvements vaginaux qui représente 79.5% de toute la collection. Par conséquent, le sexe féminin est prédominant dans la collection Marseillaise (Tab. 16).

Tableau 16: Provenance des 93 souches de *Streptococcus agalactiae*.

Souches	Nature de prélèvements	Age	Sexe
A1	vaginal (n=44)	27	F
A2		31	
A3		24	
A4		31	
A5		32	
A6		24	
A7		30	
A8		32	
A9		38	
A10		31	
A11		29	
A12		27	
A13		30	
A14		32	
A15		27	
A16		33	
A17		30	
A18		29	
A19		31	
A20		29	
A21		29	
A22		31	
A23		26	
A24		28	
A25		25	
A26		36	
A27		26	
A28		38	
A29		28	
A30		37	
A31		34	
A32		33	
A33		22	
A34		27	
A35		28	
A36		29	
A37		32	
A38		41	
A39		23	
A40		32	
A41		28	
A42		27	

A43		28	
A44		36	
M1	vaginal	40	F
M2	vaginal	1	F
M3	vaginal	38	F
M4	vaginal	48	F
M5	vaginal	31	F
M6	vaginal	73	F
M7	vaginal	48	F
M8	vaginal	31	F
M9	vaginal	1	F
M10	vaginal	1	F
M11	vaginal	1	F
M12	vaginal	48	F
M13	vaginal	22	F
M14	urine	22	F
M15	vaginal	22	F
M16	vaginal	21	F
M17	vaginal	31	F
M18	vaginal	31	F
M19	vaginal	30	F
M20	vaginal	34	F
M21	vaginal	37	F
M22	vaginal	30	F
M23	vaginal	27	F
M24	vaginal	30	F
M25	vaginal	1	F
M26	vaginal	44	F
M27	vaginal	30	F
M28	hémoculture	44	F
M29	vaginal	40	F
M30	vaginal	61	F
M31	vaginal	81	F
M32	hémoculture	79	F
M33	hémoculture	65	F
M34	urine	81	H
M36	hémoculture	12	F
M37	vaginal	81	F
M38	hémoculture	87	H
M40	urine	70	H
M41	hémoculture	54	H
M42	hémoculture	51	F
M43	urine	32	F
M45	hémoculture	63	H

M46	urine	81	H
M47	urine	19	F
M48	Urine	54	H
M49	Urine	20	F
M50	Urine	40	F
M52	urine	39	F
M53	hémoculture	55	H

A. Algérie ; M. Marseille ; F. Femme ; H. Homme.

2.2.1. Biotypage des souches de *S. agalactiae* par MALDI-TOF MS

A partir des spectres obtenus lors de l'identification des souches par MALDI TOF-MS, un dendrogramme a été réalisé en comparant les spectres des profils protéiques des bactéries obtenus avec les spectres présents dans la banque de données du MALDI grâce au logiciel Bruker Biotyper software 3.0, cette comparaison nous a permis d'avoir un aspect épidémiologique des souches que nous avons étudiées (**Fig. 56**).

Le dendrogramme révèle que les souches isolées à Guelma, Algérie se regroupent dans un même cluster à la limite arbitraire 700 par rapport à celles isolées à Marseille, France (**Fig. 56**).

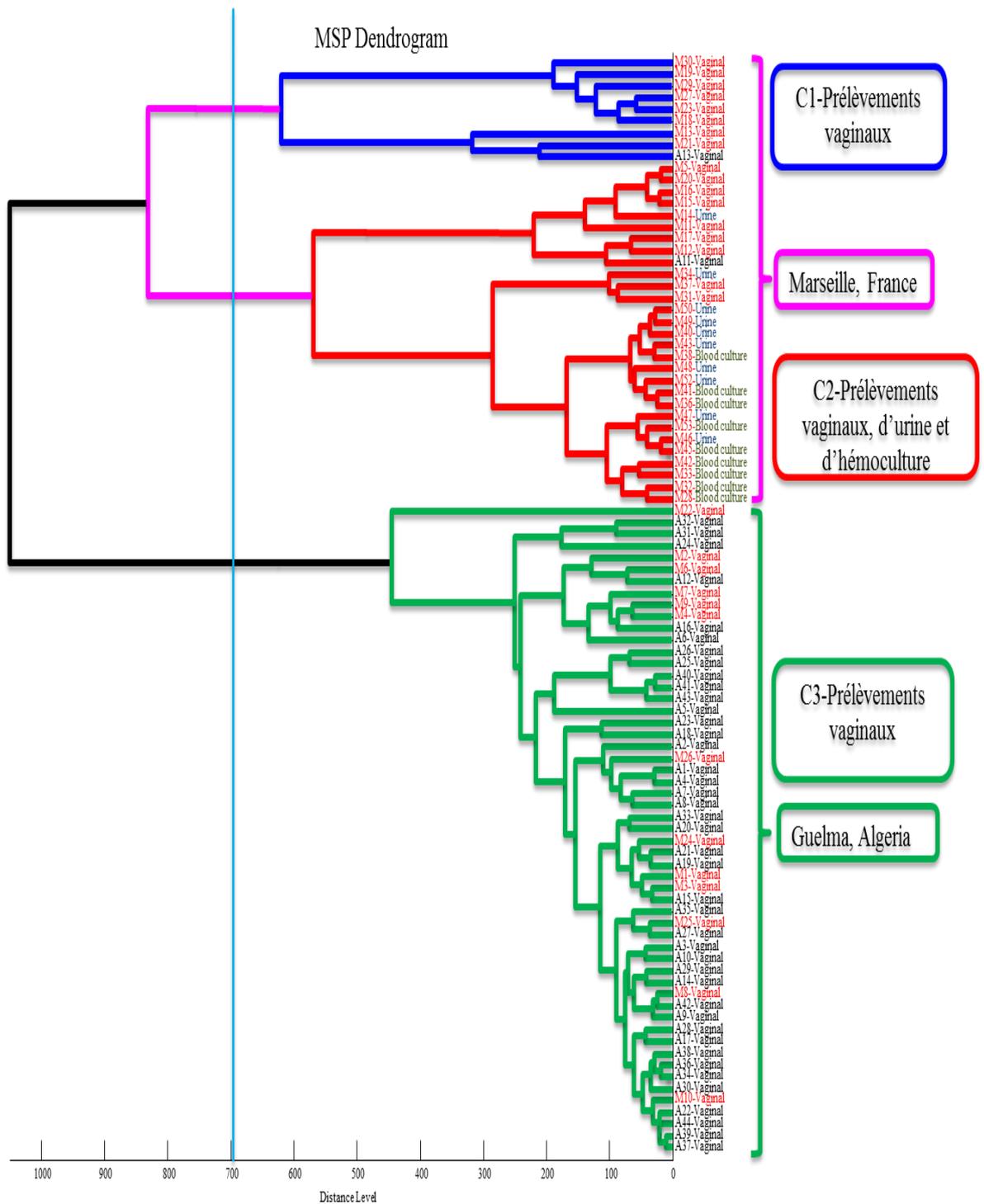


Figure 56: Analyse typologique par MALDI-TOF MS des spectres de *S. agalactiae* isolé à Guelma et à Marseille (MSP dendrogramme).

A. Souches Algérienne; M. Souches Française; C. Cluster (Groupe).

Notre collection regroupe 93 isolats de *S. agalactiae*, 44 isolées de Guelma, Algérie dont la totalité des souches sont d'origines vaginales, et 49 isolées de Marseille, France. La source la plus répandue des isolats de Marseille était d'origine vaginale (30/49; 61,2%), suivi des prélèvements d'urine (20,4%) et d'hémoculture (18,4%) (**Fig. 56**).

Le MSP dendrogramme de nos isolats a révélé trois groupes en fonction de l'origine géographique à la limite arbitraire 700. Les 49 isolats de Marseille englobe 36 *S. agalactiae* regroupés en deux clusters: groupe C1 (regroupe les prélèvements vaginaux; n = 8 échantillons) et groupe C2 (regroupe les prélèvements vaginaux; n = 9 et des hémocultures; n = 9 et des urines; n = 10 échantillons). Inversement, un cluster C3 englobe 42 isolats de *S. agalactiae* de Guelma (regroupant que les prélèvements vaginaux).

Finalement; les clusters C1 et C2 étaient significativement associés aux isolats de Marseille, tandis que le cluster C3 a été associée aux isolats algériens ($p < 10^{-6}$).

2.2.2. Détections des clones de virulence par MALDI TOF-MS

Supplémentairement, le MALDI-TOF MS nous a permis grâce à l'extraction et l'analyse des pics (**Annexe 1** et **Fig. 57**) d'identifier une protéine à 6250-Da spécifique à la séquence type ST-1 (et pas de pic de masse à 6888-Da) (n=15) et une protéine à 7625-Da spécifique à la séquence type ST-17 (n= 3) (**Figs. 58 et 59**).

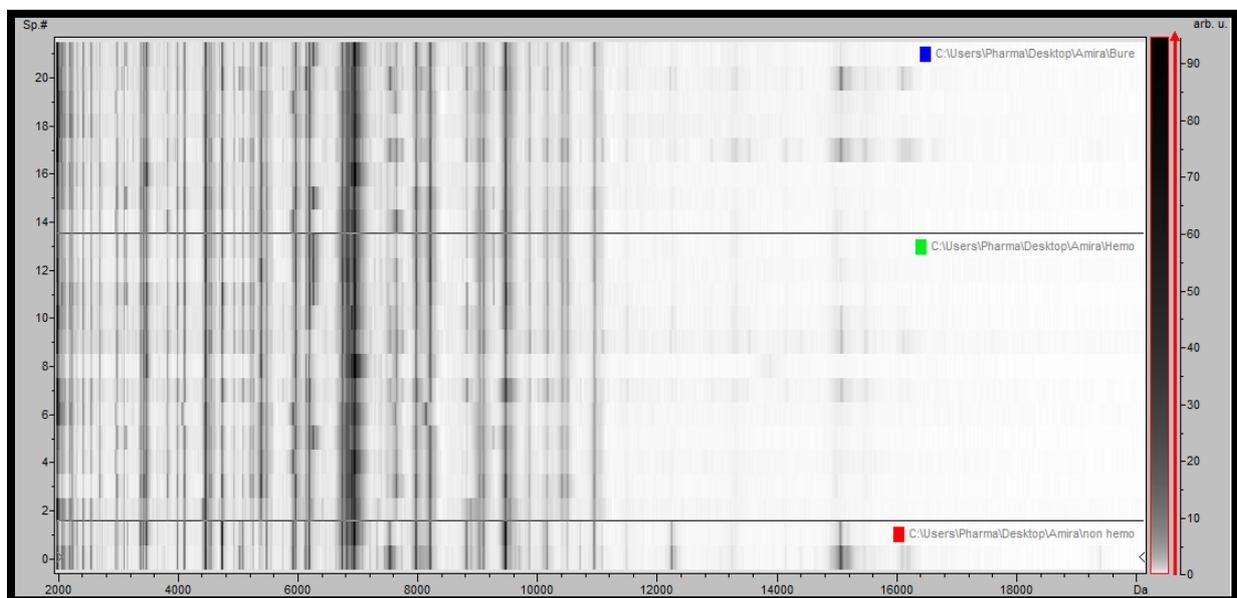
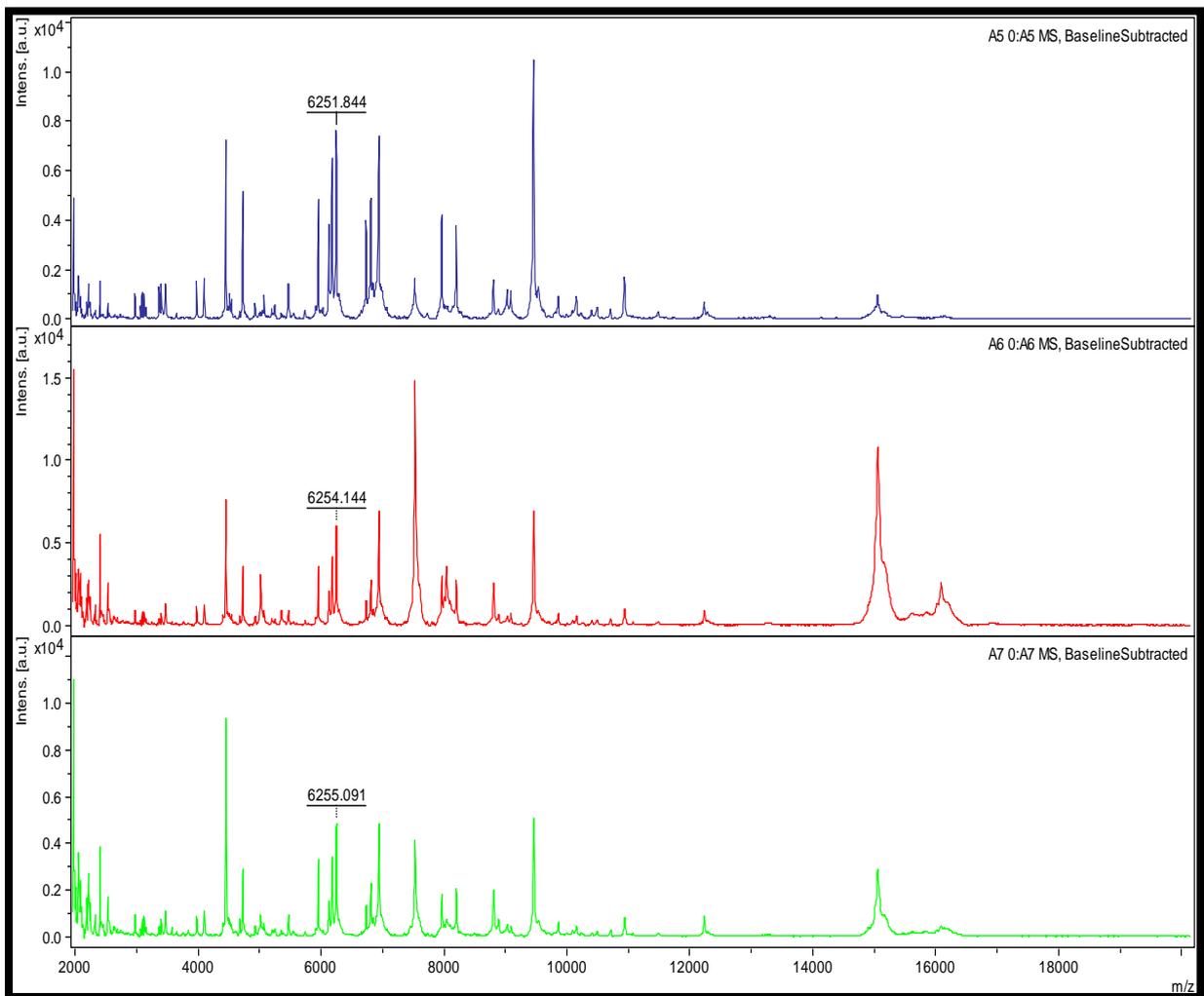
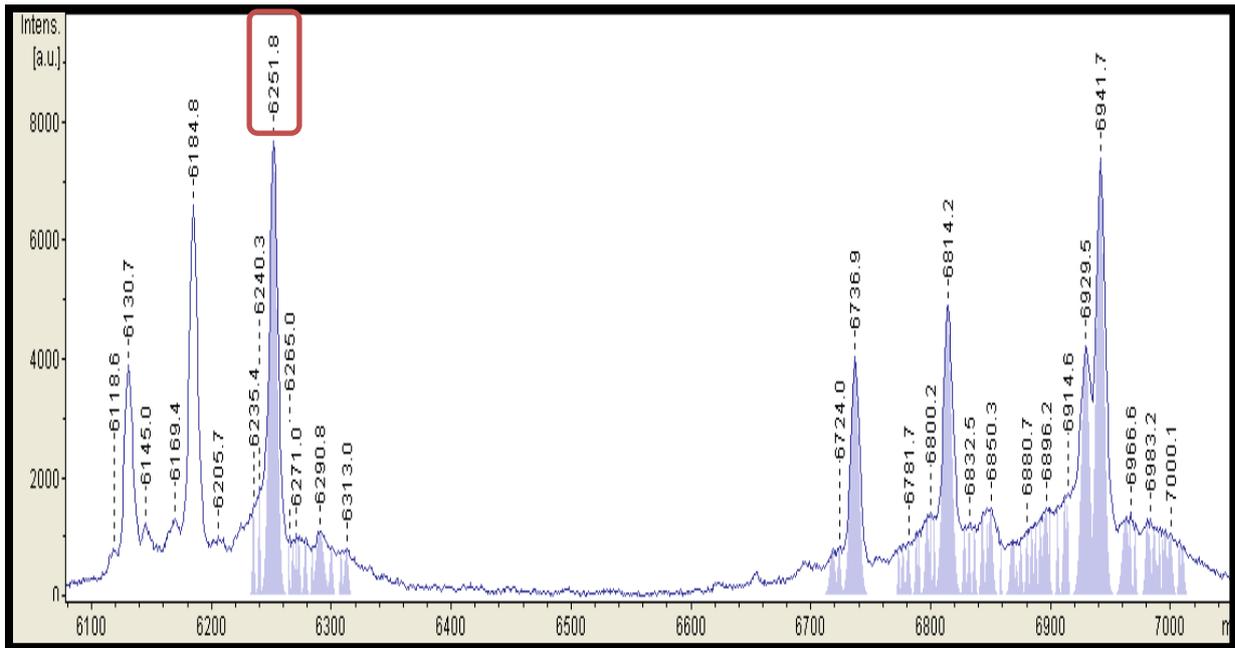


Figure 57: Gel View (extraction des pics).

Cependant les pics à 6250-DA et 7625-Da était également présents dans d'autres séquences types (STs), y compris ST-460, 2 ST-693 et ST 106 présenté dans la **Figure 95**.



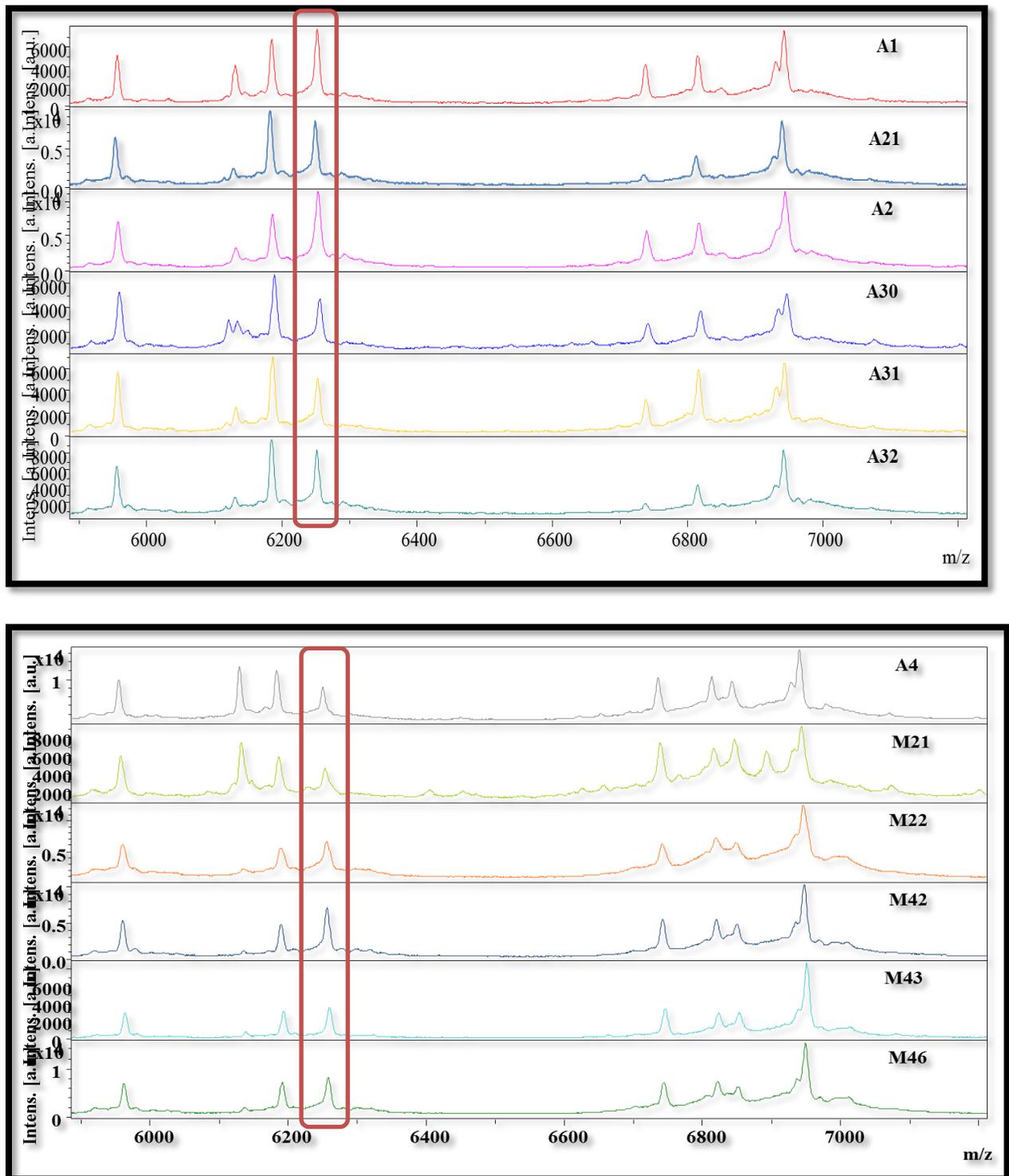


Figure 58: Détection rapide par MALDI-TOF MS des clones de virulences ST-1.

La zone rouge représente le pic qui distingue les souches ST-1 des autres séquences type (ST) dans l'intervalle de 6200 à 7000 Da et absence de pic de masse à 6888 Da. Cette zone montre un pic de masse à 6250 Da qui représente la séquence type ST-1.

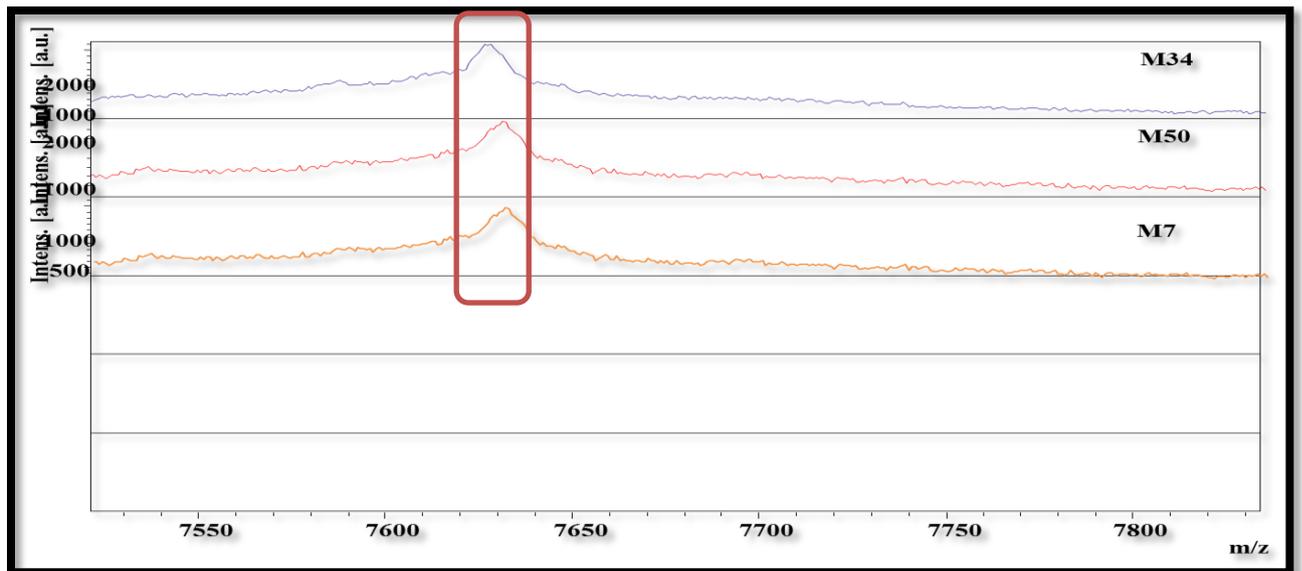


Figure 59: Détection rapide par MALDI-TOF MS des clones de virulences ST-17 (Pic discriminant à 7625 Da).

La zone rouge représente le pic qui distingue les souches ST-17 des autres grandes souches ST dans l'intervalle de 7100 à 7900 Da. Cette zone montre le pic de masse à 7625 Da qui représente la séquence type ST-1.

Les intensités absolues des ions (en U.arb, Unités arbitraires) sont représentés sur l'axe des y, et les masses de l'ion (Da) sont indiqués sur l'axe x. La valeur m/z représente rapport masse sur charge. Cette valeur correspond à la masse moléculaire de la protéine à une seule charge positive.

2.3. Sensibilité aux antibiotiques

2.3.1. Résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux glycopeptides

En fonction des antibiotiques utilisés dans notre étude, les résultats révèlent une activité à 100% sensible des antibiotiques suivant: OXA, CRO, PNG, AX, AMP, VA, CN, RA et PT (Fig. 60).

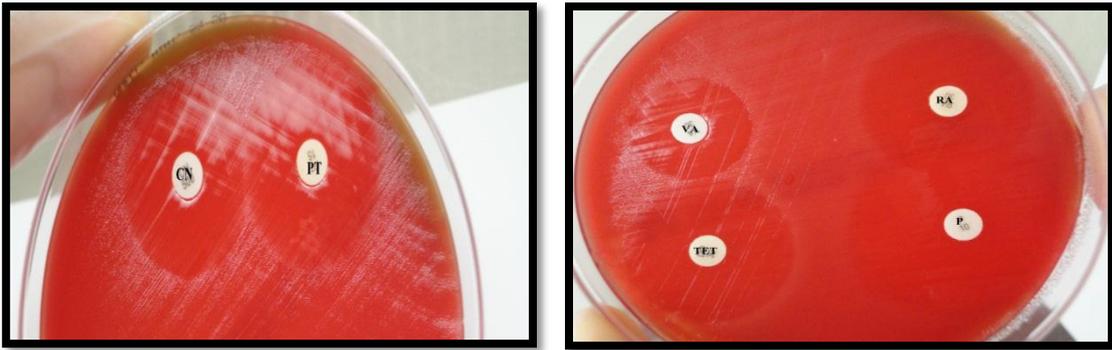


Figure 60: Profil d'antibiogramme de la souche (M4) sensible à la gentamycine, pristinamycine, vancomycine, tétracycline, rifampicine et à la pénicilline.

2.3.2. Résistance aux Macrolides-Lincosammides-Synergestines (MLS) et au Cycline (Tétracycline)

En analysant les profils de résistance aux antibiotiques des souches de *S. agalactiae* étudiées, on note une résistance très élevée vis-à-vis au macrolide (érythromycine), à la clindamycine et à la tétracycline (**Tab. 17**).

Parmi les 93 isolats cliniques, nous avons constaté que 37 sur 93 (40%) étaient résistants à l'érythromycine (dont 20 sur 44 isolats à Guelma (45.4%) contre 17 sur 49 à Marseille (34.7%), $p= 0,2913$).

La résistance à la clindamycine a été trouvée dans 30,1% des isolats (19 SGB sur 44 isolés à Guelma (43.2%) vis-à-vis 9 SGB sur 49 isolés à Marseille (18.36%, $p= 0.0091$).

En revanche, 100% des isolats de Guelma étaient résistants à la tétracycline contre 77,6% (38 SGB sur 49) isolats de Marseille ($p= 0.0008$) (**Tab. 17**).

Tableau 17: Sensibilité aux antibiotiques des 93 souches de *S. agalactiae*.

Souches	Bactamines					Glycopeptide	Aminoside	Macrolide	Tetracycline	Lincosamide	Rifamycines	Streptogramines
	Pename	Cepheme	pénicilline G	amoxicilline	ampicilline	vancomycine	gentamicine	érythromycine		clindamycine	rifampicine	pristinamycine
	oxacilline	céftriaxone										
OXA	CRO	PNG	AX	AMP	VA	CN	E	TET	DA	RA	PT	
A1	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A2	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A3	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A4	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A5	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A6	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A7	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A8	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A9	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A10	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A11	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A12	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A13	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A14	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A15	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A16	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A17	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A18	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A19	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A20	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A21	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A22	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A23	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S

Résultats

A24	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A25	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A26	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A27	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A28	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A29	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A30	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A31	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A32	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A33	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A34	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A35	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A36	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A37	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A38	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A39	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A40	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
A41	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A42	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A43	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
A44	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
M1	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
M2	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
M3	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M5	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M6	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S

Résultats

M7	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M8	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M10	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
M11	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
M12	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
M13	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
M14	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
M15	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M16	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M17	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M18	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M19	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
M20	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M21	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
M22	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M23	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M25	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
M26	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
M27	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
M28	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M29	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
M30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M31	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M32	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M33	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Résultats

M34	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M36	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M37	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
M38	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M40	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M41	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M42	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M43	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
M45	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
M46	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M47	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M48	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M49	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M50	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M52	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
M53	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Le profil d'antibiogramme final est représenté dans la figure ci-dessous, à l'aide du logiciel MeV.

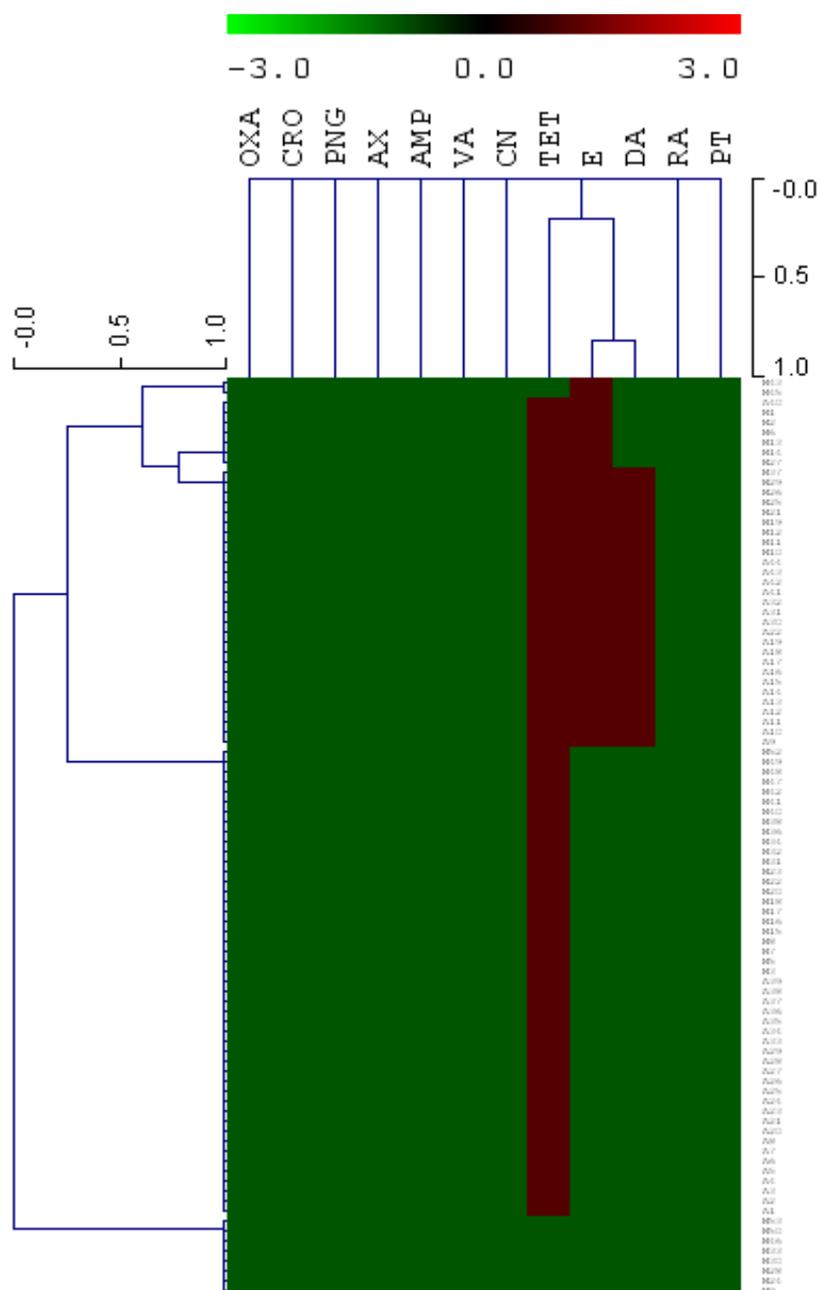


Figure 61: Clustering Hierarching des phénotypes de résistance utilisant le programme MeV.

Cette analyse donne un aperçu général sur les taux de résistance observé dans notre collection.

***En fonction de la source de prélèvement (incluant seulement les prélèvements vaginaux), les résultats sont interprété entre Guelma et Marseille comme suit;**

- La résistance totale à l'érythromycine est de 34 sur 74 (46%) (dont 20 sur 44 isolats à Guelma (45.4%) contre 14 sur 30 à Marseille (46.6%), $p= 0,91$).
- La résistance à la clindamycine a été trouvée dans 37,8% des isolats (19 SGB sur 44 isolés à Guelma (43.2%) vis-à-vis 9 SGB sur 30 isolés à Marseille (30%), $p= 0.25$).

En revanche, 100% des isolats de Guelma étaient résistants à la tétracycline contre 86.6% (26 SGB sur 30) isolats de Marseille ($p= 0.012$).

2.3.3. Phénotypes de résistance

Afin d'obtenir une meilleure interprétation des résistances bactériennes vis-à-vis des molécules testées, les résultats de l'antibiogramme sont traduits en phénotypes des résistances.

Tous les phénotypes de résistance détectés sont fournis dans le **tableau 18**.

➤ **Macrolides-Lincosammides-Synergestines (MLS)**

Les résultats phénotypique sont interprétés dans le **tableau 18** et la **figure 62**.

Tableau 18: Répartition des phénotypes de résistance de 37 isolats cliniques résistants à l'érythromycine à Guelma et à Marseille.

Souches (n=37)	Phénotypes (n)
	Résistance aux macrolides
Guelma n=20 (PV)	cMLS _B (13)
	iMLS _B (6)
	M (1)
Marseille n=14 (PV)	cMLS _B (4)
	iMLS _B (5)
	M (5)
n= 3 (Urine et hémo.)	M (3)

PV. Prélèvement vaginal.

L'analyse des résultats a montré que le phénotype cMLS_B était significativement plus élevée chez les isolats de Guelma par rapport à ceux de Marseille ($p= 0,011$), tandis que le phénotype M a été associé aux isolats de Marseille ($p= 0,002$) (**Tab. 18 et Figs. 63-65**).

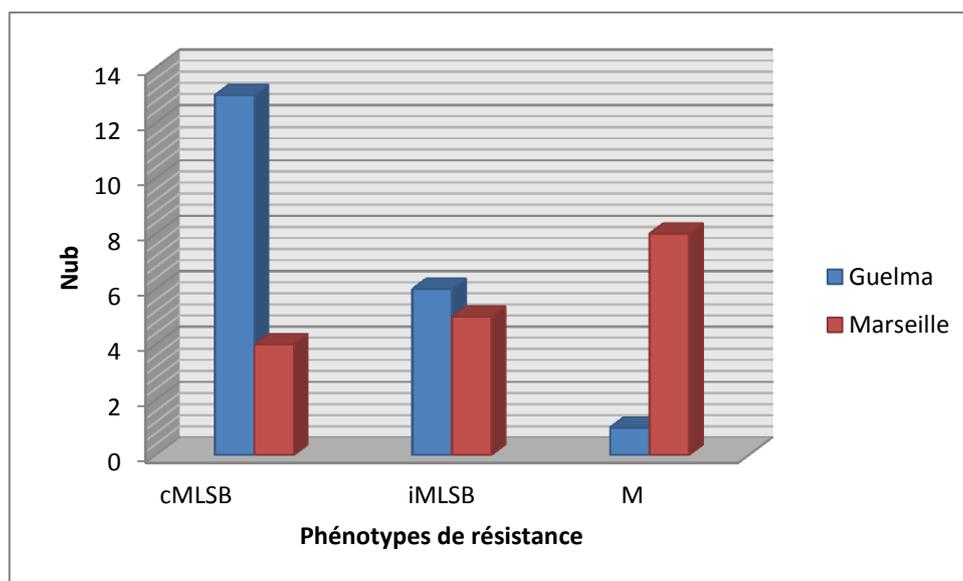


Figure 62: Distribution des phénotypes de résistance entre Guelma et Marseille.

Le phénotype de résistance iMLS_B est répartie en équilibre entre les isolats de Guelma et de Marseille ($p= 0.968$)

Phénotype MLS_B constitutif (cMLS_B): est rendu E résistant, DA résistant sans image d'induction entre E et DA (**Fig.63**).

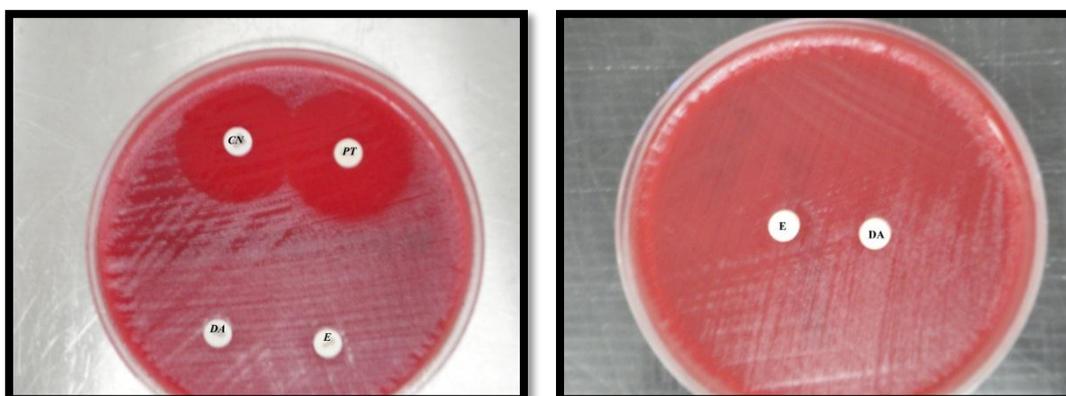


Figure 63: Phénotype MLS_B constitutif.

Phénotype MLS_B inducible (iMLS_B): est rendu E résistant et DA sensible avec une image d'induction entre E et DA (**Fig.64**).

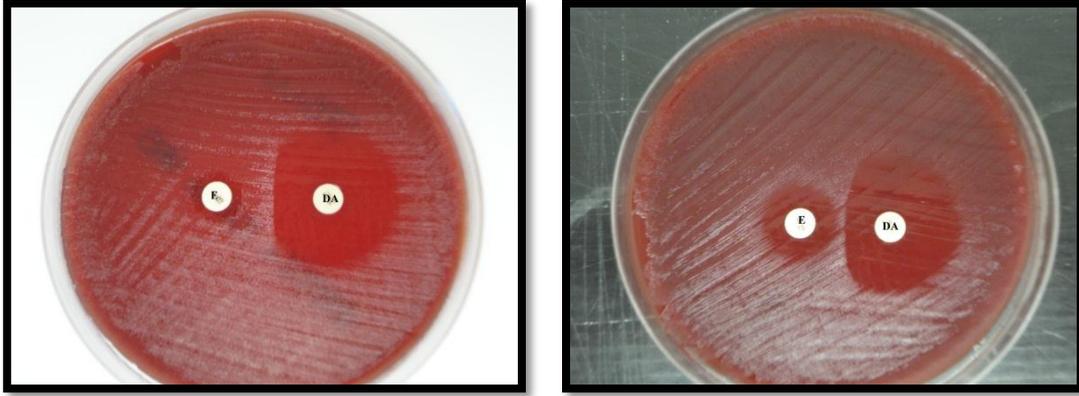


Figure 64: Phénotype MLS_B inducible.

Phénotype M: est rendu érythromycine (E) résistant et clindamycine (DA) sensible sans image d'induction visible (antagonisme) entre E et DA (**Fig.65**).

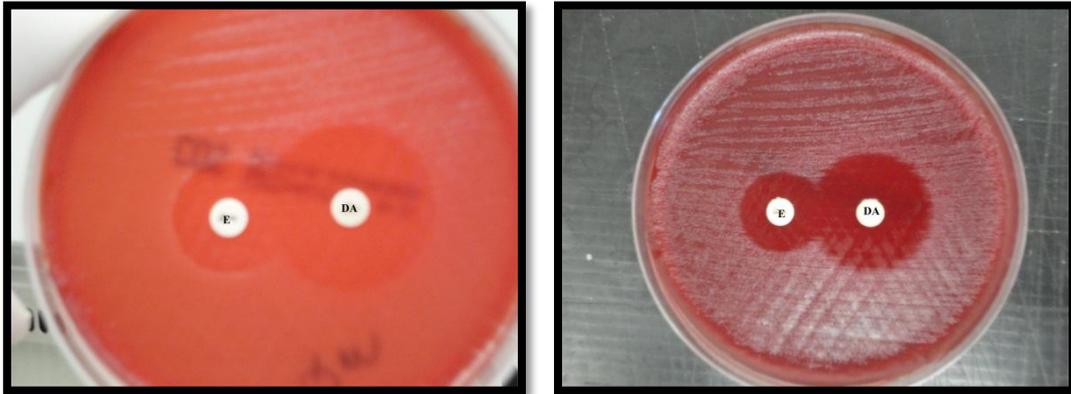


Figure 65: Phénotype M.

Note: D'après les recommandations de CASM-2013/2014; devant une souche résistante à l'érythromycine et sensible à spiramycine ou lincomycine ou clindamycine, la recherche du caractère inducible de cette résistance est obligatoire (antagonisme érythromycine-lincomycine). En l'absence d'induction, répondre sensible à spiramycine, lincomycine et clindamycine. En présence d'induction, répondre résistante à spiramycine, lincomycine et clindamycine.

2.3.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test

La totalité de nos isolats sont sensibles aux β -lactamines. Les concentrations minimales inhibitrices de toutes les SGB vis-à-vis la pénicilline est $<0.25 \mu\text{g/ml}$ (**Fig. 66**).

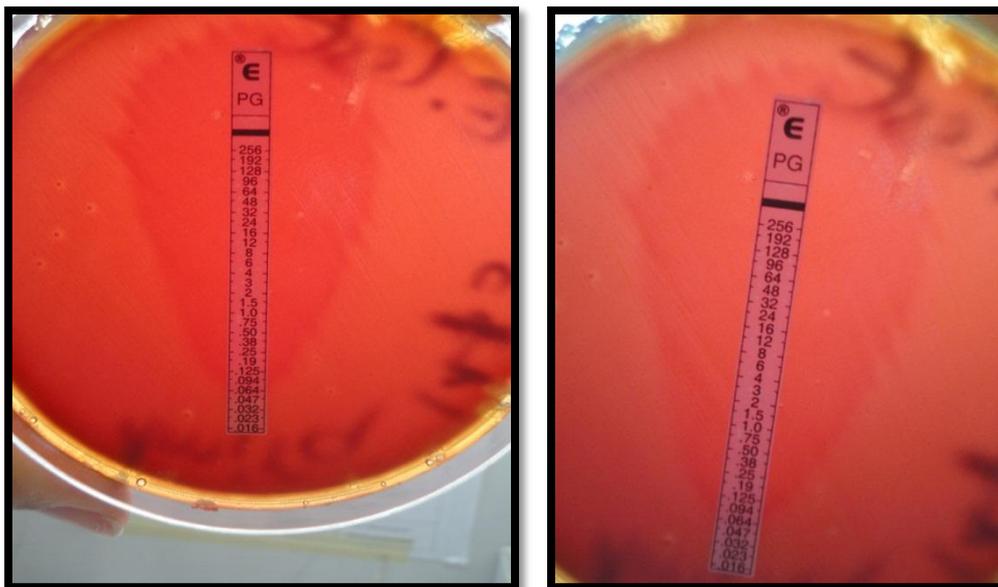
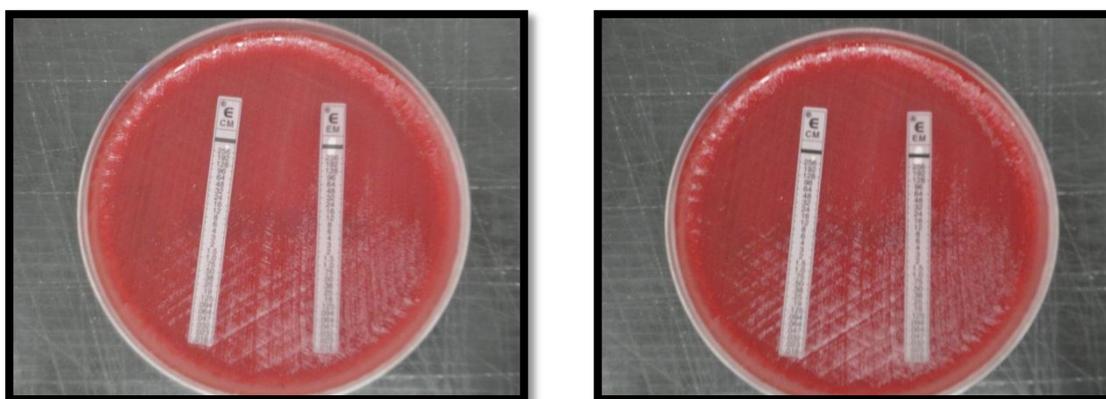


Figure 66: Détermination des CMI d'une souche de SGB sensible à la pénicilline.

En outre; sur les 37 souches résistantes à l'érythromycine, la CMI est $>0.5 \mu\text{g/ml}$ (CASFM-2013).

Les CMI de l'érythromycine et de la clindamycine est réparties en fonction du phénotype de résistance (**Figs 67 et 68**);

-Phénotype cMLS_B: Erythromycine $\geq 8-256 \mu\text{g/ml}$.
Clindamycine $\geq 8-256 \mu\text{g/ml}$.



-a-

- Phénotype iMLS_B: Erythromycine $\geq 4-8-256 \mu\text{g/ml}$.
Clindamycine $\geq 0.125-0.5-8 \mu\text{g/ml}$.

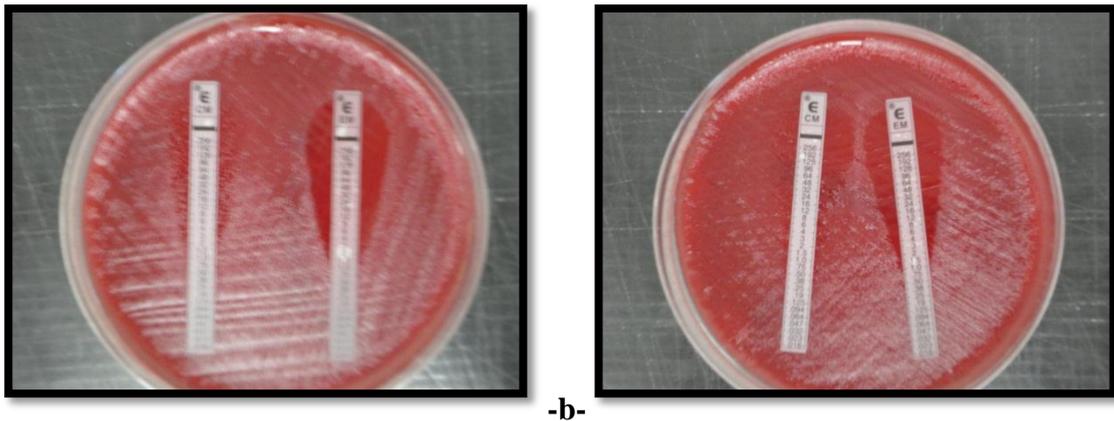


Figure 67: E.test érythromycine et clindamycine (-a- cMLS_B) et (-b- iMLS_B).

- **Phénotype M:** Erythromycine $\geq 2-4-32 \mu\text{g/ml}$.
Clindamycine $\geq 0.06/0.12-1 \mu\text{g/ml}$.

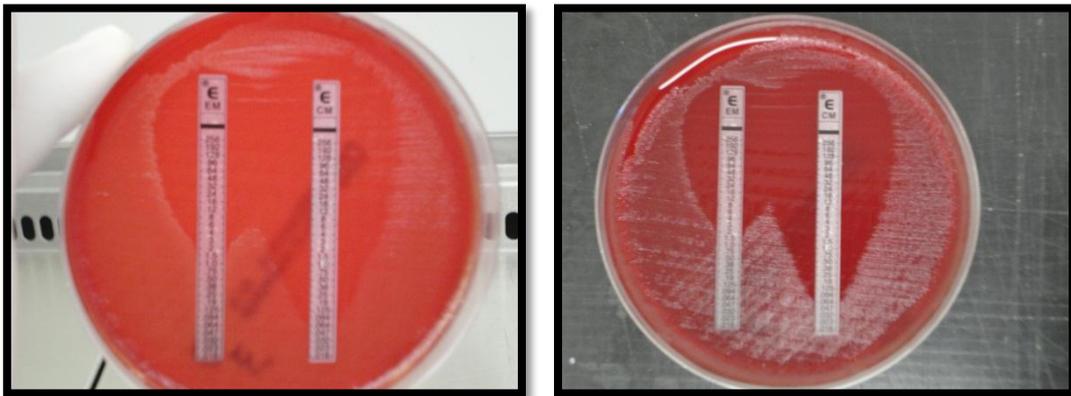


Figure 68: E.test érythromycine et clindamycine (M).

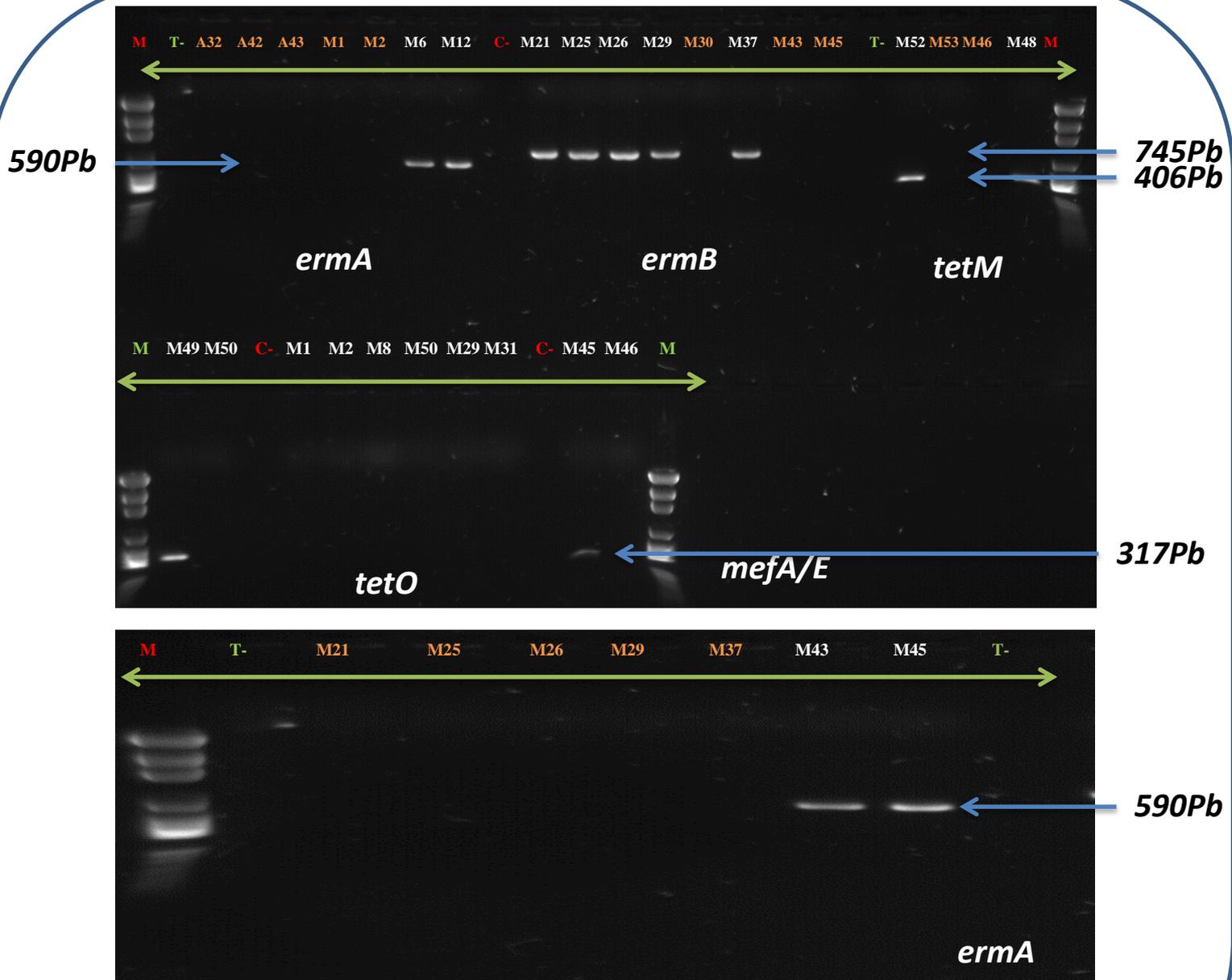
2.3.5. Détermination du support génétique de la résistance

Les résultats obtenus par PCR standard sont révélés par électrophorèse en gel d'agarose. Présence ou absence des bandes correspond à la présence ou l'absence des gènes (**Fig. 69**).



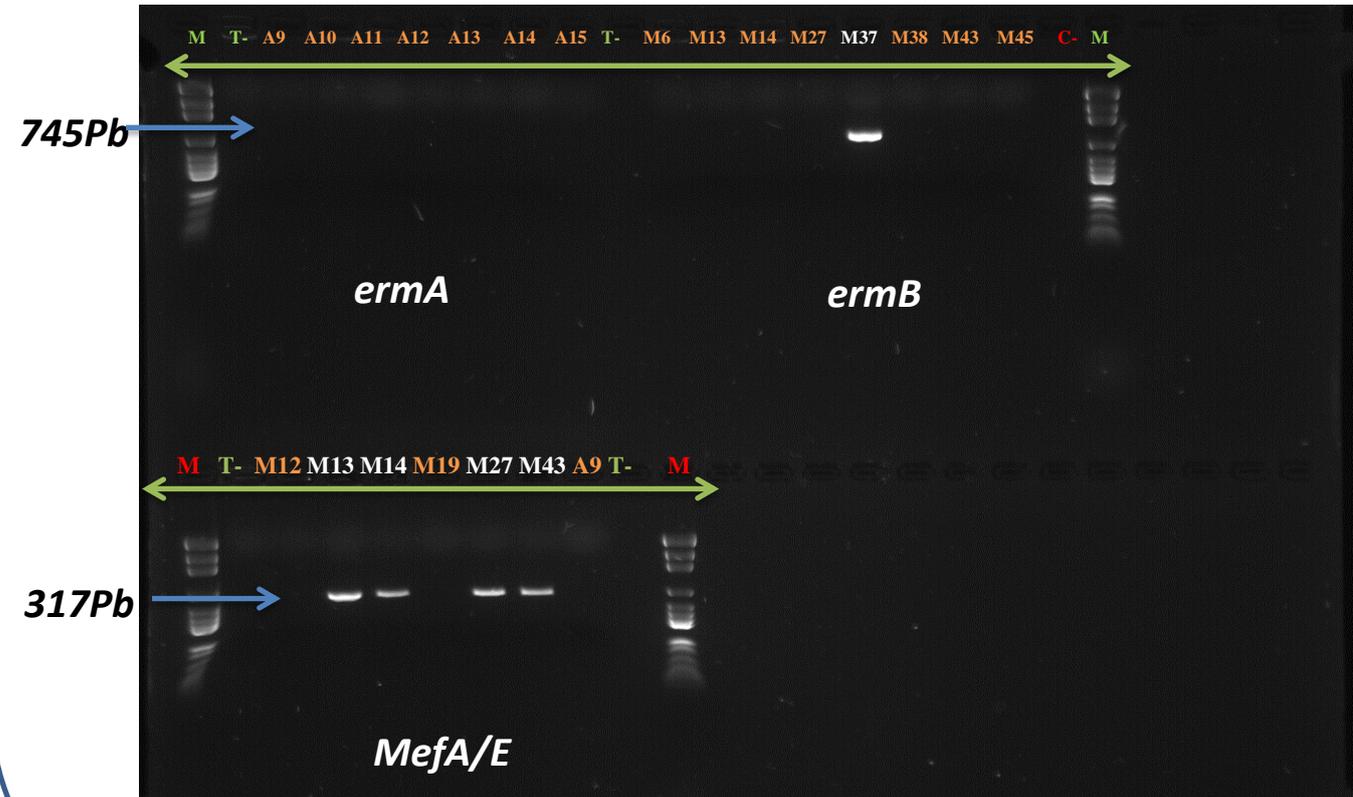
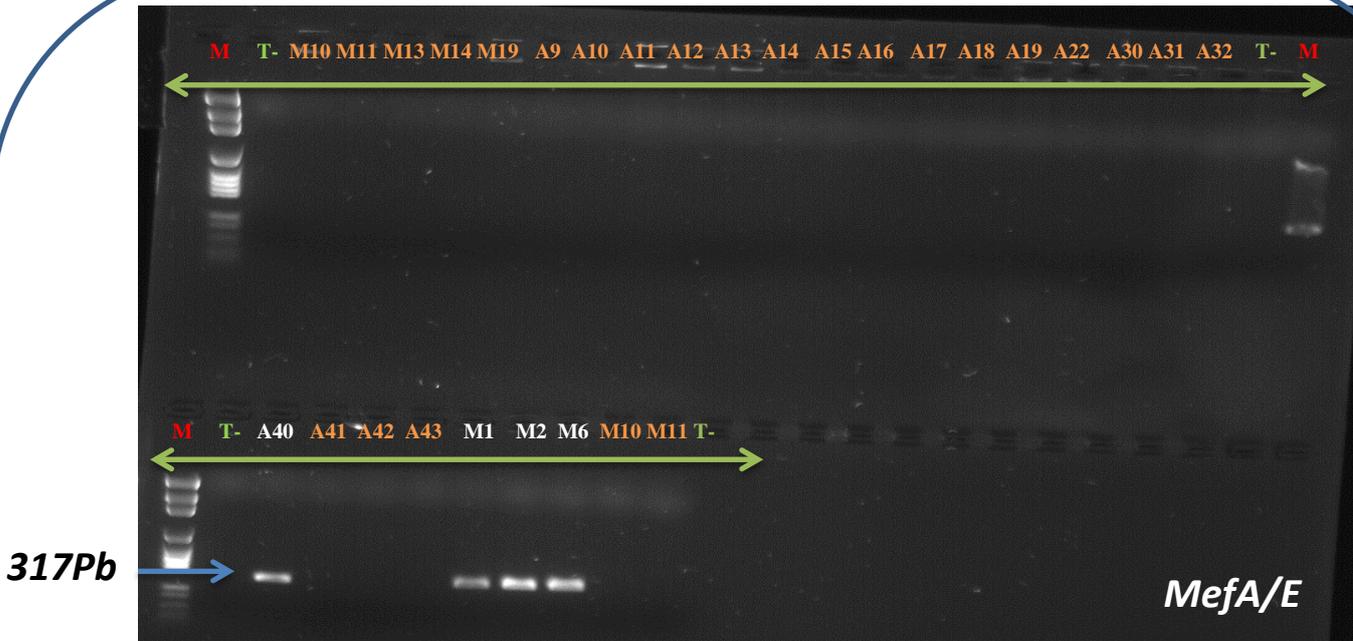
-a-

Électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène *ermA*.



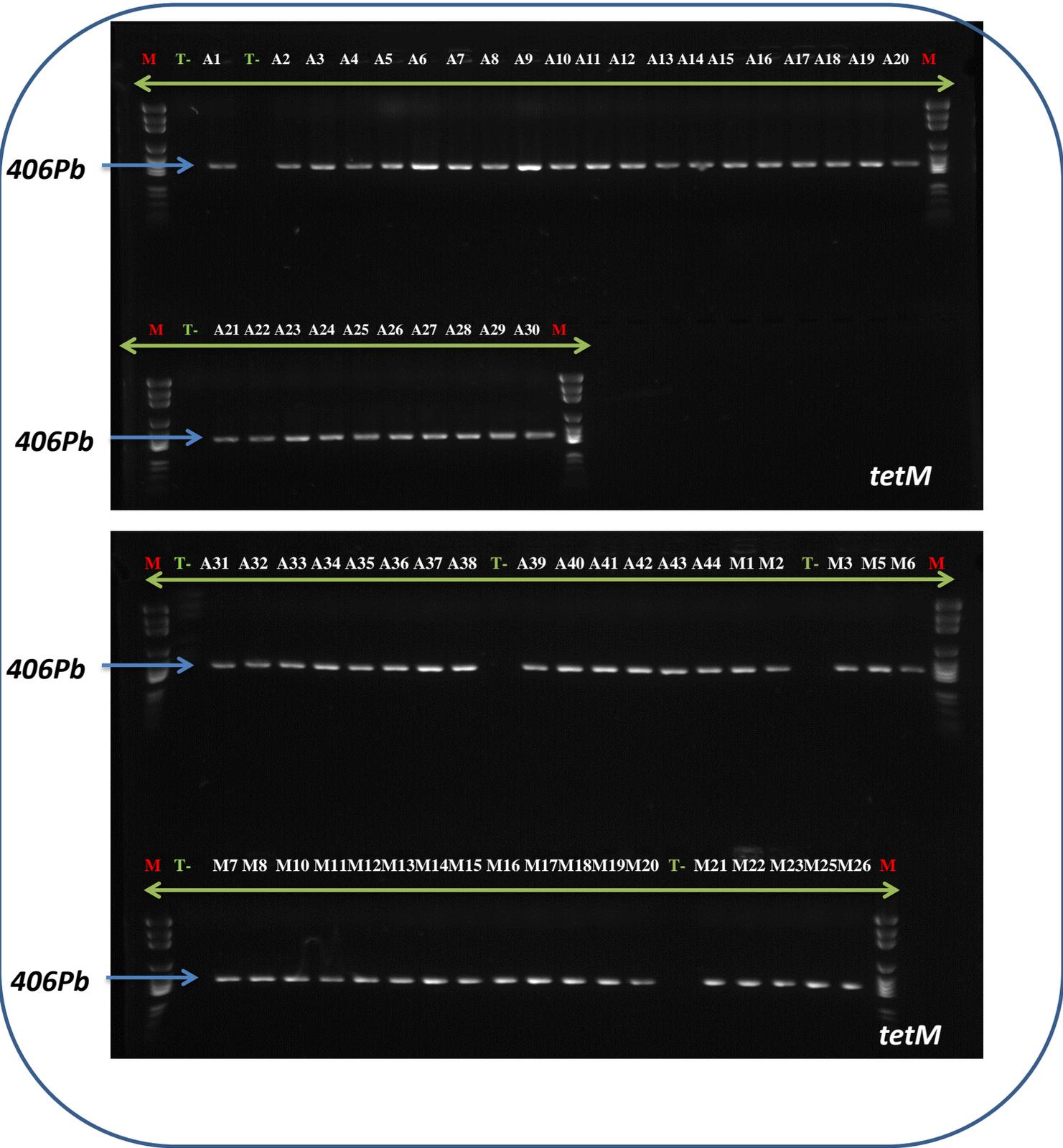
-b-

Électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR des gènes *ermA*, *ermB*, *MefA/E* et *TetM*.



-c-

Électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR des gènes *ermA*, *ermB* et *MefA/E*.



-d-

Électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène *TetM*.

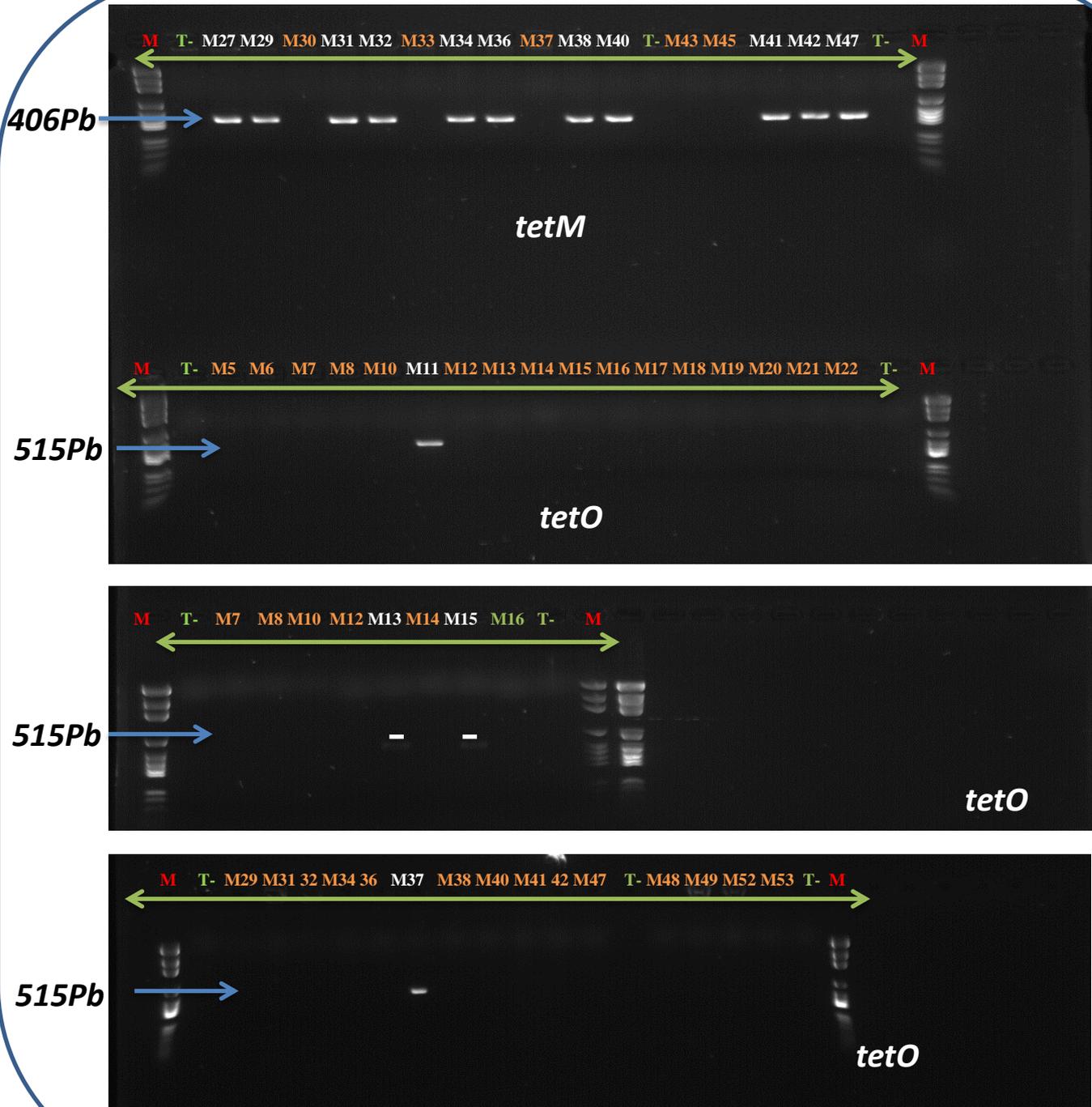


Figure 69 (a-b-c-d): Électrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR. (Gènes; *ermA*, *ermB*, *mefA/E*, *tetM* et *tetO*)

M: marqueur de taille de l'ADN, **Pb:** paire de base.

Note: Toutes les tailles attendues des produits sont révélées par PCR.

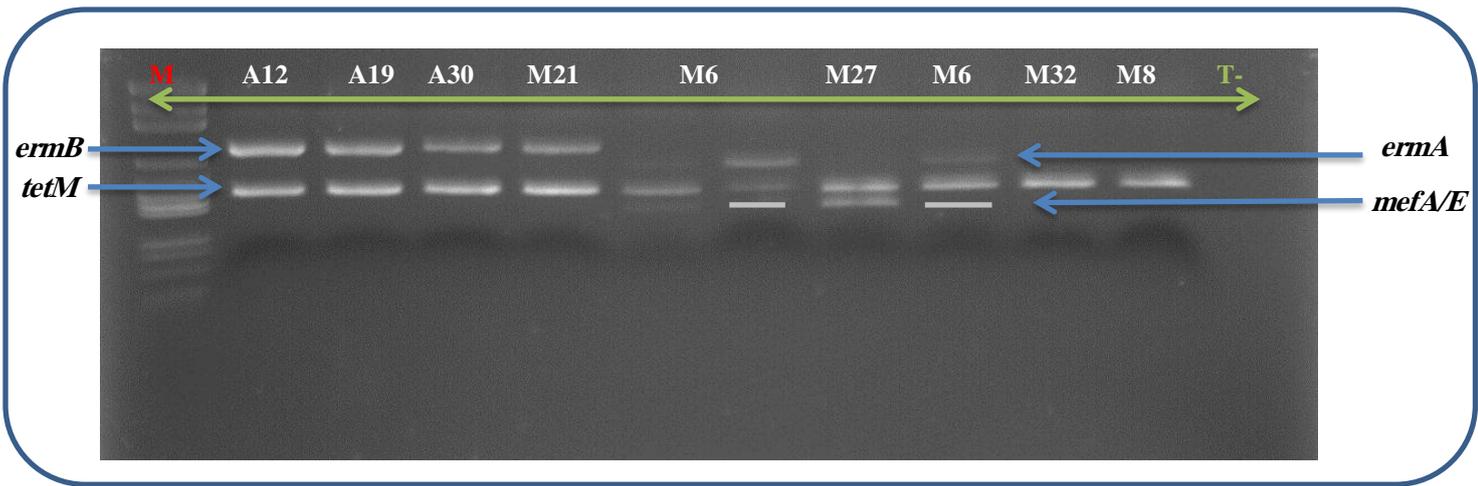


Figure 70: PCR Multiplexe de quelques souches de SGB.

M: marqueur de taille de l'ADN, Pb: paire de base.

2.3.6. Analyse des données

➤ Gènes de résistance eu MLS

Parmi les 37 sur les 93 (40%) isolats résistants à l'érythromycine, le déterminant le plus répandu de la résistance était le gène *ermB* (67,6%). Significativement le gène *ermB* été isolés à Guelma (n= 18) par rapport à Marseille (n= 7, p= 0,001). Inversement le gène *mefA/E* (16,2%) était plus fréquent dans les isolats de Marseille (n= 5) par rapport à ceux de Guelma (n= 1, p= 0,044). Une exception s'est produite chez six souches qui présentent une combinaison de gènes; *ermA/ermB* (8,1%), représenté par un isolat à Guelma et deux isolats à Marseille, et les gènes *ermA/mefA/E* (8,1%) représentés par trois isolats qu'à Marseille (n=3) (Tab. 19 et Fig. 71).

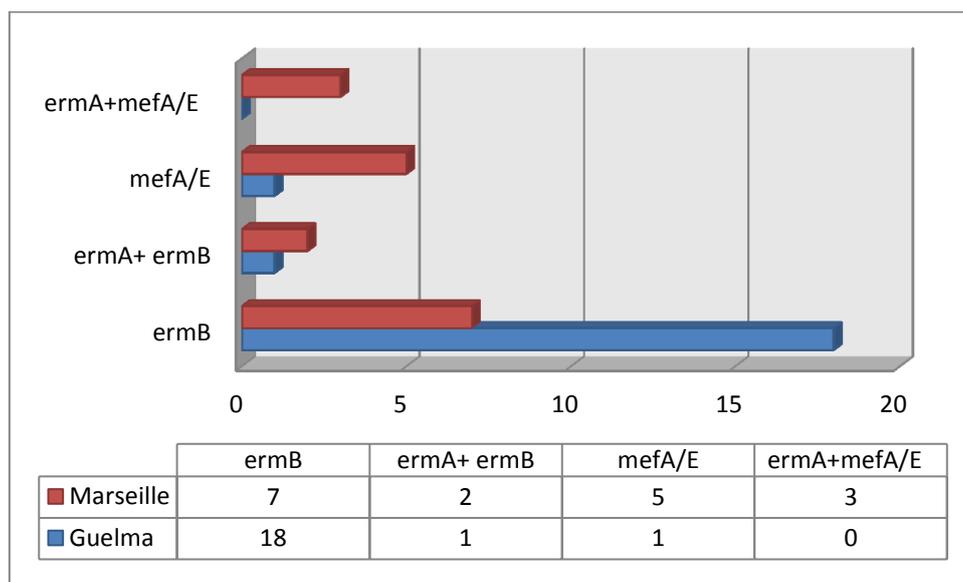


Figure 71: Distributions des gènes de résistance au MLS à Guelma et à Marseille.

Dans notre étude, les souches porteuses du gène *ermB* expriment toutes un phénotype cMLS_B, alors qu'*ermA* s'exprime autant par un phénotype cMLS_B que iMLS_B. Les souches possédant le gène *mefA/E* expriment toutes un phénotype M (Tab. 19).

Tableau 19: Répartition des souches en fonction de l'expression des gènes de résistance vis-à-vis leurs phénotypes entre Guelma et Marseille.

Souches (n=37)	Phénotypes (n)	Génotypes (n)
	Phénotypes de résistance	Gènes de résistance
Guelma n=20 (PV)	cMLS _B (13)	<i>ermB</i> (13)
	iMLS _B (6)	<i>ermA</i> + <i>ermB</i> (1)
		<i>ermB</i> (5)
Marseille n=17 (PV)	M (1)	<i>mefA/E</i> (1)
	cMLS _B (4)	<i>ermB</i> (4)
	iMLS _B (5)	<i>ermA</i> + <i>ermB</i> (2)
n= 3 (Urine et hémocu.)		<i>ermB</i> (3)
	M (5)	<i>mefA/E</i> (4)
		<i>ermA</i> + <i>mefA/E</i> (1)
	M (3)	<i>mefA/E</i> (1)
		<i>ermA</i> + <i>mefA/E</i> (2)

➤ La résistance à la tétracycline

La résistance à la tétracycline représente 88.2% des souches (100% à Guelma et 77.5% à Marseille). Le gène *tetM* a été détecté dans 100% des isolats de Guelma et 89,5% des isolats de Marseille, tandis que le gène *tetO* a été retrouvé dans 1,2% des isolats et une co-occurrence de deux gènes; *tetM* et *tetO*. Cette dernière a été trouvée dans 3,7% des isolats qu'à Marseille seulement. Cependant *tetK* et *tetL* n'ont pas été détectés dans nos isolats (Tab. 20 et Fig. 72).

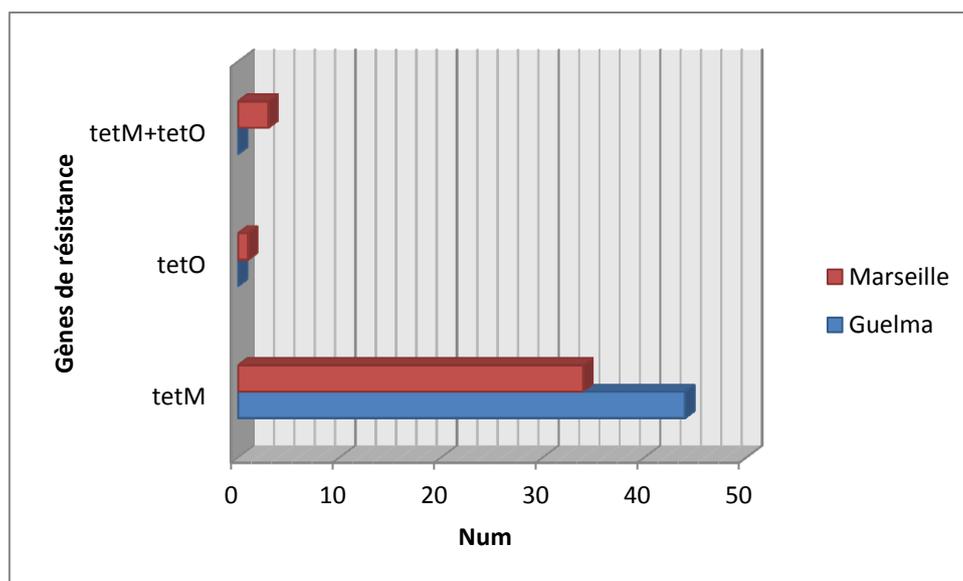


Figure 72: Distribution des gènes de résistance à la tétracycline entre Guelma et Marseille.

Par ailleurs, nous avons observé que la majorité des isolats (96.4% ; n=27) portant le gène *ermB* (n=28) héberge également le gène *tetM* (96,4%) (**Tab. 31**).

Tableau 20: Répartition des phénotypes et génotypes des souches de SGB résistantes à la tétracycline entre Guelma et Marseille.

Souches (n=93)	Phénotype (n)	Génotype (n)
	Résistance à la tetracycline	Gènes de résistance
Guelma n=44 (PV)	44	<i>tetM</i> (44)
Marseille n=30 (PV)	26	<i>tetM</i> (22) <i>tetO</i> (1) <i>tetM+tetO</i> (3)
n=19 (Urine et hémoc.)	12	<i>tetM</i> (12)

2.3.7. Séquençage et analyse des séquences

Après purification et séquençage des produits de PCR, les séquences obtenues sont corrigées à l'aide du logiciel Codon Code Aligner. L'identification des gènes a été confirmée après Blast et comparaison des séquences contre les bases de données ARGANNOT (**Tab. 21**) et NCBI (**Annexe 2**)

Tableau 21: Model du Blast sur ARGANNOT.

	Query id	Database id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap	QSS*	QSE**	DSS***	DSE****	e-value	Bit score
Le gène <i>ermA</i>	M6	(MLS)ErmA:X03216:4551-5282:732	79.59	196	40	0	589	2	6	201	2,00E-87	313
	M6	(MLS)Erm33:AJ313523:163-894:732	67.69	195	63	0	586	2	7	201	4,00E-73	266
	M6	(MLS)ErmT:M64090:168-902:735	60.00	195	78	0	586	2	7	201	6,00E-63	232
	M6	(MLS)ErmY:AB014481:556-1290:735	55.90	195	86	0	586	2	7	201	4,00E-60	223
	M6	(MLS)ErmC:M19652:988-1722:735	57.95	195	82	0	586	2	7	201	4,00E-60	223
Le gène <i>ermB</i>	A15	(MLS)ErmB:M11180:714-1451:738	100.00	177	0	0	542	12	1	177	6,00E-98	348
	A15	(MLS)ErmY:AB014481:556-1290:735	53.11	177	83	0	536	6	4	180	5,00E-49	186
	A15	(MLS)ErmT:M64090:168-902:735	51.98	177	85	0	536	6	4	180	5,00E-47	179
	A15	(MLS)ErmC:M19652:988-1722:735	51.14	176	86	0	536	9	4	179	3,00E-46	177
	A15	(MLS)ErmG:M15332:672-1406:735	51.11	180	87	1	542	6	1	180	2,00E-44	171
	M12	(MLS)ErmB:M11180:714-1451:738	100.00	177	0	0	542	12	1	177	6,00E-98	348
	M12	(MLS)ErmY:AB014481:556-1290:735	53.11	177	83	0	536	6	4	180	5,00E-49	186
	M12	(MLS)ErmT:M64090:168-902:735	51.98	177	85	0	536	6	4	180	5,00E-47	179
	M12	(MLS)ErmC:M19652:988-1722:735	51.14	176	86	0	536	9	4	179	3,00E-46	177
	M12	(MLS)ErmA:X03216:4551-5282:732	48.31	178	92	0	536	3	4	181	1,00E-44	172
Le gène <i>mefA/E</i>	M1	(MLS)MefA:U70055:314-1531:1218	92.22	90	7	0	318	49	13	102	4,00E-44	160
	M1	(MLS)MefA:U70055:314-1531:1218	92.86	14	1	0	44	3	104	117	4,00E-44	28.9
	M1	(MLS)MefB:FJ196385:11084-12313:1230	43.18	88	50	0	315	52	14	101	5,00E-17	78.2
	M2	(MLS)MefA:U70055:314-1531:1218	92.22	90	7	0	317	48	13	102	1,00E-43	160
	M2	(MLS)MefA:U70055:314-1531:1218	85.71	14	2	0	43	2	104	117	1,00E-43	27.3
	M2	(MLS)MefB:FJ196385:11084-12313:1230	43.18	88	50	0	314	51	14	101	5,00E-17	78.2
Le gène <i>tetM</i>	A40	(Tet)TetM:U08812:1981-3900:1920	99.25	133	1	0	5	403	36	168	3,00E-72	262
	A40	(Tet)TetO:M18896:207-2126:1920	76.69	133	31	0	5	403	36	168	7,00E-56	207
	A40	(Tet)TetS:L09756:447-2372:1926	82.40	125	22	0	5	379	36	160	2,00E-54	203
	A40	(Tet)Tet-32:DQ647324:181-2100:1920	71.43	133	38	0	5	403	36	168	2,00E-53	199
	A40	(Tet)TetW:AJ222769:3687-5606:1920	74.42	129	33	0	5	391	36	164	4,00E-53	198
	M11	(Tet)TetM:U08812:1981-3900:1920	99.25	133	1	0	2	400	36	168	3,00E-72	262

	M11	(Tet)TetO:M18896:207-2126:1920	76.69	133	31	0	2	400	36	168	7,00E-56	207
	M11	(Tet)TetS:L09756:447-2372:1926	82.40	125	22	0	2	376	36	160	2,00E-54	203
	M11	(Tet)Tet-32:DQ647324:181-2100:1920	70.90	134	39	0	2	403	36	169	1,00E-53	200
	M11	(Tet)TetW:AJ222769:3687-5606:1920	74.42	129	33	0	2	388	36	164	4,00E-53	198
Le gène <i>tetO</i>	M37	(Tet)TetO:M18896:207-2126:1920	49.17	181	74	7	2	490	5	163	4,00E-32	129
	M37	(Tet)TetO:M18896:207-2126:1920	84.21	76	12	1	79	306	28	102	1,00E-29	121
	M37	(Tet)Tet-32:DQ647324:181-2100:1920	44.09	186	80	8	2	487	5	162	6,00E-27	112
	M37	(Tet)Tet-32:DQ647324:181-2100:1920	71.05	76	22	1	79	306	28	102	2,00E-25	107
	M37	(Tet)TetW:AJ222769:3687-5606:1920	72.37	76	21	1	79	306	28	102	4,00E-26	109
	M15	(Tet)TetO:M18896:207-2126:1920	99.38	161	1	0	2	484	5	165	1,00E-89	313
	M15	(Tet)TetO:M18896:207-2126:1920	73.33	15	4	0	475	519	162	176	1,00E-89	29.6
	M15	(Tet)TetM:U08812:1981-3900:1920	79.38	160	33	0	2	481	5	164	5,00E-71	258
	M15	(Tet)Tet-32:DQ647324:181-2100:1920	78.75	160	34	0	2	481	5	164	2,00E-68	249
M15	(Tet)TetS:L09756:447-2372:1926	80.52	154	30	0	2	463	5	158	4,00E-68	249	

Le pourcentage le plus élevé d'identité du blaste correspond au gène recherché.

Les résultats obtenues révèlent que les gènes qui codent pour la résistance à l'érythromycine appartenaient au variant *ermA*, *ermB* et *mefA/E*, et la majorité des gènes qui codent pour la résistance à la tétracycline appartenaient au gène *tetM* et une faible proportion du gène *tetO*.

2.3.8. Arbre phylogénétique

Le logiciel MEGA 5 est un système intégré qui fournit des outils pour effectuer un alignement automatique et manuel, inférer des arbres phylogénétiques, estimer des taux de l'évolution moléculaire, déduire des séquences ancestrales et de tester des hypothèses d'évolution. Son objectif consistait à explorer, découvrir, et analyser l'ADN et les séquences protéiques dans une perspective évolutive (Figs. 73-75).

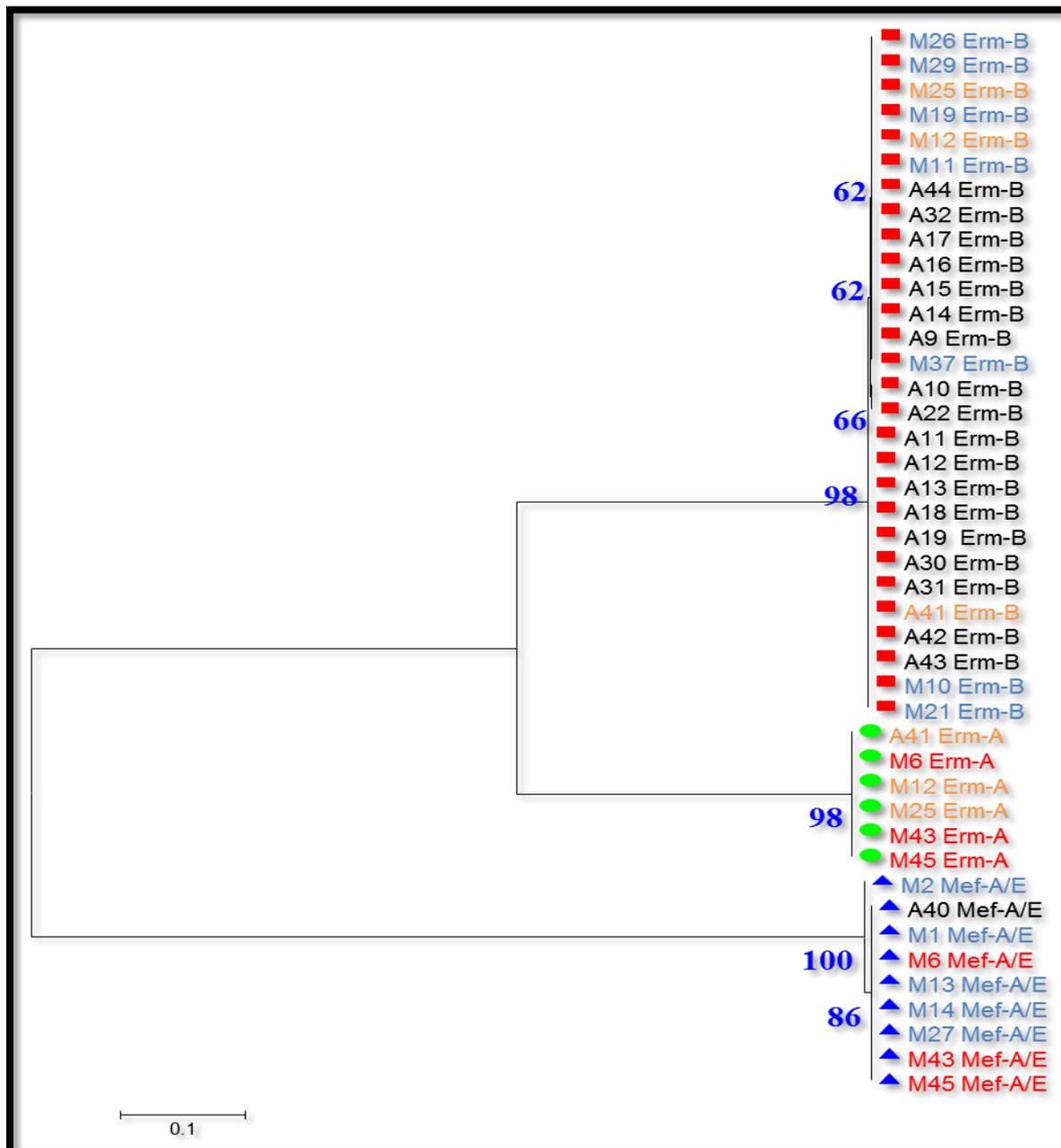


Figure 73: Arbre phylogénétique des gènes *ermA*, *ermB* et *mefA/E*.

L'emplacement des souches est exprimé en couleurs en fonction de la combinaison des gènes; *ermB* (Noir), *ermA+ermB* (Orange) et *ermA+mefA/E* (Rouge).

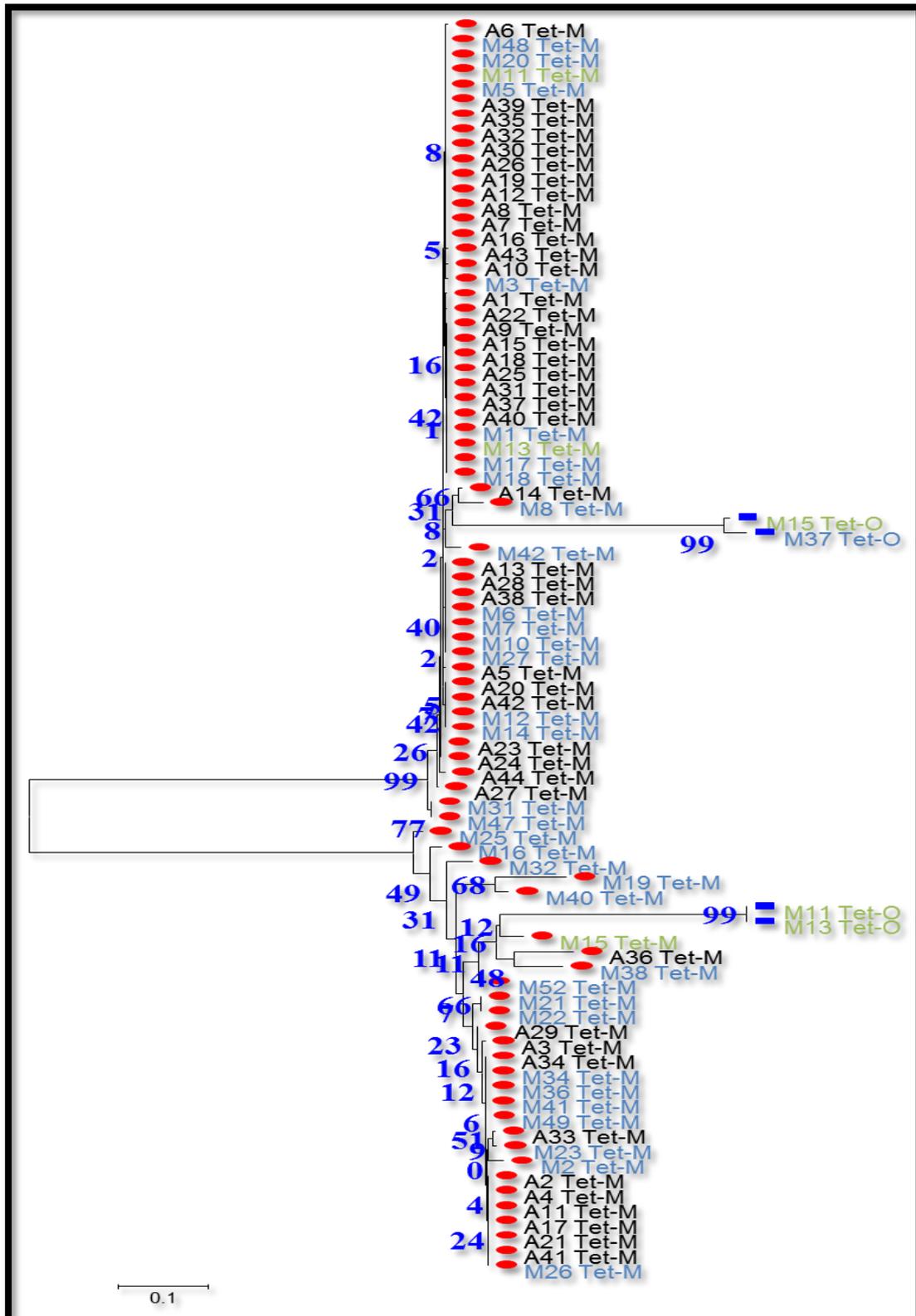


Figure 74: Arbre phylogénétique des gènes *tetM* et *tetO*.

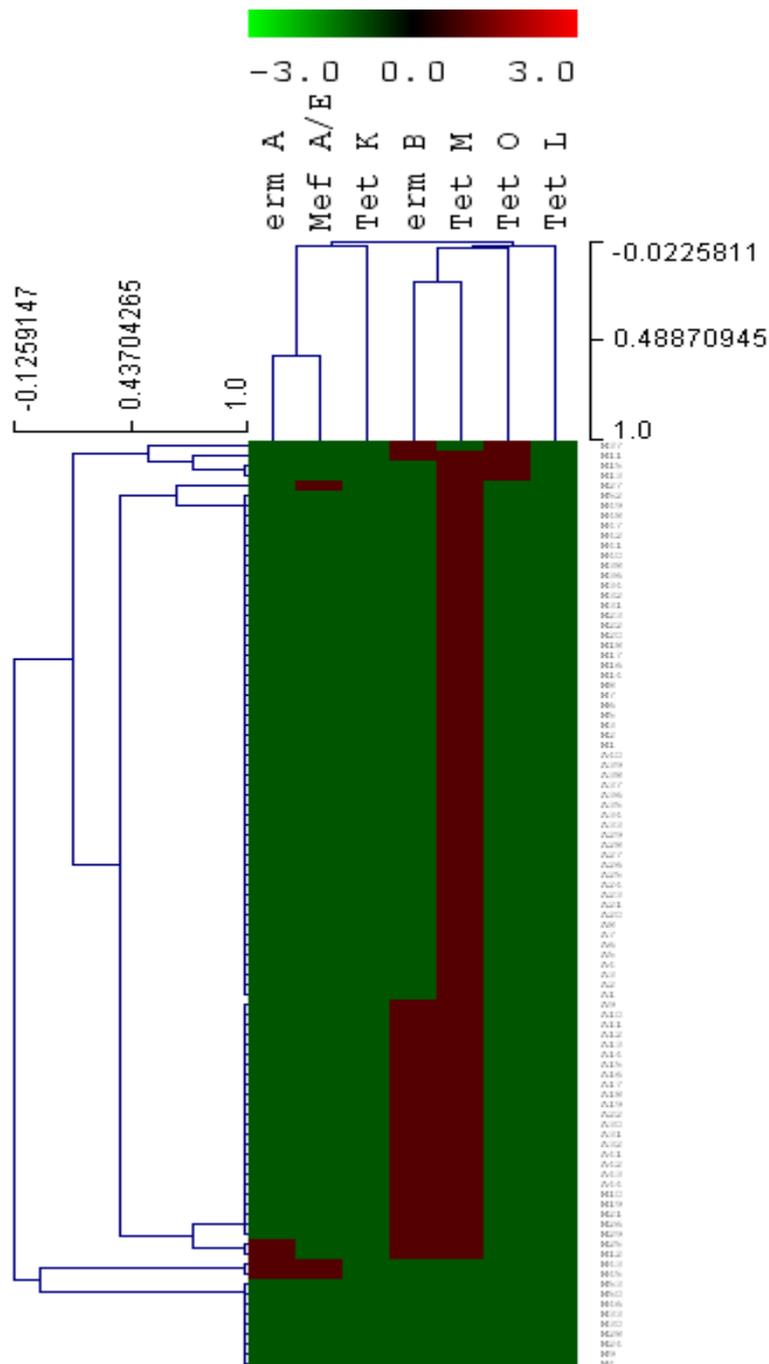


Figure 76: Clustering Hierarchical des gènes de résistances utilisant le programme MeV.

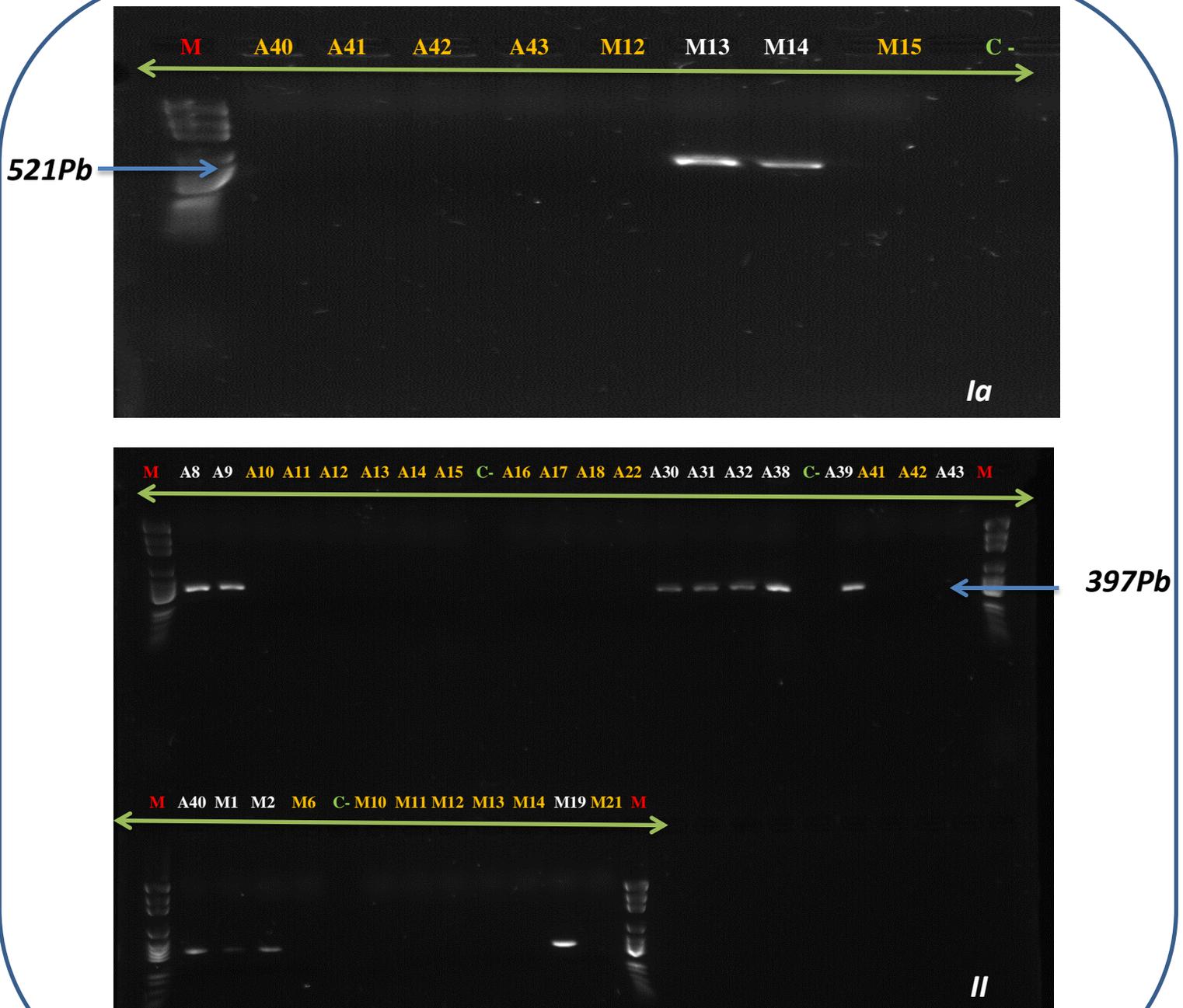
Cette figure montre que les gènes *ermB* et *TetM* dominent notre collection.

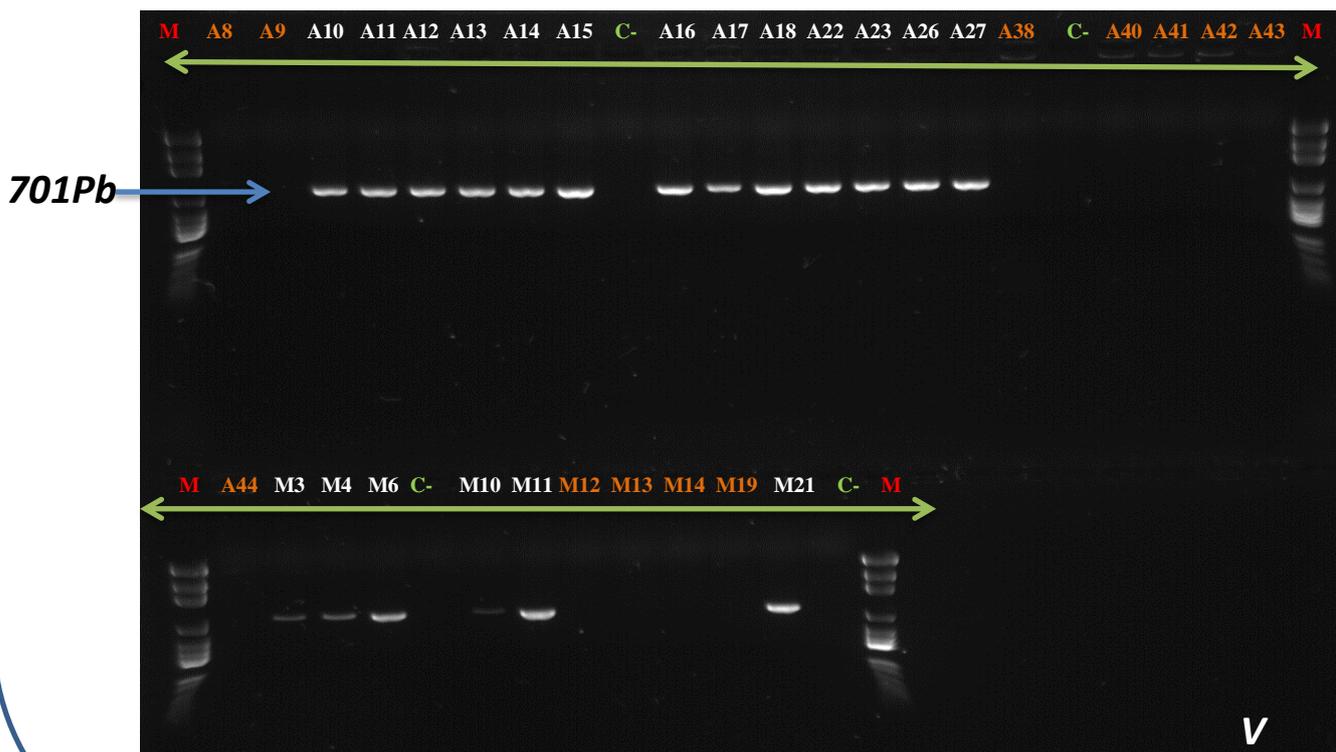
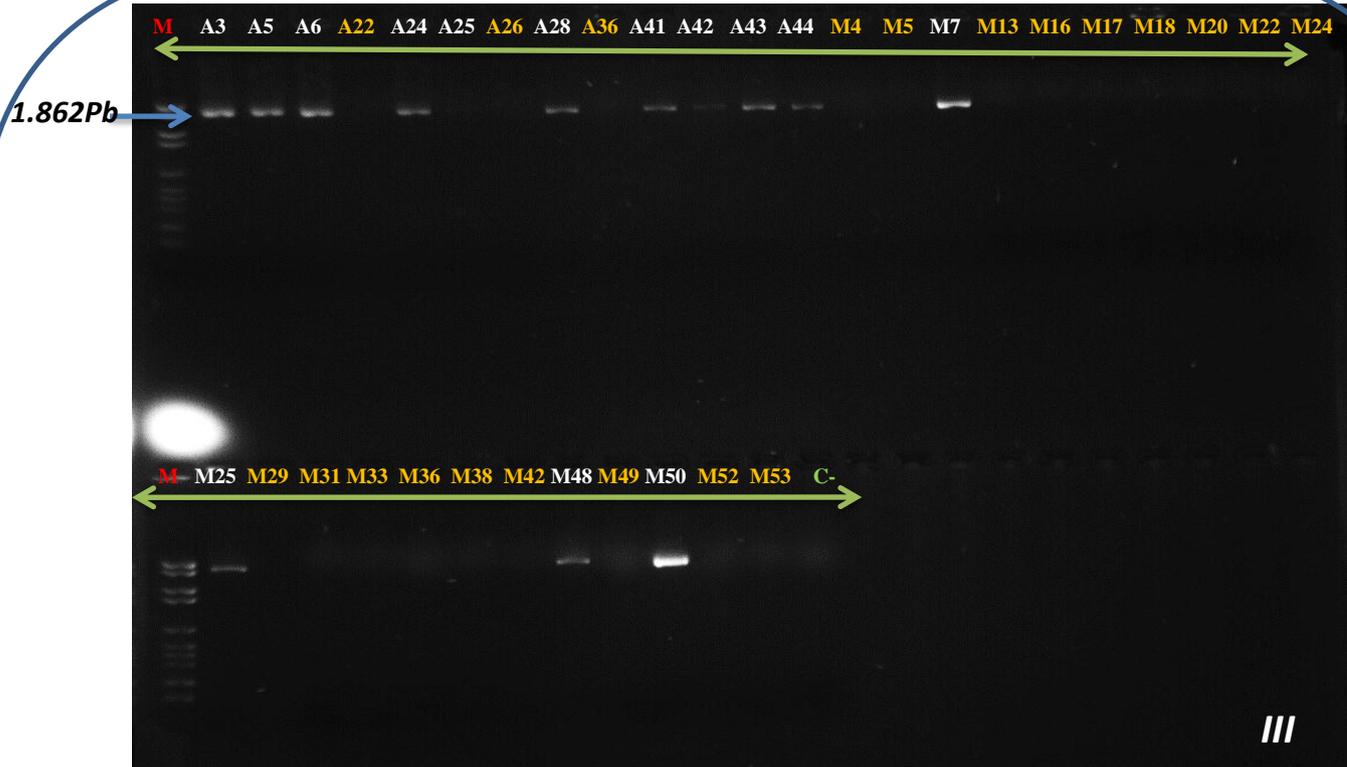
2.3.9. Sérotypes moléculaires

Les images obtenues après électrophorèse et révélation par trans-illumination montrent des fragments de taille variable, allant de 521 à 1.826 paires de bases d'après la méthode de Poyart et *al.*, (**Annexe 3**), et entre 179 et 688 pb d'après la technique de Imperi et *al.*, (**Annexe 4**) en fonction des sérotypes.

Résultats

Nous avons aussi révélé la présence ou l'absence d'un sérotype par PCR monoplexe. Les résultats sont représentés dans les figures ci-dessous.





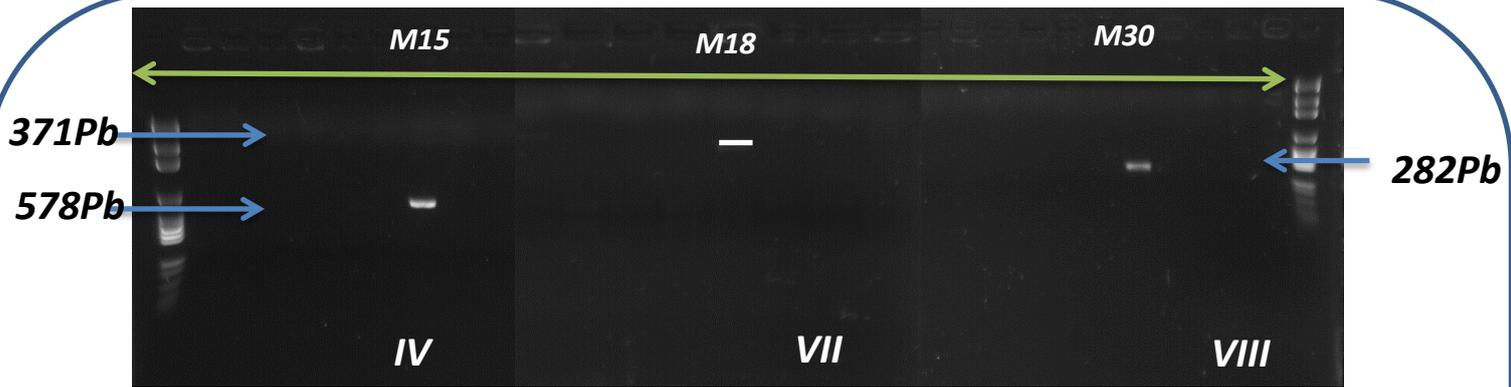


Figure 77: Typage moléculaire par PCR monoplexe.

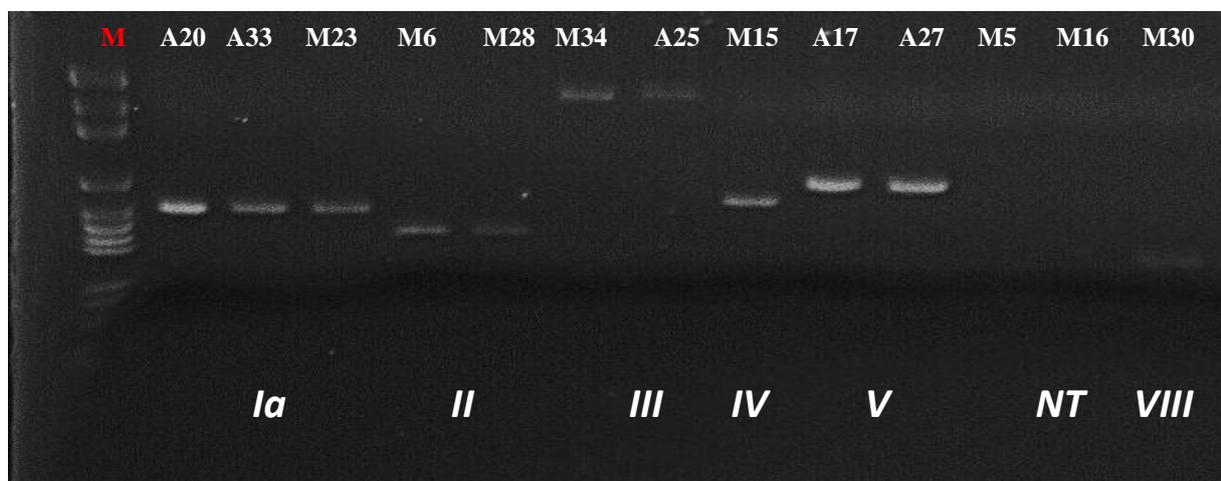


Figure 78: PCR multiplexe de quelques souches sérotypés.

Note: Toutes les tailles attendues des produits sont révélées par PCR. D'autres résultats de PCR sont illustrés dans l'**annexe 5**.

En fonction des fragments obtenus, nous avons pu déterminer les sérotypes de 87 sur 93 souches testées. Par contre, Six souches de Marseille sont **non typable** (absence des bandes); M5, M16, M17, M22, M36 et M53.

➤ **Prévalence et analyse des sérotypes**

La distribution globale des sérotypes est mentionnée dans le **tableau 22** et la **figure 79** ci-dessous.

Tableau 22: Répartition globale des sérotypes.

Sérotypes	nb	%
Ia	9	9,6
Ib	0	0
II	17	18,3
III	17	18,3
IV	1	1,1
V	41	44,1
VI	0	0
VII	1	1,1
VIII	1	1,1
IX	0	0
NT	6	6,4

L'analyse des données montre que le sérotype V est prédominant dans notre étude (41, soit 44.1% des souches).

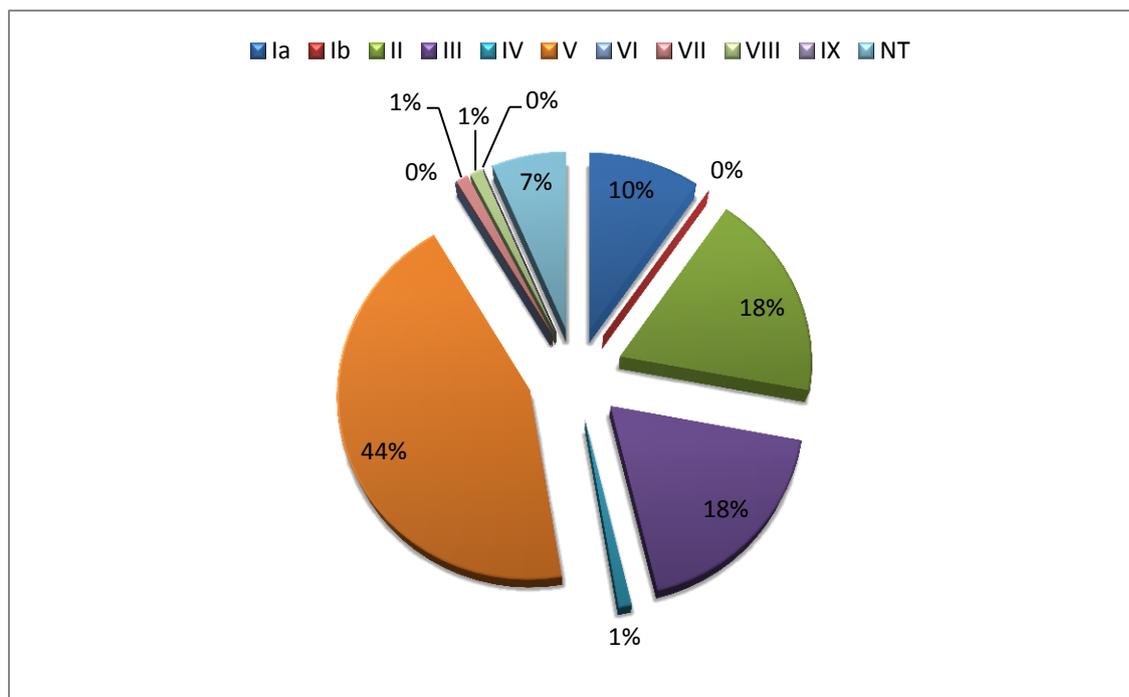


Figure 79: Répartition globale des sérotypes.

Dix-sept souches sont des sérotypes II et III chacun (18.3% des souches). Le sérotype Ia est présent chez moins de 10% des souches (9 souches). Finalement, les sérotypes IV, VII et VIII comptent chacun une seule souche.

** La distribution des sérotypes en fonction de l'origine des souches (Guelma vis-à-vis de Marseille) a montré que;

Les isolats de Guelma ont été significativement associés au sérotype V (21 souches/44 soit 47.8%) suivie des sérotypes II (25%), III (22.7%) et Ia (4.5%) (**Fig. 80**).

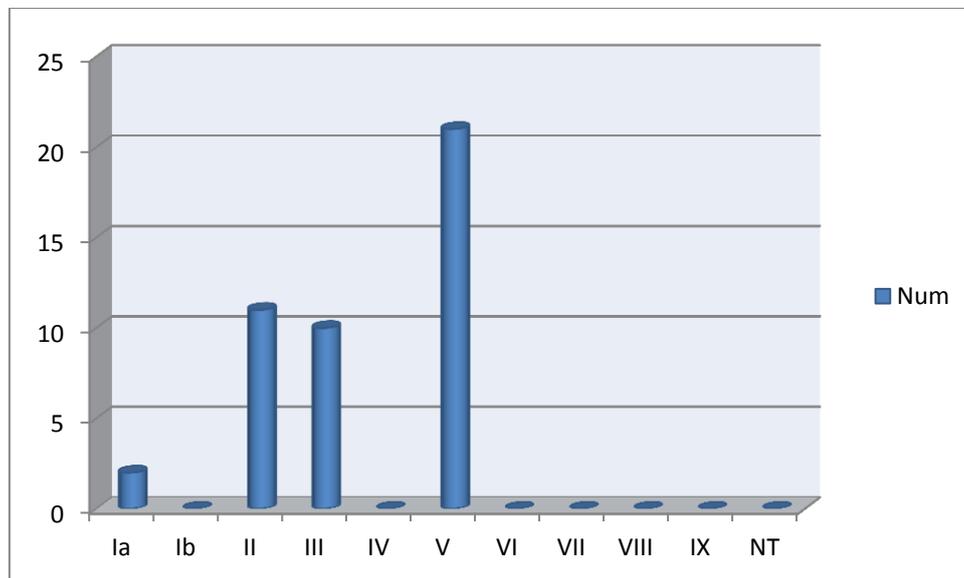


Figure 80: Répartition des sérotypes identifiés à Guelma.

La répartition des sérotypes des souches isolées de Marseille sont distribuées comme suit: le sérotype V (20 souches/49 soit 40.8%), III (14.3%), Ia et II (12.3%). 2 % pour les sérotypes IV, VII et VIII chacun et finalement 12.2% des souches sont non typables (NT) (**Fig. 81**).

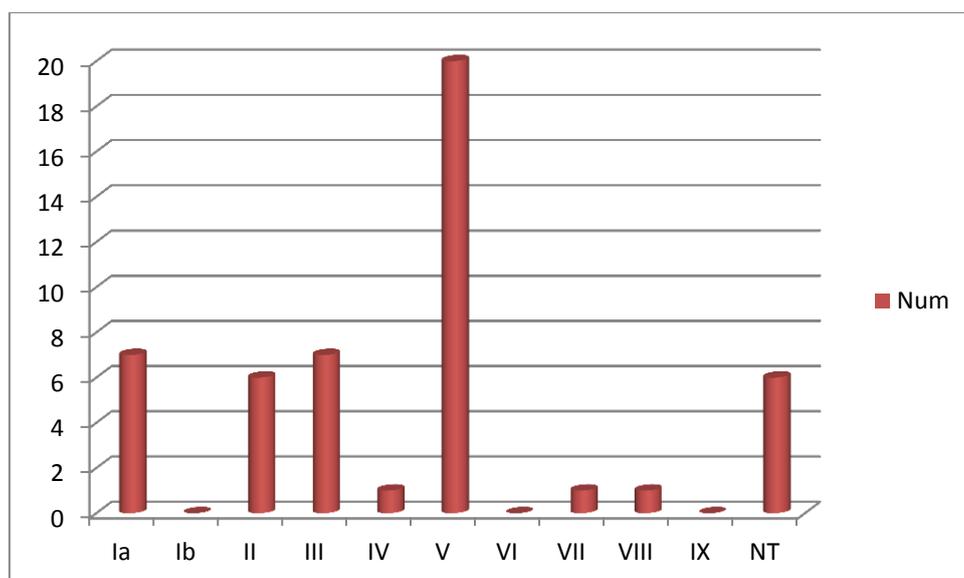


Figure 81: Répartition des sérotypes identifiés à Marseille.

Les différences proportionnel entre les deux régions est montré dans la **figure 82**.

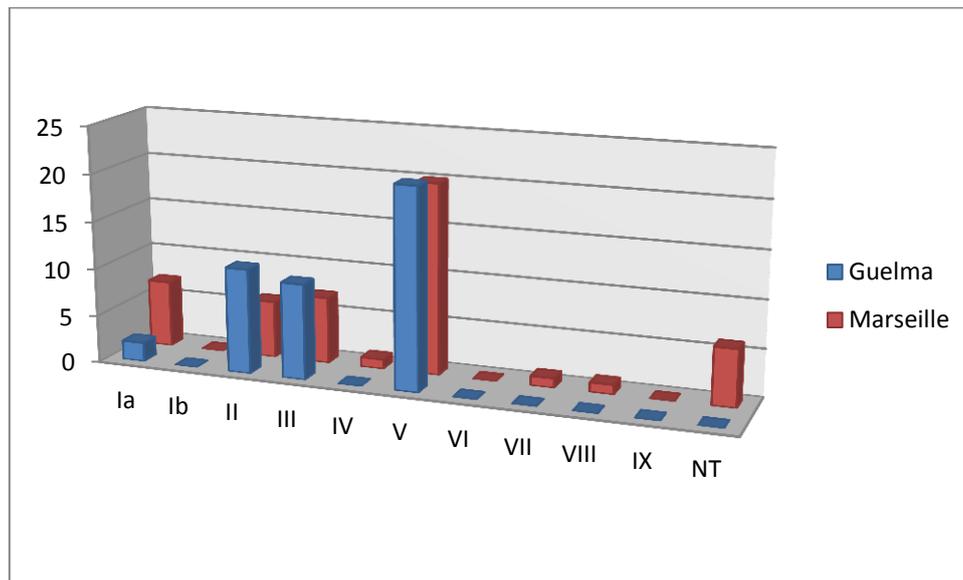


Figure 82: Répartition des sérotypes entre Guelma et Marseille.

Le type capsulaire V prédomine dans ces deux groupes, tandis que les souches non typables dominent seulement la collection Marseillaise.

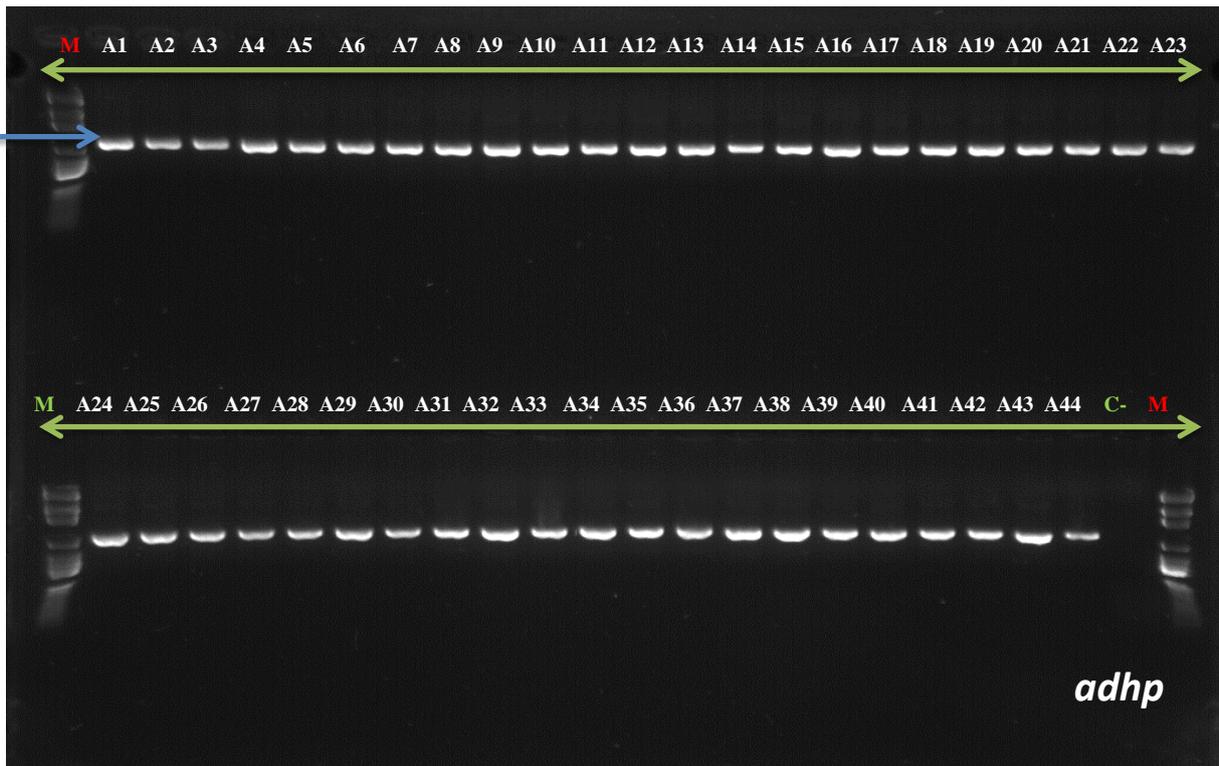
*les sérotypes des souches appartenant seulement au prélèvement vaginaux dans notre collection sont répartie comme suit; Ia (13.3%), II (10%), III (13.3%), IV (3.3%), V (40%), VII (3.3%), VII (3.3%), et NT (13.3%). Ces données montrent que les sérotypes V et III dominent cette collection.

Note: Pour toutes les souches de sérotype III, la recherche du clone hyper-virulent 17 a été effectuée. Seulement trois souches de sérotype III possède la séquence ST-17 qu'à Marseille.

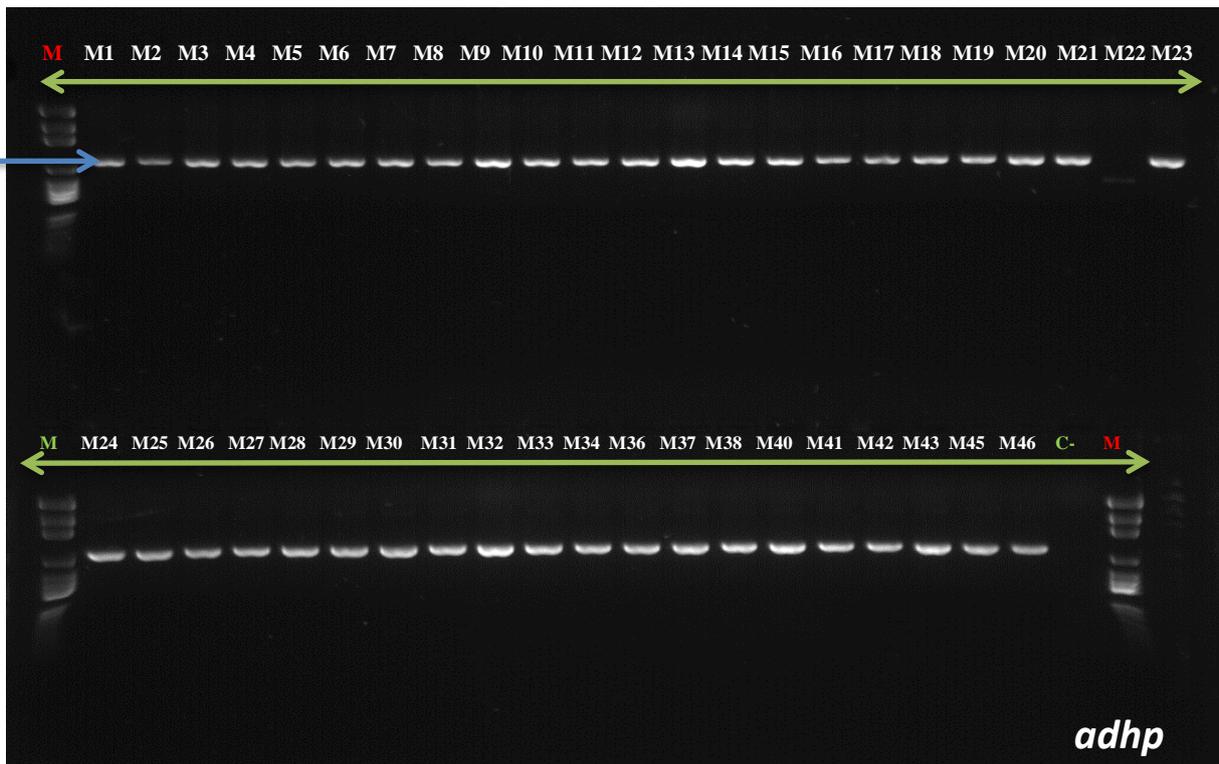
2.3.10. Génotypage par Multi-Locus Séquence Typing (MLST)

L'enquête sur la clonalité des 93 souches de *S. agalactiae*, a été faite par une amplification par PCR standard et un séquençage des sept gènes de ménage *adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK* et *tkl* (**Fig. 83**) précédemment rapportés. Les séquences obtenues après le séquençage ont été soumises à une base de données PubMLST (<http://pubmlst.org/sagalactiae/>), afin d'accorder pour chaque gène un profil allélique. La combinaison des 7 allèles obtenue à partir des 7 locus sélectionnée permet de définir une séquence type (ST) pour chaque souche. Les résultats sont exprimés dans le **tableau 23**.

672Pb



672Pb



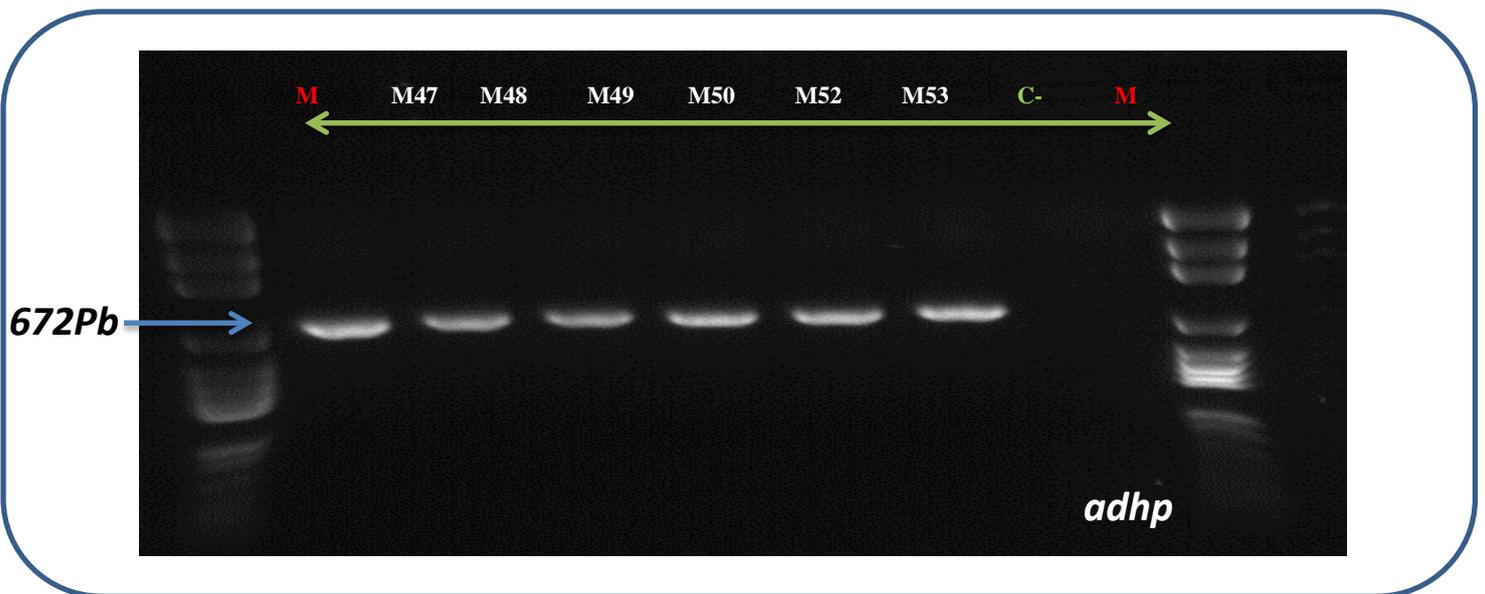


Figure 83: Profil électrophorétique du gène *adhP* des 93 souches de SGB.

Le typage génomique multilocus (MLST) des 93 souches des SGB, a révélé qu'elles appartiennent à 37 différents types de STs. La moitié des isolats sont regroupés dans les STs les plus fréquemment rencontrés (ST-1, ST-10, ST-17, ST-19 et ST-23), quelques STs rares ont été rencontrés (**Tab. 24** et **Fig. 84**).

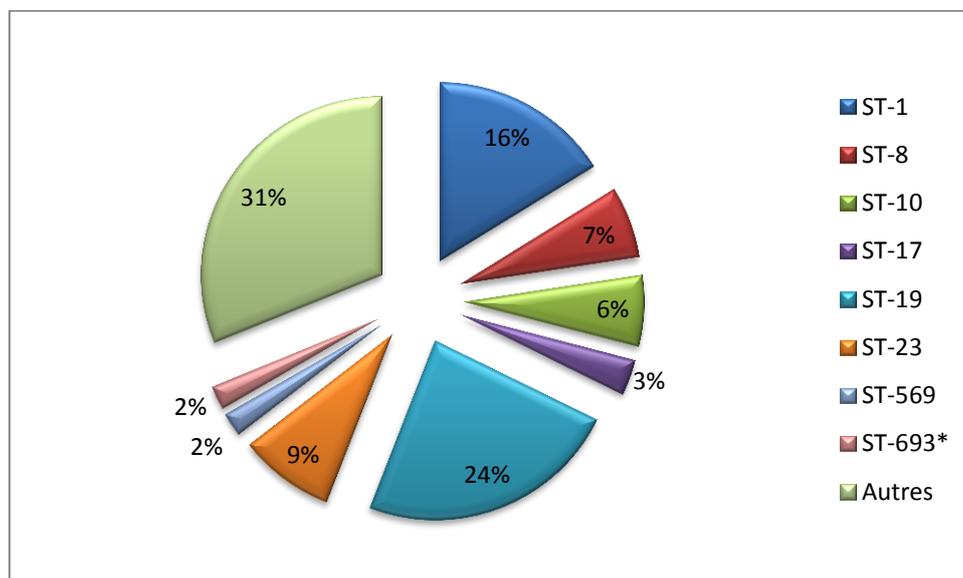


Figure 84: Répartition globale des séquences types.

La majorité des STs ont été décrits précédemment, en outre, 16 nouvelles séquences types ont été identifiées pour la première fois dans le monde (nouvelles combinaisons d'allèles), 7 à Guelma et 9 à Marseille (**Fig. 85** et **Tab. 23**).



Figure 85: Soumission d'un nouveau ST dans la base de données Pub MLST (Capture écran).

Ces nouvelles séquences types ont été saisies dans la base de données *S. agalactiae* MLST (<http://pubmlst.org/sagalactiae>) pour attribuer les nouveaux codes des STs; du 685 à 700 (**Fig. 85** et **Tab. 23**).

Tableau 23: Profile alléliques (STs) des 93 souches de SGB.

Souches	Allèles							Séquence Type
	adhP	PheS	AtR	GlnA	SdhA	GlcK	TkT	ST
A1	adhP: 1	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkt: 2	1
A2	adhP: 1	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkt: 2	1
A3	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA: 2	sdhA: 2	glcK: 2	tkt: 2	19
A4	adhP: 1	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkt: 2	1
A5	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkt: 2	19
A6	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkt: 2	19
A7	adhP: 9	pheS: 1	atr: 4	glnA: 1	sdhA: 3	glcK: 3	tkt: 2	10
A8	adhP: 9	pheS: 1	atr: 4	glnA: 1	sdhA: 3	glcK: 3	tkt: 2	10
A9	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA: 2	sdhA: 2	glcK: 2	tkt: 2	19
A10	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA: 2	sdhA: 2	glcK: 2	tkt: 2	19
A11	adhP: 46	pheS: 1	atr: 3	glnA: 2	sdhA: 2	glcK: 2	tkt: 2	233
A12	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkt: 2	19
A13	adhP:1	pheS: 33	atr: 2	glnA:1	sdhA: 1	glcK: 2	tkt: 2	460
A14	adhP: 118	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkt: 2	685*
A15	adhP: 1	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkt: 2	1
A16	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkt: 2	19
A17	adhP: 5	pheS: 4	atr: 6	glnA: 3	sdhA: 2	glcK: 54	tkt: 54	686*
A18	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 35	glcK: 2	tkt: 2	687*
A19	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:	sdhA: 29	glcK: 2	tkt: 43	688*

A20	adhP: 5	pheS: 4	atr: 3	glnA: 3	sdhA: 2	glcK: 1	tkr: 3	166
A21	adhP: 1	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkr: 2	1
A22	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA: 1	sdhA: 14	glcK: 2	tkr: 2	689*
A23	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA: 2	sdhA: 2	glcK: 2	tkr: 2	19
A24	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkr: 2	19
A25	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkr: 2	19
A26	adhP: 38	pheS: 2	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkr: 2	677
A27	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkr: 2	19
A28	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkr: 2	19
A29	adhP: 9	pheS: 1	atr: 4	glnA: 1	sdhA: 3	glcK: 3	tkr: 2	10
A30	adhP: 1	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkr: 2	1
A31	adhP: 1	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkr: 2	1
A32	adhP: 1	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkr: 2	1
A33	adhP: 1	pheS: 1	atr: 6	glnA: 42	sdhA: 2	glcK: 2	tkr: 2	158
A34	adhP: 1	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkr: 2	1
A35	adhP: 9	pheS: 1	atr: 7	glnA: 1	sdhA: 3	glcK: 3	tkr: 2	690*
A36	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 42	tkr: 2	521
A37	adhP: 9	pheS: 1	atr: 4	glnA: 1	sdhA: 3	glcK: 3	tkr: 2	10
A38	adhP: 1	pheS: 10	atr: 3	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 12	tkr: 2	563
A39	adhP: 9	pheS: 1	atr: 1	glnA: 1	sdhA: 3	glcK: 1	tkr: 2	569
A40	adhP: 1	pheS: 16	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkr: 2	241
A41	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkr: 2	19
A42	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkr: 2	19
A43	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkr: 2	19
A44	adhP: 1	pheS: 33	atr: 4	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkr: 2	691*
M1	adhP: 5	pheS: 4	atr: 6	glnA: 3	sdhA: 2	glcK: 1	tkr: 3	23
M2	adhP: 5	pheS: 4	atr: 6	glnA: 3	sdhA: 2	glcK: 1	tkr: 3	23
M3	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkr: 2	19
M4	adhP: 10	pheS: 1	atr: 4	sdhA: 1	sdhA: 3	glcK: 3	tkr: 28	692*
M5	adhP: 4	pheS: 1	atr: 4	sdhA: 1	sdhA: 3	glcK: 3	tkr: 2	8
M6	adhP: 46	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkr: 2	693*
M7	adhP: 2	pheS: 1	atr: 1	glnA:2	sdhA: 1	glcK: 1	tkr: 1	17
M8	adhP: 5	pheS: 4	atr: 6	glnA: 3	sdhA: 2	glcK: 1	tkr: 3	23
M9	adhP: 5	pheS: 4	atr: 6	glnA: 3	sdhA: 2	glcK: 1	tkr: 23	320
M10	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkr: 2	19
M11	adhP: 122	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkr: 2	694*
M12	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkr: 2	19
M13	adhP: 5	pheS: 4	atr: 6	glnA: 3	sdhA: 2	glcK: 1	tkr: 3	23
M14	adhP: 5	pheS: 4	atr: 6	glnA: 3	sdhA: 2	glcK: 1	tkr: 3	23
M15	adhP: 1	pheS: 33	atr: 3	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 12	tkr: 2	695*
M16	adhP: 4	pheS: 1	atr: 4	glnA: 1	sdhA: 3	glcK: 3	tkr: 2	8
M17	adhP: 4	pheS: 4	atr: 4	glnA: 1	sdhA: 3	glcK: 3	tkr: 2	696*
M18	adhP: 4	pheS: 1	atr: 4	glnA: 1	sdhA: 3	glcK: 3	tkr: 2	8

M19	adhP: 9	pheS: 1	atr: 4	glnA: 1	sdhA: 3	glcK: 3	tkk: 2	10
M20	adhP: 4	pheS: 1	atr: 4	glnA: 1	sdhA: 3	glcK: 3	tkk: 2	8
M21	adhP: 1	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkk: 2	1
M22	adhP: 1	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkk: 2	1
M23	adhP: 5	pheS: 4	atr: 6	glnA: 3	sdhA: 2	glcK: 1	tkk: 3	23
M24	adhP: 46	pheS: 1	atr: 3	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkk: 2	697*
M25	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA: 2	sdhA: 2	glcK: 2	tkk: 2	19
M26	adhP: 46	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkk: 2	693*
M27	adhP: 5	pheS: 4	atr: 6	glnA: 3	sdhA: 2	glcK: 1	tkk: 3	23
M28	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA: 5	sdhA: 2	glcK: 2	tkk: 2	28
M29	adhP: 46	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkk: 2	321
M30	adhP: 1	pheS:37	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 22	glcK: 2	tkk: 2	698*
M31	adhP: 4	pheS: 1	atr: 4	glnA: 1	sdhA: 3	glcK: 3	tkk: 2	8
M32	adhP: 5	pheS: 4	atr: 6	glnA: 3	sdhA: 2	glcK: 1	tkk: 3	23
M33	adhP: 1	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkk: 2	1
M34	adhP: 2	pheS: 1	atr: 1	glnA: 2	sdhA: 1	glcK: 1	tkk: 1	17
M36	adhP: 4	pheS: 1	atr: 4	glnA: 1	sdhA: 3	glcK: 3	tkk: 2	8
M37	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA: 4	sdhA: 2	glcK: 5	tkk: 2	106
M38	adhP: 9	pheS: 1	atr: 1	glnA: 1	sdhA: 3	glcK: 1	tkk: 2	569
M40	adhP: 5	pheS: 4	atr: 4	glnA:3	sdhA: 2	glcK: 3	tkk: 3	24
M41	adhP: 10	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 3	tkk: 2	699*
M42	adhP: 1	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkk: 2	1
M43	adhP: 1	pheS: 1	atr: 2	glnA: 1	sdhA: 1	glcK: 2	tkk: 2	1
M45	adhP: 1	pheS: 1	atr: 2	glnA: 37	sdhA: 1	glcK: 2	tkk: 2	700*
M46	adhP: 1	pheS: 1	atr: 2	glnA:1	sdhA: 1	glcK: 2	tkk: 2	1
M47	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkk: 2	19
M48	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA:2	sdhA: 2	glcK: 2	tkk: 2	19
M49	adhP: 1	pheS: 4	atr: 3	glnA: 2	sdhA: 2	glcK: 2	tkk: 2	190
M50	adhP: 2	pheS: 1	atr: 1	glnA: 2	sdhA: 1	glcK: 1	tkk: 1	17
M52	adhP: 1	pheS: 1	atr: 3	glnA: 2	sdhA: 2	glcK: 2	tkk: 2	19
M53	adhP: 9	pheS: 1	atr: 4	glnA: 1	sdhA: 3	glcK: 3	tkk: 2	10

*Les nouveaux STs révélés dans cette étude.

Les séquences types les plus représentés dans cette étude sont; le ST-1 (**15** souches soit 16.1%), le ST-8 (**6** souches soit 6.5%), le ST-10 (6 souches soit 6.5%), le ST-17 (**3** souches soit 3.2%), ST-19 (**22** souches soit 23.7%) et le ST-23 (**8** souches soit 8.6%) (**Tab. 24**).

Tableau 24: Distribution des séquences type (STs) entre Guelma et Marseille.

ST	Origines des souches (n)	Nb (totale)	%
ST-1	G (9)- M (6)	15	16,1
ST-8	G (0)- M (6)	6	6,5
ST-10	G (4)- M (2)	6	6,5
ST-17	G (0)- M (3)	3	3,2
ST-19	G (15)- M (7)	22	23,7
ST-23	G (0)- M (8)	8	8,6
ST-569	G (1)- M (1)	2	2,1
ST-693*	G (0)- M (2)	2	2,1
Autres	G (15)- M (14)	29	31,2
Totale	G (44)- M (49)	93	100

G, Guelma; M, Marseille; ST, Séquence Type; *Nouveau ST

Les séquences type les plus répandus à Guelma sont; le ST-19 suivi par le ST-1, par contre à Marseille les séquences types sont réparties quasiment en équilibre; ST-23, ST-19, ST-1 et ST-8 (**Fig. 86**).

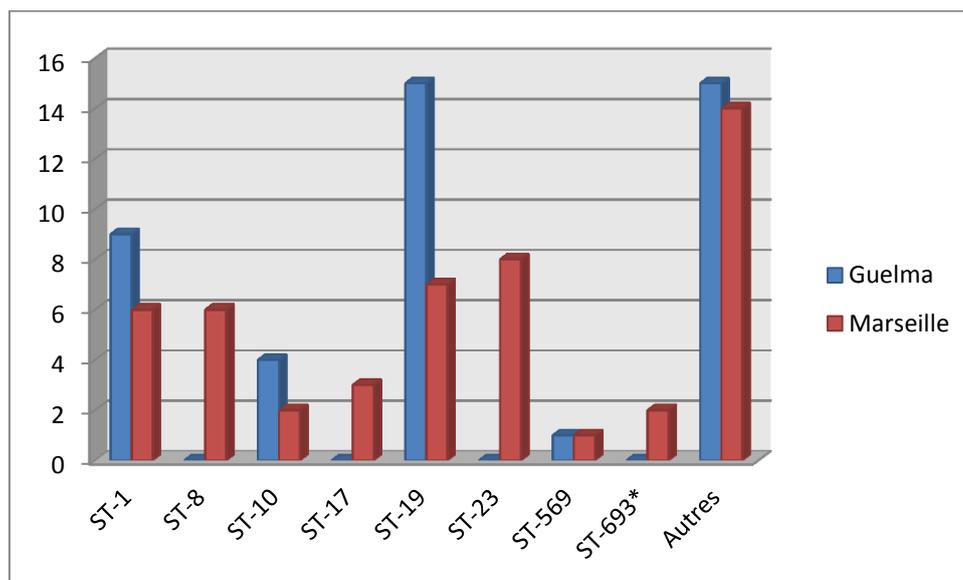


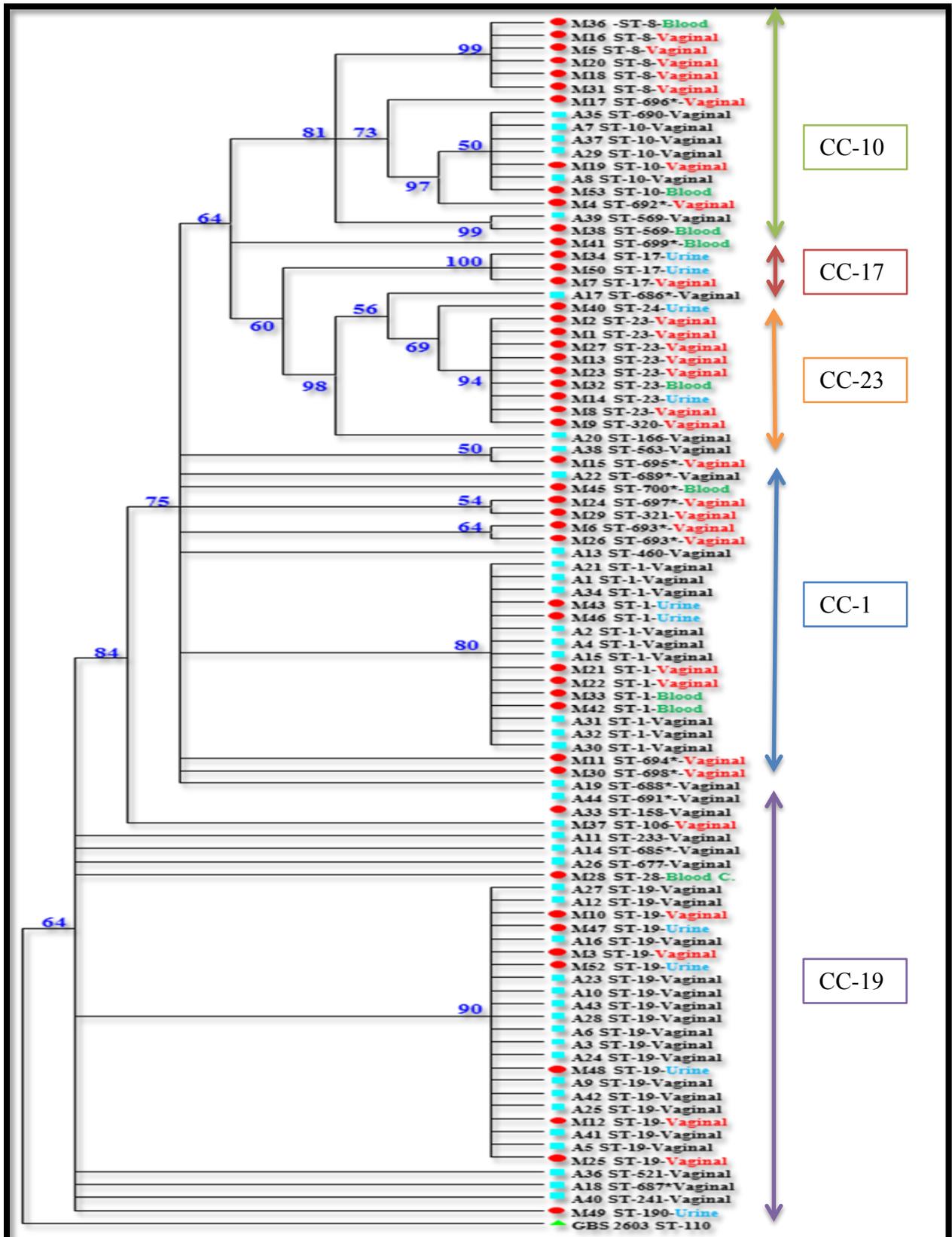
Figure 86: Distribution des STs entre Guelma et Marseille.

L'analyse des résultats montre que le ST-19 et le ST-1 sont les plus fréquents dans les isolats de Guelma en comparant avec ceux de Marseille (STs; ST-1, ST-8, ST-17 et ST-23).

Note: Vu que la totalité des souches isolées dans notre collection est d'origine vaginale, il n'y avait pas de différence significative entre la distribution des séquences types représentant seulement les souches d'origine vaginale par rapport à la distribution globale.

2.3.11. Position phylogénétique des souches

L'Arbre phylogénétique est déduit de la concaténation des séquences partielles des sept gènes de ménage. Les séquences obtenues ont été alignées par le logiciel ClustalX, ensuite analysées par le logiciel Mega version 5, en utilisant la méthode Neighbourjoining avec le modèle de distance paramètre Kimura; les valeurs de bootstrap sont exprimées en pourcentage de 1000 répétitions et présentées à un point de branchement (**Fig. 87**).



CCs, complexes clonaux; ST, Séquence type; * Nouveau ST; GBS 2603, Souche de Référence.

Figure 87: Arbre phylogénétique des 93 souches de *S. agalactiae* déduit de l'analyse MLST.

Comme le montre la **figure 87**, l'analyse de l'arbre phylogénétique à partir de la concaténation de ces séquences partielles, révèle la présence de différentes lignées génétiques entre les isolats de Guelma et de Marseille chaqu'un à part. Les souches de même ST sont regroupées ensembles et elles sont supportées par la même branche.

➤ Complexes clonaux (Analyse eBURST)

L'analyse des souches avec le logiciel eBURST (précédemment détailler dans la partie Matériel et Méthodes) a permis de regrouper les souches de SGB dans Cinq grands complexes clonaux, CC-19, CC-1, CC- 10, CC-23 et CC-17 (**Tab. 25** et **Figs. 88-91**).

Note: Un groupe est considéré comme un complexe clonal si tous les membres possèdent des allèles identiques pour 6 des 7 loci avec au moins un autre membre du groupe.

Tableau 25: Répartition des complexes clonaux entre Guelma et Marseille.

CCs	Origines des souches (n)	Nb	%
CC1	G (11)- M (12)	23	24,7
CC10	G (6)- M (11)	17	18,3
CC17	G (0)- M (3)	3	3,2
CC19	G (23)- M (10)	33	35,5
CC23	G (1)- M (10)	11	11,8
Singletons	G (3)- M (3)	6	6,5
Totale	G (44)- M (49)	93	100

La prévalence des différents complexes clonaux au sein de l'ensemble de la population étudiées est la suivante;

- le CC19 (33 souches soit 35.5%) et CC1 (18 souches soit 24,7%) regroupant la combinaison des isolats de Guelma et de Marseille.
- les CCs; CC10 (17 souches soit 18.3%), CC17 (3 souches soit 3.2%) et CC23 (11 souches soit 11.8%) regroupent la majorité des isolats de Marseille (**Fig. 87**).

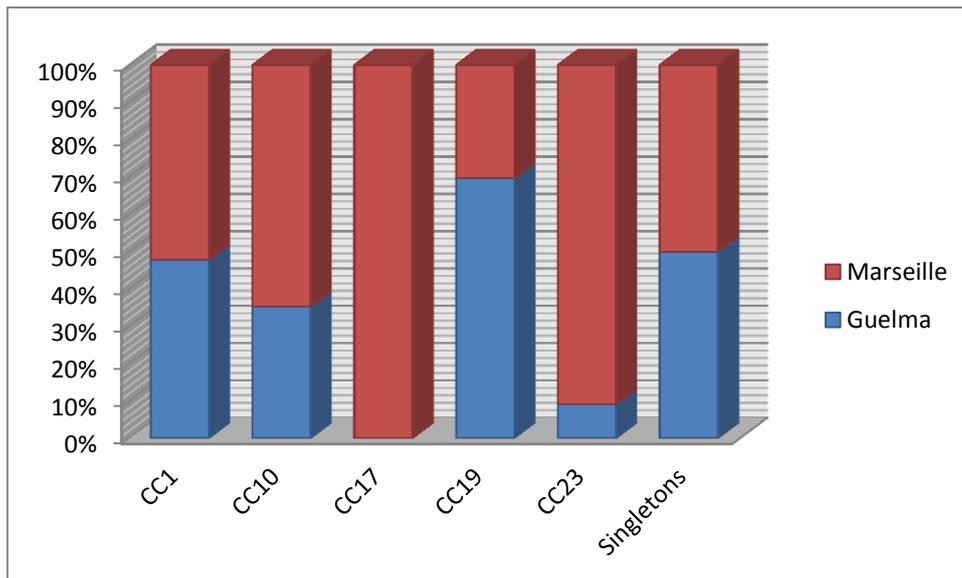


Figure 88: Distribution des CCs entre les isolats de Guelma et de Marseille.

Sur la population étudiée, Trente-et-un STs ont été regroupés dans 5 CCs, tandis que 6 STs (STs, 686, 688, 563, 695, 698 et 699) n'appartiennent à aucun complexe clonal (singleton) (**Fig. 89**). Parmi ceux-ci, 93,5% (87/93) des isolats ont été discernés dans les 5 CCs; CC1, CC10, CC17, CC19 et CC23; 6,5% (6/93) des isolats ne faisait partie d'un aucun cluster.

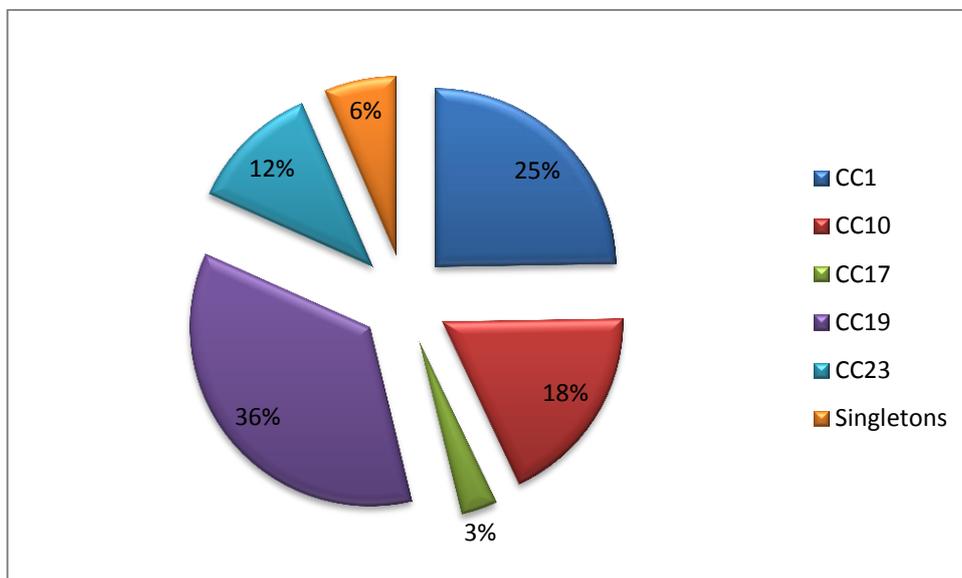


Figure 89: Répartition globale des Complexes Clonaux (CCs).

Certains complexes clonaux sont composés majoritairement d'un seul ST; c'est le cas du CC17 qui ne contient que 3 STs dont le ST-17. Les autres complexes clonaux sont représentés par un nombre plus grand de ST, même s'il existe un ST prédominant (CCs; 1, 19 et 23) (**Fig. 87**).

Logiquement, il existe un fort lien entre les STs fondateurs et les CCs. Le tableau ci-dessous montre cette relation.

Tableau 26: Répartition des Séquence Types (STs) dans les complexes clonaux.

STs/CCs	CC-1	CC-10	CC-17	CC-19	CC-23	Sing
ST-1	15					
ST-8		6				
ST-10		6				
ST-17			3			
ST-19				22		
ST-23					8	
ST-24				1	1	
ST-28						
ST-106				1		
ST-158				1		
ST-166					1	
ST-190				1		
ST-233				1		
ST-241				1		
ST-320					1	
ST-321	1					
ST-460	1					
ST-521				1		
ST-563						1
ST-569		2				
ST-677				1		
ST-685*				1		
ST-686*						1
ST-687*				1		
ST-688*						1
ST-689*	1					
ST-690*		1				
ST-691*				1		
ST-692*		1				
ST-693*	2					
ST-694*	1					
ST-695*						1
ST-696*		1				
ST-697*	1					
ST-698*						1
ST-699*						1
ST-700*	1					
Total (37)	23	17	3	33	11	6

Les valeurs du tableau correspondent au nombre de souches.

Le plus grand complexe, le CC19, se compose de 12 STs en majorité des souches appartenant au ST-19 (n=22). Les autres STs sont en proportion beaucoup moins importante (**Tab. 26**).

Le complexe clonal CC10, comprend 6 STs dont les ST-8 et ST-10 qui prédominent on proportion équilibré (n=6 pour chaque ST), par conséquent on peut nommer se complexe par le CC8-10. Le complexe clonal CC23 comprend 4 STs (le ST-23 avce 8 isolats, ST-24 et deux autres STs). Finalement le plus petit groupe (CC17), comprend trois isolats seulement. (**Tab. 26** et **Fig. 87**).

Dans ces complexes clonaux, on retrouve aussi 16 nouveaux STs répartis dans les différents CCs.

Les résultats analysés par le logiciel eBURST sont représentés dans les figures ci-dessous (**Figs. 90 et 91**).

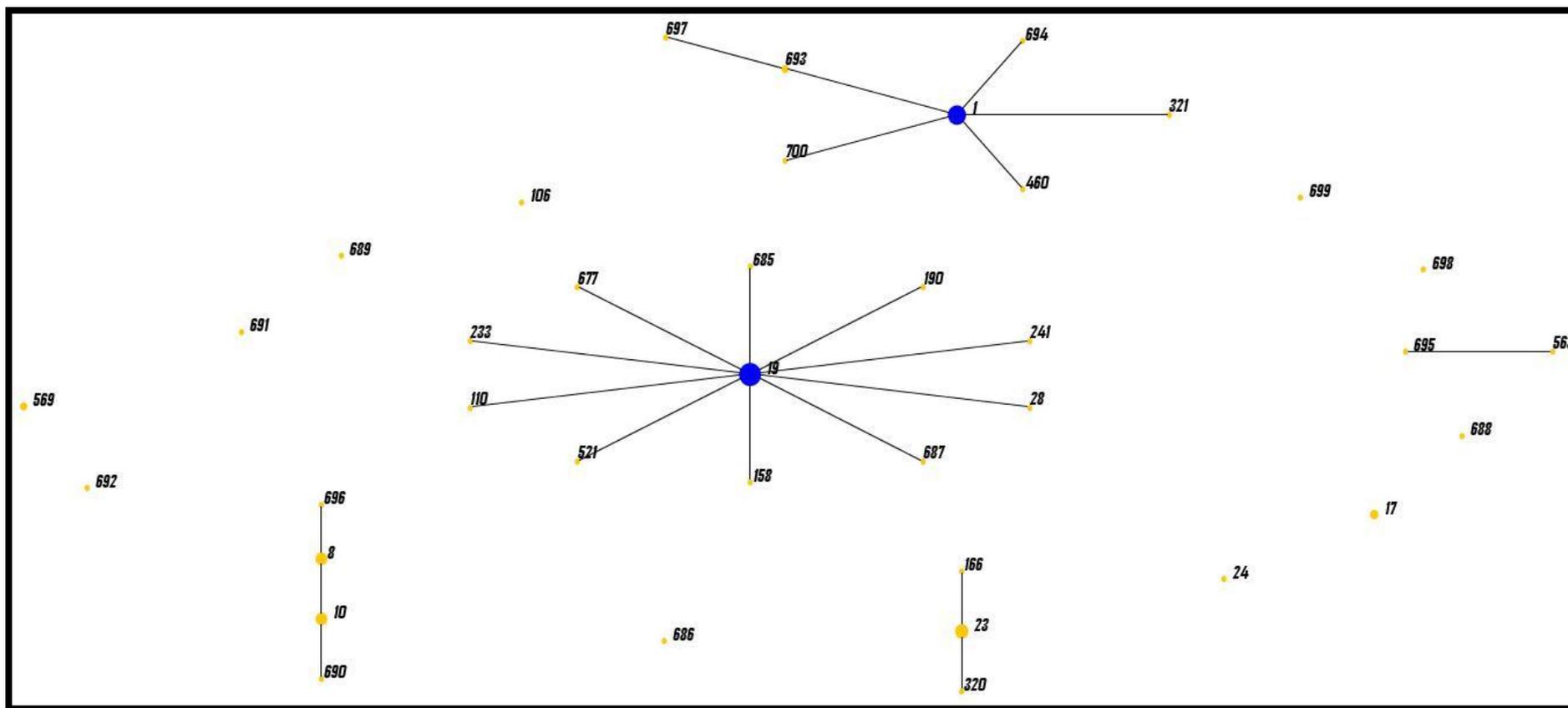


Figure 90: Diagramme eBURST représentant les STs révélés dans cette étude.

Trente-sept profils alléliques différents (Séquence Types; STs) ont été identifiés par MLST et les complexes clonaux (CC) regroupant les souches partageant au moins cinq allèles identiques sur sept qui ont été définis.

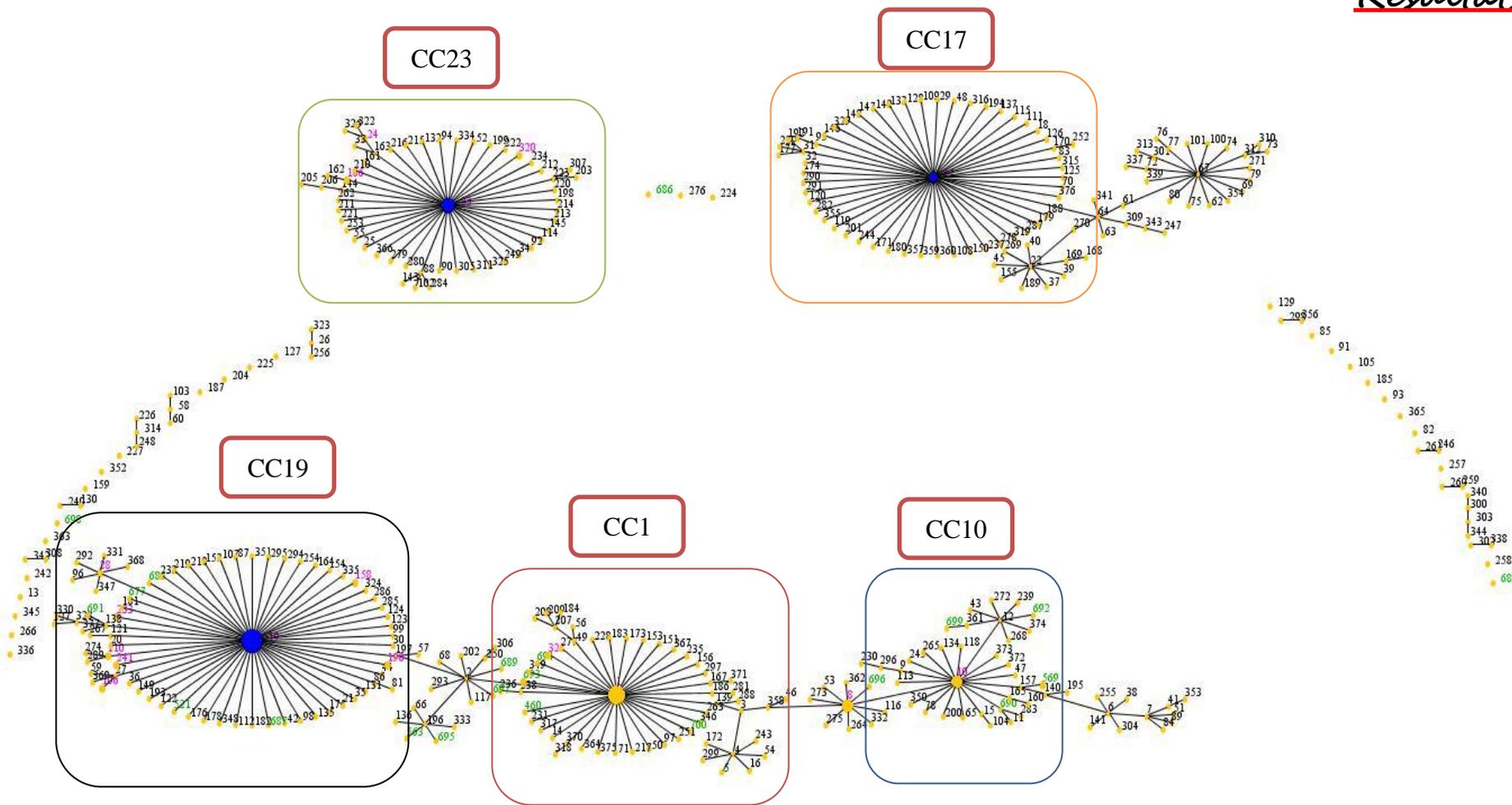


Figure 91: Diagramme eBURST représentant les STs révélés dans cette étude contre les différents STs présents dans la base de données d'eBURST.

Dans le diagramme (**Fig. 91**), chaque groupe est représenté avec le fondateur principal en bleu et les STs fondateurs de sous-groupe en jaune. La surface du cercle est proportionnelle à la prévalence du ST dans la population étudiée. Tous les descendants des fondateurs sont représentés disposés en cercle.

Tous les STs reliés entre eux possèdent les mêmes allèles pour six des sept loci avec au moins un autre isolat dans le groupe et sont donc considérés comme appartenant au même complexe clonal. La population entière peut être représentée sur un diagramme unique, appelé «Instantané de la population».

Les STs colorés en Mauve et Vert représentent les STs révéler dans cette étude, en incluant les nouveaux STs additionné dans la base de donnée du logiciel eBURST.

2.3.12. Corrélation entre gènes de résistance, sérotypes, séquences types et complexes clonaux des souches de *S. agalactiae* isolées de Guelma, Algérie et de Marseille, France

➤ Résistance aux MLS et sérotypes capsulaire

La résistance aux antibiotiques (macrolide) varie également selon le type capsulaire (**Tab. 27** et **Fig. 92**).

Tableau 27: Résistance aux macrolides selon le type capsulaire.

Sérotypes/Résistance aux Macrolides	SS	RS (M phénotype)	RR (cMLS _B)	RR (iMLS _B)
Ia	7	2		
II	9	3	5	
III	10		3	4
IV	1			
V	21	4	9	7
VII	1			
VIII	1			
NT	6			
Total	56	9	17	11

S. Sensible ; R. Résistant.

SS, RS et RR ; représentent la sensibilité et la résistance à l'érythromycine et à la clindamycine respectivement.

* les souches de sérotype V sont plus souvent résistantes, 48.8% des souches sont résistantes à l'érythromycine et 39% sont résistantes à l'érythromycine et à la clindamycine respectivement suivie par le sérotype II avec un taux de résistance de 47.05% (Tab. 27 et Fig. 92).

* la totalité des souches NT (n=6) sont sensible.

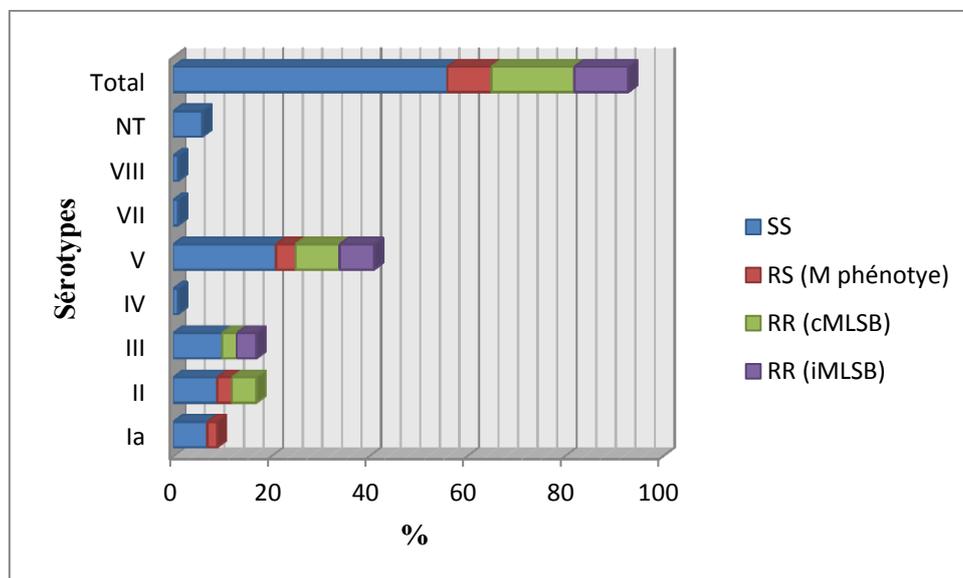


Figure 92: Répartition du taux de la résistance en fonction du sérotype.

-Souches sensibles à l'érythromycine et à la clindamycine (SS).

-Souches résistantes à l'érythromycine et sensibles à la clindamycine (RS), phénotype de résistance M.

-Souches résistantes à l'érythromycine et à la clindamycine (RR), phénotypes de résistance iMLS_B et cMLS_B.

Néanmoins, les souches de sérotype V semblent davantage résistantes aux macrolides que les autres, mais la différence n'est pas significative ($p > 0.05$; $p = 0.1156$).

Les résultats récapitulatifs sur la répartition des gènes de résistance aux MLS et à la tétracycline en fonction du type capsulaire entre les isolats de Guelma et de Marseille sont mentionnés dans le **tableau 31** et la **figure 95**.

Note: la résistance à la tétracycline est étalée sur tous les types capsulaires.

➤ Résistance aux MLS et complexes clonaux

La sensibilité aux macrolides varie également selon l'appartenance aux complexes clonaux (Tab.28).

Tableau 28: Résistance aux macrolides selon l'appartenance aux complexes clonaux.

CCs/Résistance aux macrolides	SS	RS (M phénotype)	RR (cMLS _B)	RR (iMLS _B)
CC-1	11	3	8	2
CC-10	16		1	
CC-17	3			
CC-19	19	1	7	8
CC-23	6	5		
Singletons	4		1	1
Total	56	9	17	11

* 95% des souches des CC10 et CC17 sont sensibles aux macrolides.

* 48.6% des souches des CCs ; CC1, CC19 et CC23 sont globalement plus résistantes (essentiellement liés aux sérotypes III et V) (**Fig. 93**).

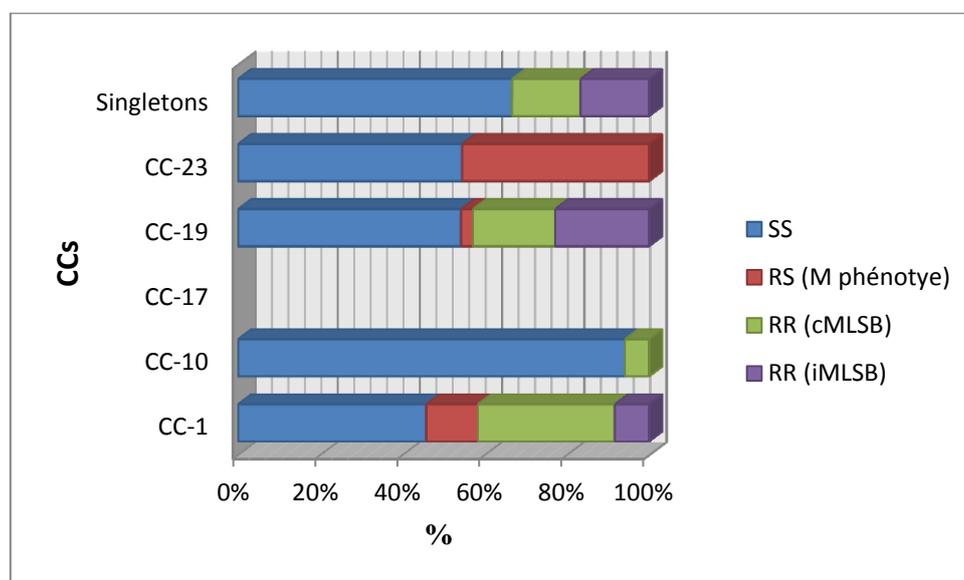


Figure 93: Résistance aux macrolides selon l'appartenance aux complexes clonaux.

-Souches sensibles à l'érythromycine et à la clindamycine (SS).

-Souches résistantes à l'érythromycine et sensibles à la clindamycine (RS), phénotype de résistance M.

-Souches résistantes à l'érythromycine et à la clindamycine (RR), phénotypes de résistance iMLS_B et cMLS_B.

La corrélation entre la résistance aux MLS en fonction des séquences type entre les isolats de Guelma et de Marseille sont notés dans le **tableau 31**. La résistance à la tétracycline est répartie au sein des Cinq complexes clonaux étudiés incluant les différentes STs (**Fig. 95**).

Note: la répartition des gènes de résistance entre les isolats (au sein de différents types capsulaire) dans cette étude étaient en accord avec le phénotype de résistance associé aux macrolides (**Tab. 31** et **Fig. 95**).

On plus, la présente étude montre une association significative entre le ST-23 et le phénotype M ($p= 10^{-7}$) (**Tab. 31** et **Fig. 95**).

➤ Sérotypes capsulaire et séquences types

Le tableau suivant montre l'existence d'une forte corrélation entre les différents STs et les différents sérotypes.

Tableau 29: Distribution des STs au sein des types capsulaires.

STs/Sérotypes	Ia	II	III	IV	V	VII	VIII	NT
ST-1		3			11			1
ST-8					2	1		3
ST-10		5						1
ST-17			3					
ST-19		1	12		9			
ST-23	5	2			1			
ST-24	1							
ST-28		1						
ST-106			1					
ST-158	1							
ST-166	1							
ST-190					1			
ST-233					1			
ST-241		1						
ST-320	1							
ST-321					1			
ST-460					1			
ST-521					1			
ST-563		1						
ST-569		2						
ST-677					1			
ST-685*					1			
ST-686*					1			
ST-687*					1			
ST-688*					1			
ST-689*					1			
ST-690*					1			
ST-691*			1					

ST-692*					1			
ST-693*					2			
ST-694*					1			
ST-695*			1					
ST-696*								1
ST-697*					1			
ST-698*							1	
ST-699*	1							
ST-700*					1			
Total (37)	9	17	17	1	41	1	1	6

*NST. Nouvel Séquence Type; Les valeurs du tableau correspondent au nombre de souches.

L'analyse des données montre que,

* les STs, 1, 10, 19 et 23 sont majoritairement liés aux types capsulaires; V, II, III et Ia respectivement.

* les NSTs sont représenté par 7 isolats à Guelma et 9 à Marseille ($p= 0.7538$) (**Tab. 31**). Le lien entre ces NSTs et le sérotype V (10/16 NSTs hébergent le sérotype V) est significatif ($p= 0.0289$) dans notre étude.

La distribution des STs au sein des sérotypes capsulaire entre les isolats de Guelma et de Marseille est notée dans le **tableau 31**.

➤ Sérotypes capsulaire et complexes clonaux

Assez logiquement, il existe également une forte corrélation entre les complexes clonaux et les sérotypes (**Tab. 30**). 82,6% de sérotype V regroupent dans le clonal complexe CC1 (ST-1/V, $p= 0,012$), 72,7% de sérotype Ia GBS ont été regroupés dans le CC23 (ST-23/Ia, $p=10^{-7}$), 100% de sérotype III GBS ont été regroupés dans le CC17 (ST-17, $p= 10^{-4}$) et 70,6% de sérotype II et les isolats non typable regroupent dans le CC10 (ST-10/II, $p= 2.10^{-5}$ and ST-8/NT, $p= 7.10^{-6}$). En revanche, 45,4% des sérotypes III et V ont été regroupés dans le CC19 (ST-19/III, $p= 4.10^{-7}$ and ST-19/V, $p= 0,7312$). Pour les autres STs, aucune prédominance ne ressort (**Tab. 30**).

Tableau 30: Corrélation entre complexes clonaux et sérotypes.

CCs/Sérotypes	Ia	II	III	IV	V	VII	VIII	NT
CC-1		3			19	1		1
CC-10		7			4			5
CC-17			3					
CC-19	1	3	14		15			
CC-23	8	2			1			
Singletons		2		1	2		1	
Total	9	17	17	1	41	1	1	6

L'analyse MLST a montré pareillement que; les souches appartenant au CC17 sont toutes de sérotype III ($p= 10^{-4}$) et les souches du CC1 et CC23 appartiennent quasiment toutes au sérotype V ($P= 10^{-5}$) et Ia ($p<10^{-7}$) respectivement. Les complexes clonaux CC10 et CC19 sont un peu plus hétérogènes même si chacun d'eux est représenté par un sérotype majoritaire; II ($p= 0.006$) et III ($p= 7.10^{-6}$) respectivement. Ainsi, la totalité des souches non typables (NT) est quasiment limitée à un complexe clonal unique CC10 ($p= 2.10^{-5}$) (**Fig. 94**). Pour les sérotypes IV, VII et VIII, le nombre de souches est insuffisant pour déterminer une tendance (**Fig. 93**).

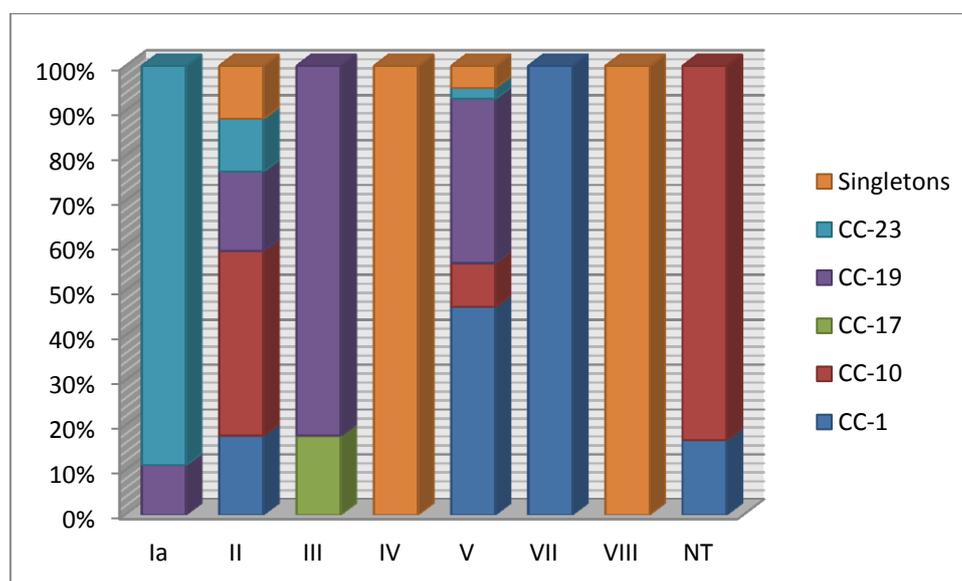


Figure 94: Répartition des sérotypes au sein des complexes clonaux.

Tableau 31: Corrélation entre gènes de résistance, sérotypes capsulaire et séquences types des souches de *S. agalactiae* isolées à Guelma, Algérie et à Marseille, France.

Sérotypes (n)	Source et Origine	nombre d'isolats	Phénotypes (n)	Gènes de résistance		Séquence types (n)
				Résistance aux Macrolides	Résistance à la Tétracycline (n)	
Ia (9)	A	Vaginal (2)			<i>tetM</i> (2)	ST-158, ST-166
	F	Vaginal (4) Urine (2) Hémoc. (1)	M (2)	<i>mefA/E</i> (2)	<i>tetM</i> (5) <i>tetM+tetO</i> (1)	5(ST-23), ST-24, ST-320
	A	Vaginal (11)	cMLS _B (4) M (1)	<i>ermB</i> (4) <i>mefA/E</i> (1)	<i>tetM</i> (11)	4(ST-10), 3ST-1 ST-19, ST-241, ST-563, ST-569
II (17)	F	Vaginal (3) Hémoc. (3)	cMLS _B (1) M (2)	<i>ermB</i> (1) <i>mefA/E</i> (2)	<i>tetM</i> (5)	2(ST-23), ST-10, ST-28, ST-569 ST-699 ^{NST}
III (17)	A	Vaginal (10)	cMLS _B (2) iMLS _B (2)	<i>ermB</i> (2) <i>ermA+ermB</i> (1) <i>ermB</i> (1)	<i>tetM</i> (10)	9(ST-19), ST-691 ^{NST}
	F	Vaginal (4) Urine (3)	cMLS _B (1) iMLS _B (2)	<i>ermB</i> (1) <i>ermA+ermB</i> (2)	<i>tetM</i> (5) <i>tetO</i> (1)	3(ST-17), 3ST-19, ST-106

Résultats

IV (1)	F	Vaginal (1)			<i>tetM+tetO</i> (1)	ST-695 ^{NST}
V (41)	A	Vaginal (21)	cMLS _B (7)	<i>ermB</i> (7)	<i>tetM</i> (21)	6(ST-1), 5(ST-19)
			iMLS _B (4)	<i>ermB</i> (4)		ST-233, ST-460, ST-521, ST-677 (ST-685,686,687,688,689,690) ^{NST}
	F	Vaginal (12)	cMLS _B (2)	<i>ermB</i> (2)	<i>tetM</i> (13)	5(ST-1), 4(ST-19), 2(ST-8)
		Urine (5)	iMLS _B (3)	<i>ermB</i> (3)	<i>tetM+tetO</i> (1)	ST-23, ST-190, ST-321
		Hémoc. (3)	M (4)	<i>mefA/E</i> (1) <i>ermA+mefA/E</i> (3)		(2(ST-693),692,694,697,700) ^{NST}
VII (1)	F	Vaginal (1)			<i>tetM</i> (1)	ST-8
VIII (1)	F	Vaginal (1)				698 ^{NST}
NT (6)	F	Vaginal (4)			<i>tetM</i> (5)	3(ST-8), ST-1, ST-10
		Hémoc. (2)				696 ^{NST}

c/iMLS_B, constitutifs/ inductibles macrolides, lincosamides et streptogramines résistance de type B; *ermA/B*, érythromycine ribosome méthylase de type A/B; M, résistance aux Macrolides; *Mef*; macrolides efflux; tet, Tétracycline; NT, non typable; ST, Séquences Type; NST, Nouvel Séquence Type; A, l'Algérie et F, France ; Hémoc. , Hémoculture.

L'analyse de nos résultats a montré que le phénotype cMLS_B était significativement plus élevée chez les isolats de Guelma par rapport à ceux de Marseille ($p= 0,011$), exprimé par le gène *ermB*, tandis que le phénotype de résistance M a été associé aux isolats de Marseille ($p = 0,002$), exprimé par le gène *mefA/E* et associé à la séquence type ST-23 ($p= 10^{-7}$) (**Tab.31** et **Fig. 95**).

➤ **Structure et position phylogénétique récapitulatif**

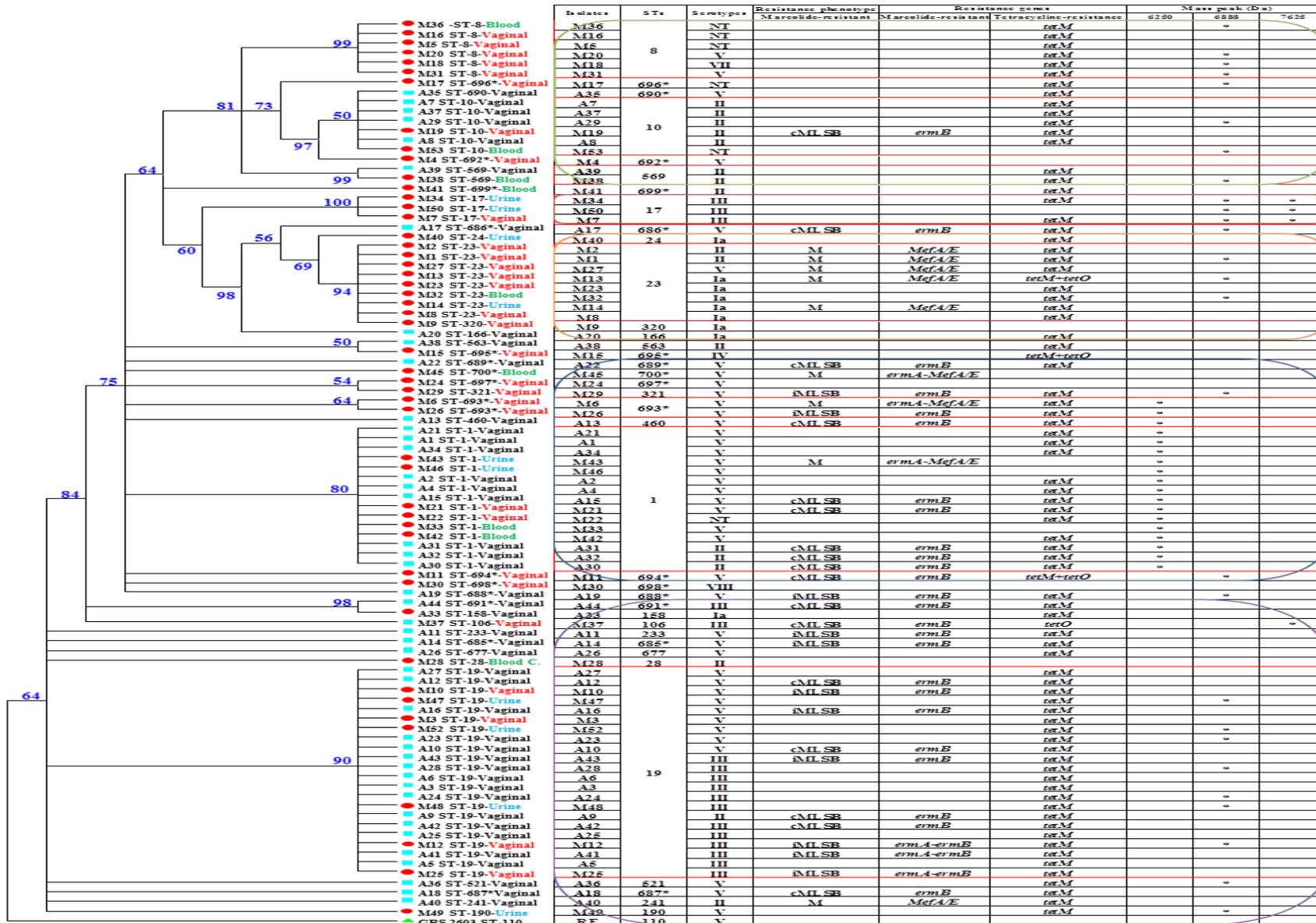
Un arbre phylogénétique a été réalisé, avec les logiciels MEGA 5 (**Fig. 95**).

En analysant le dendrogramme avec les résultats obtenus par eBURST, il apparaît que, de manière générale, les souches d'un même complexe clonal sont représentées sur la même branche.

Les souches d'un même complexe clonal sont généralement représentées sur la même branche. Seuls les complexes clonaux CC10, CC17 et CC23 sont représentés sur la même branche et semblent être relativement proches, alors que les autres complexes clonaux sont chacun sur une branche différente des autres et semblent donc plus indépendants les uns des autres. Les souches de ST-686, ST-698 et ST-688 n'appartiennent pas au complexe clonal dont font partie les autres souches de leur branche (**Fig. 94**).

La diversité des souches a différé en fonction des populations de souches étudiées entre Guelma et Marseille.

Résultats



CC-10

CC-17

CC-23

CC-1

CC-19

CCs, complexes clonaux; ST, Séquence type; * Nouveau ST; NT, non typable; c/iMLS_B, constitutifs/ inductibles macrolides, lincosamides et streptogramines résistance de type B; *ermA/B*, érythromycine ribosome méthylase de type A/B; M, résistance aux macrolides (phénotype M). *Mef*, Macrolide efflux; RF, Souche de Référence.

Un pic de masse à 6250 Da (et absence de pic de masse à 6888 Da) identifie les souches de SGB appartenant à la séquence type ST1.

Un pic de masse à 7625 Da identifie les souches de SGB appartenant à la séquence type ST17.

Figure 95: Arbre Neighbor-Joining (phylogénétique) de 37 STs construits à partir d'analyse multilocus sequence typing (MLST) en utilisant le programme Mega 5 des 93 isolats de *S. agalactiae* inclus dans la présente étude.

Le dendrogramme montre la diversité génétique et la caractérisation phénotypique de *S. agalactiae* résistants au macrolide et à la tétracycline, les relations génétiques entre les différents sérotypes, gènes de résistance, séquences type et les complexes clonaux.

➤ **Corrélations entre gènes de résistance, sérotypes capsulaire et séquences types selon la source des souches entre Guelma et Marseille**

La répartition des isolats en fonction de la nature de prélèvement est détaillée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 32: Corrélations entre phénotypes de résistance, sérotypes, et séquences types (STs) des souches isolées en fonction du site de prélèvement entre Guelma et Marseille.

Sites d'isolement (n)	Phénotype de résistance aux MLS (n)	Sérotype capsulaire (n)	STS (n)
Guelma (n=44) <i>PV maternel (n=44)</i>	MLSb-c (13), MLSb-i (6) et M (1) + aucune résistance (24)	Ia (2), II (11), III (10) et V (21)	ST19 (15), ST1 (9), NST (7) et ST10 (4) STs; 158, 166, 233, 241, 460, 521, 563, 569 et 677
Marseille (n=49)	<i>PV maternel (n=30)</i>	MLSb-c (4), MLSb-i (5) et M (5) + aucune résistance (16)	Ia (4), II (2), III (4), IV (1), V (13) et VII (1), NT(4), VIII (1)
	<i>Urine (n=10)</i>	M (2) + aucune résistance (8)	Ia (2), III (3), V (5)
	<i>Hémo. (n=09)</i>	M (1) + aucune résistance (8)	Ia (1), II (3), V (3) et NT (2)
			NST (8), ST1 (2), ST8 (5), ST10 (2), ST17 (1), ST19 (3), ST23 (6), ST106 (1), ST 320 (1) et ST321 (1) ST1 (2), ST17 (2), ST19 (3), ST23 (1), ST24 (1) et ST 190 (1) NST (2), ST1 (2), ST8 (1), ST10 (1), ST23 (1), ST28 (1) ST 569 (1)

PV, Prélèvement Vaginal; Hémo, Hémoculture ; ST. Séquence Type.

- L'analyse des données montre une corrélation significative entre la résistance aux macrolides et la totalité des prélèvements vaginaux ($p < 0.05$; $p = 0.02$).
 - Absence de différences significatives entre les prélèvements vaginaux par rapport aux sérotypes et par rapport à la distribution des séquences types.
 - Les données caractéristiques des 44 souches de SGB isolées à Guelma en fonction du trimestre de la grossesse vis-à-vis la nature des gènes de résistance, sérotypes, séquences types et la distribution des complexes clonaux sont mentionnées dans l'**annexe 6**.
- ✚ **L'observation des données ne montre aucunes différences significatives entre les trimestres.**



***Discussion, conclusion générale
et perspectives***



Partie 4. Discussion

Analyse préliminaire (Portage de *S.agalactiae*)

A notre connaissance, aucune étude d'évaluation de la prévalence de *Streptococcus agalactiae* (SGB) chez les femmes enceintes n'a encore été effectuée en milieu Algériens. Le premier objectif épidémiologique de notre étude était de caractériser sur une période de 13 mois les souches de SGB responsables d'infections néonatales et colonisant les femmes enceintes à Guelma, Algérie et d'en relever les facteurs de risques associés à ce portage.

➤ Portage

Les streptocoques de groupe B font partie de la flore commensale du tube digestif et de la flore vaginale [315;316]. Elle est reconnue depuis plus de 20 ans comme principal responsable de l'IMF. Aux États-Unis en 1990, 7 600 cas de sepsis sont déclarés, soit 1,8 % naissances vivantes, avec 310 décès [37;317]. 40% des cas d'IMF à SGB seraient nés de femmes dont la colonisation n'a pas pu être dépistée [318], et l'approche qui consisterait à dépister la colonisation maternelle ne préviendrait que 25-30% des IMF précoces à SGB [319]. Leur portage peut s'avérer et devenir un problème quasi exclusivement lors de la grossesse, c'est pourquoi depuis 2001, l'Anaes (HAS aujourd'hui) recommande dans ses objectifs de bonnes pratiques médicales de rechercher entre la 34^{ème} et la 38^{ème} semaine d'aménorrhée le SGB [320].

L'infection bactérienne néonatale par contamination maternofoetale a fait l'objet de nombreuses recommandations au cours de la dernière décennie du fait de sa fréquence et de sa gravité. Le but de ces démarches est le dépistage de *Streptococcus agalactiae* afin de l'éradiquer par une antibiothérapie per partum [256].

Dans la littérature, la prévalence du portage vaginal asymptomatique se situe entre 2 et 35% [232;245;321;322]. Le taux de se portage chez les parturientes dans notre étude au-delà de la 34^{ème} SA est de 10.7%. Nos résultats sont donc conformes aux données de la littérature (Tab. 33).

En Europe, la prévalence du portage du SGB est évaluée entre 8 et 20% selon les séries des régions européennes publiées en 2008; 19.7 à 29.3% en Europe de l'Est, 11 à 21% en Europe de l'Ouest, 24.3 à 36% en Scandinavie et 6.5 à 32% dans le sud de l'Europe [205]. Aux Etats-Unis, 10 à 30% des femmes enceintes sont colonisées [208] (Tab. 33).

En effet, ce taux varie dans de larges proportions selon le pays, les sites de prélèvements, le choix du moment du dépistage, la population étudiée et la sensibilité de la technique

bactériologique d'isolement utilisée [232;245;321]. L'intensité du portage varie selon les individus et peut changer au cours du temps chez une même femme [206], expliquant en partie les différences du taux de colonisation observées dans les études. Néanmoins, les techniques de prélèvements [323] et les conditions de culture (type de milieu de culture et utilisation d'un milieu d'enrichissement) [208] représentent une part importante de ces variations. Ces variations peuvent aussi refléter des différences dans l'environnement tels que l'hygiène et de la nutrition [324].

➤ **Fréquence d'isolement de *S. agalactiae***

Il ressort de notre étude que le portage globale du SGB chez les femmes enceintes est de 8.9%≈9% au cours des trois trimestres de la grossesse, un taux vraisemblablement bas comme ceux retrouvés dans une étude menée en Asie de Pacifique: 8%, S. Nigeria: 8.3% et Inde/Pakistan: 9% (le taux de portage dans certains pays est mentionné dans le tableau ci-dessous). Notre portage est également proche à celui constaté en France 10% par l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES) (2001) et ceux rapporté par Joelle et *al.*, en 2003 avec un taux de 9,6 [325]. Certains auteurs montrent des prévalences du portage plus au moins élevé. Au Nigeria, le résultat a montré une prévalence de 11,3% de colonisation vaginale par SGB qui augmente avec l'âge [326]. En Tunisie, 13% en 2007 ont été rapporté par Jerbi et *al.*, (2007) (**Tab. 33**). D'autres chercheurs ont constaté des prévalences qui varie de 10 à 40% [327;328] et d'autres de 12 à 15%, publié en 1999 et 2001 [56;329].

✓ **Ce faible taux de portage peut être lié:**

- au nombre restreint de nos patientes enceintes colonisées par SGB, dépistées en cette période (incluant la 34^{ème} et la 38^{ème} semaine d'aménorrhée) [255].
- Les sites de prélèvements; au fait que les prélèvements ont été faits uniquement au niveau vaginal alors que le CDC préconise un prélèvement vaginal associé à un prélèvement anal car, selon les études, ceci améliore la sensibilité du dépistage du SGB [330-332]. On remarque, en effet, des pourcentages plus ou moins élevés dans des études où les deux sites de prélèvements (vaginal et anal) étaient effectués [333;334]: Zimbabwe (32%), Gambie (22%), Ethiopie (20,9%). Cependant l'ANAES préconise de faire uniquement un prélèvement vaginal [38]. car d'autres auteurs ont trouvé le même taux de portage au niveau des deux sites [335] ou même un portage vaginal supérieur au portage rectal qui, en plus, majore le coût du dépistage [254;321].

Dans notre étude, nous avons réalisé seulement un prélèvement vaginal suivant les recommandations de l'ANES, par contre d'autres chercheurs ont réalisé un prélèvement combiné génito-anal afin d'optimiser le dépistage [336;337].

- La sensibilité de la technique bactériologique d'isolement utilisée;

Dans le but d'améliorer le dépistage du SGB, le CDC recommande l'utilisation d'un milieu de transport permettant la survie de cette bactérie pendant 8 à 12 heures, ce qui a été respecté dans notre étude. L'importance de l'utilisation d'un milieu d'enrichissement sélectif a été rapportée par plusieurs études [35;232]: le CDC préconise un pré-ensemencement de l'écouvillon dans un bouillon d'enrichissement adapté à une croissance sélective du SGB (bouillon Todd-Hewitt + ANC), ce milieu détectant le faible portage du SGB.

Bien que certains auteurs rapportent une meilleure sensibilité (supérieure à 99%) du milieu de culture Granada dans la détection du SGB [338], le CDC recommande la culture sur gélose au sang frais qui reste une méthode fiable de détection [37;324;339]. Cette méthode a été utilisée dans notre étude du fait aussi de son faible coût par rapport au milieu Granada, qui nécessite en particulier une incubation en anaérobiose, en revanche dans notre étude nous avons utilisé le milieu chromogène CHROMagar™ StrepB en parallèle avec la gélose au sang frais de mouton incubé en aérobiose [340;341]. Ce milieu présente une sensibilité et spécificité équivalentes à la gélose au sang mais permettent une détection plus rapide et facile [57]. Des études récentes ont montré que ces milieux étaient comparables en terme de sensibilité pour la détection de *S. agalactiae* aux géloses au sang classiques [57]. Cependant, ces milieux permettent de visualiser plus facilement les colonies de SGB, en particulier s'il y en a très peu ou si elles sont isolées au sein d'une flore associée comme dans les prélèvements vagin aux ou rectaux. L'avantage des milieux Granada™ est que la coloration orange est spécifique à 100% des SGB. Par contre, ils ne permettent pas d'identifier les SGB non hémolytiques (1 à 2%) qui ne produisent pas de pigment [57;339]. Les milieux chromogéniques permettent la culture sélective des SGB, souches non hémolytiques comprises, mais ils ne sont pas totalement spécifiques et toute suspicion de SGB devra être confirmée par la mise en évidence de l'antigène B [342].

Le tableau ci-après résume les résultats du portage de SGB dans quelques pays.

Tableau 33: Taux de portage selon les séries publiées.

Pays	Références	Taux de portage
Mozambique	[343]	1,80%
Afrique tropicale	[344]	3,90%
Pologne	[345]	4,33%
Taiwan	[346]	6,20%
Cameroun (Yaoundé)	[347]	6,70%
Asie du Pacifique	[348]	8%
S Nigeria	[349]	8,30%
Inde/Pakistan	[348]	9%
France	[38]	10%
Emirates unies	[350]	10,10%
Maroc (Rabat)	[351]	10,50%
Arabie Saoudite	[352]	11,30%
Nigeria	[326]	11,30%
Amérique du Sud	[348]	12%
Tunisie	[353]	12,92%
Tunisie	[255]	13%
Lituanie	[354]	15%
Allemagne	[237]	16,00%
Malawi	[355]	16,50%
Afrique de l'Est	[348]	17%
Uruguay	[356]	17,30%
Liban	[357]	17,70%
Afrique subsaharienne	[348]	18%
Thaïlande	[358]	18,12%

Ethiopie	[334]	20,90%
Netherlands	[359]	21%
Nouvelle-Zélande	[360]	22%
Maroc	[361]	23,30%
Belgique	[362]	23,70%
Egypte	[363]	25,30%
Brésil	[364]	25,40%
Etats-Unis	[235]	26,50%
Jordanie	[365]	30,40%
Zimbabwe	[366]	32%
Canada	[367]	11 à 19.5 %
Notre série	Guelma, Algérie	9%

➤ **L'évolution du portage au cours des trimestres de la grossesse**

Le portage maternel du SGB est inconstant et variable au cours de la grossesse. Il a été démontré que le taux de portage est de 11,4% entre 22 et 26^{ème} SA (70 prélèvements positifs sur 615 patientes dépistées) et que 6,4% des patientes avec prélèvement négatif auront un prélèvement positif plus tard dans la grossesse alors que 28,6% des patientes avec prélèvement positif initialement verront disparaître leur portage plus tard [368]. D'autres chercheurs dévoilent que l'intensité du portage varie selon les individus et peut changer au cours du temps chez une même femme [206]. Dans notre étude 89 femmes enceintes avaient deux prélèvements et/ou trois au cours de la grossesse, seulement quatre femmes d'entre elles présentent un prélèvement positif qui prolonge du 1^{er} au 2^{ème} et/ou du 2^{ème} au 3^{ème} trimestre. Ce faible taux est dû au nombre restreint de nos patientes.

➤ **Le moment du dépistage**

Le portage vaginal du SGB est spontanément intermittent ou transitoire [38]. Parmi les facteurs qui interviennent dans la transmission, le plus significatif est l'importance quantitative de la colonisation maternelle [369]. Le CDC préconise un dépistage entre 35^{ème} et 37^{ème} SA [336;370], l'ANAES recommande un dépistage à la fin de la grossesse entre la 34^{ème} et la 38^{ème} SA [38]. À travers notre étude, nous avons essayé d'évaluer globalement le

taux de portage vaginal du SGB chez la femme enceinte, le moment du prélèvement étant étalé sur toute la grossesse. Le taux du portage le plus élevé est observé au cours de 2^{ème} (15.4%) et 3^{ème} (8.7%) trimestres de la grossesse. Ces données sont accord avec les résultats publiés en Tunis [255] et en Cameroun (Yaoundé) [371], qui montrent un pourcentage élevé au 3^{ème} trimestre (17% et 11.1% respectivement) suivie par le 2^{ème} trimestre (10.2% et 7% respectivement). Le dépistage de la colonisation par le SGB est justifié par le fait que la plupart des infections maternelles et néonatales sévères succèdent à la colonisation maternelle.

➤ **Influence de certains facteurs sur le portage de SGB**

Bien que la littérature concernant le dépistage du SGB soit abondante, rares sont les études qui se sont penchées spécifiquement sur les facteurs de risque du portage maternel de ce germe dans notre pays.

De nombreux travaux ont essayé de dégager les facteurs de risque liés au portage du SGB chez la femme enceinte, et ceci afin de cibler au mieux la conduite préventive [245;254;336]. La majorité de ces études ont conclu à l'absence ou à la présence non significative des facteurs de risque et ont préconisé le dépistage systématique du portage vaginal [35;232;254]. Jaureguy et *al.*, (2003) [331], dans une série de 370 femmes enceintes dépistées dont 57 colonisées (15,4%), n'ont retrouvé aucun facteur associé de façon significative au portage du SGB; ils ont seulement pu dégager des tendances pour certains facteurs.

✚ **Age**

L'isolement de streptocoque du groupe B dans différentes tranches d'âge a montré que l'incidence du portage n'est pas en fonction d'âge [372]. En 1997, Baker et *al.*, [230] ont signalé que la répartition des isolats des femmes enceintes colonisées de façon asymptomatique est indépendante de l'âge. Une étude de plus grande envergure incluant 1702 patientes n'a pas non plus retrouvé de relation entre âge et portage du SGB [359]. Cependant, certains auteurs trouvent un taux de portage significativement supérieur chez les patientes âgées [358;373;374]. Dans notre étude, on remarque une répartition de portage assez équilibré au sein des tranches d'âge avec une légère augmentation dans la tranche de 26 à 35ans. L'âge n'est pas donc considéré comme un facteur de portage.

✚ Age gestationnel et Parité

La parité n'a pas été considérée par la plupart des auteurs comme facteur de risque de portage du streptocoque B [331;353;359;375]. Néanmoins, elles restent à la limite de la signification (respectivement OR = 0,6 ; IC 95% : 0,3– 1,1 et OR = 0,6 ; IC 95% : 0,3–1,1) dans l'étude de Jaureguy et *al.*, (2003) [331]. D'autres études montrent que le risque de portage augmente significativement chez les primipares par rapport aux multipares [376]. Regan (1991) [373], quant à lui, considère aussi la faible parité comme un facteur prédictif de portage du SGB.

Nos résultats étalent un pourcentage ± élevé (25/44; 56.8%) des femmes colonisées par SGB ayant un âge gestationnel \geq à 3-28 semaines d'aménorrhée, ceci est comparable à l'étude publiée en Thaïlande, où Kovavisarach *et al.*, (2007) [358] retrouvent que le risque de portage de SGB pendant la grossesse augmente chez des femmes ayant un âge gestationnel bas. Contrairement à celle publiée au Maroc 2013 [4], ou les résultats montrent une colonisation par SGB élevée chez les femmes ayant un âge gestationnel \geq à 32 semaines d'aménorrhée [255;371].

Une association significative entre le portage de SGB, le 1^{er} et le 2^{ème} trimestre de la grossesse est observée dans notre étude avec un p value < 0.05. En outre, l'âge gestationnel n'est pas considéré comme un facteur prédictif de portage, car les recommandations mondiales préconisent de dépister le SGB seulement au cours du 3^{ème} trimestre de la grossesse.

✚ Niveau socioéconomique

Pour certains auteurs, les revenus financiers importants sont significativement associés à un plus grand taux de portage du streptocoque B [360;377]. Pour d'autres, ils ne le sont pas [359]. Dans notre étude nous avons aperçu une significativité entre le faible niveau S-E et le portage de SGB (p= 0.026).

Dans une étude américaine comparative portant sur 40459 femmes colonisées comparées à 84268 témoins, le haut niveau d'étude (OR = 1,21 ; IC 95% : 1,05– 1,40) était significativement associé au portage du SGB [377]. Dans notre série, ce facteur n'est pas associé significativement.

Le portage chez le personnel soignant en contact direct avec les patients était significativement supérieur par rapport au personnel soignant sans contact avec les patients (OR = 1,22 ; IC 95% : 1,07–1,38) suggérant que l'exposition directe aux patients peut être un mode d'inoculation [377].

Diabète

Le diabète a été considéré pendant longtemps comme un facteur de risque de colonisation maternelle par le SGB [378;379]. Plusieurs analyses ont été effectuées pour évaluer l'influence du diabète maternel sur le taux de colonisation de streptocoque du groupe B [120;285]. Une étude américaine a porté sur 105 femmes enceintes diabétiques et 300 femmes enceintes témoins révèle que l'intolérance aux glucides semble être un facteur de risque de portage du SGB pendant la grossesse (le taux de colonisation par le SGB était plus élevé chez les femmes diabétiques (43,8 contre 22,7%) [378]. Cependant, ces résultats ont été infirmés par la série américaine de *Stapleton et al.*, (2007) [377].

Il faut faire la part entre 2 types de diabètes: diabète antérieur et diabète gestationnel bien que dans certaines études, comme celle de Raimier et *al.*, (1997) [380] le type de diabète n'a pas influencé les résultats. Piper et *al.*, (1999) [381] conclut aussi, au terme de son étude comparant 446 patientes porteuse de diabète gestationnel à 1046 patientes non diabétiques, que le diabète gestationnel ne constitue pas un facteur de risque de colonisation par le streptocoque B. L'étude brésilienne [375] va dans le même sens. Ces résultats concordent avec nos données.

Antécédents gynéco-obstétricaux

Jaureguy et *al.*, (2003) [331] a retrouvé pour l'antécédent de portage ou d'**infection néonatale**, un Odds Ratio plus important associé au portage du SGB sans être significatif (respectivement OR = 2,8 ; IC 95% : 0,5–15,7, p = 0,09 ; OR = 2,8 ; IC95 % : 0,2–31,1, p = 0,07) tandis que l'antécédent de **menace d'accouchement prématuré** était un facteur à la limite de la signification (OR = 0,2 ; IC 95% : 0,03–1,7, p = 0,07). Dans l'étude de Jerbi [353], l'**antécédent de fausse(s) couche(s) spontanée(s)** est apparu comme facteur protecteur de ce portage (OR = 0,21 ; IC 95% : 0,05–0,93 ; p = 0,02). Pour d'autres auteurs ce facteur n'est pas retrouvé [331;359]. 23,18% (soit 16 femmes sur 69) des patientes ont connu un à deux fausses couches selon les données publiées au Maroc 2013 [4]. Malgré ce taux important, peu d'études se sont intéressées sur la source de survenue de cet antécédent maternel. McDonald (2000) [382] déclare que le SGB est un agent pathogène important dans des **infections intra-utérines** qui sous-tendent les fausses couches spontanées. L'étude de Daugaard [383] a associé la présence de streptocoques du groupe B dans les urines et dans le col utérin à des **avortements spontanés tardifs**, mais El Kersh et *al.*, (2002) [384] n'ont trouvé aucune corrélation avec un antécédent d'avortement spontané répété. Dans notre étude,

nous n'avons pas trouvé de liaison entre les femmes qui avaient un antécédent de fausses couches ou autres facteurs de risques et le portage de SGB.

Menace d'Accouchement Prématuro

Le terme « Menace d'Accouchement Prématuro » signifie une contractilité utérine précoce pouvant survenir entre 22^{ème} et 37^{ème} semaines d'aménorrhée, il s'agit d'une pathologie qui évolue spontanément vers l'accouchement prématuré en l'absence de traitement [385]. Quelques auteurs ont mis en évidence une augmentation du risque d'accouchement prématuré lors des modifications de la flore vaginale normale [386] qui est à 95% constituée de lactobacilles [387]. Dans notre étude, nous avons quatre cas des femmes ayant connu une MAP de 28^{ème} à 34^{ème} SA, Les recommandations du Collège National des Gynécologues-Obstétriciens de France suggèrent qu'une forte colonisation du tractus génital à SGB serait responsable de MAP et mériterait donc un traitement pendant la grossesse [388]. Le conseil supérieur d'hygiène à Bruxelles quant à lui, recommande une évaluation de ce risque pour savoir s'il est nécessaire de mettre en œuvre une prophylaxie intrapartum afin de prévenir une infection périnatale à SGB [389].

En complément, la littérature donne d'autres facteurs qui augmenteraient le risque de colonisation par SGB chez les femmes enceintes, il s'agit de:

Race

Dans une étude brésilienne portant sur 207 femmes dépistées dont 101 avec une sérologie VIH positif a conclu que la race non blanche était le seul facteur associé au portage du streptocoque B [375]. Une étude américaine [377] a considéré la race noire comme facteur prédictif de portage (OR = 1,54 ; IC 95%: 1,36–1,74) et la race hispanique comme facteur protecteur (OR = 0,88 ; IC 95% : 0,80–0,96). Valkenburg-Van den Berg [359] a comparé des patientes de 72 origines et a conclu que les patientes d'origine africaine ont le plus grand risque de portage du streptocoque B suivies des patientes d'origine européenne. Les patientes d'origine asiatique ont le moindre risque de colonisation (**Tab. 34**).

Tableau 34: Taux de portage du SGB selon l'origine ethnique [359].

Pays	N	% SGB Positive
Afrique	240	29
Asie	256	13
Amérique latine	245	22
Europe	907	21
Autres	10	30
Inconnu	44	27
Total	1702	27

Indice de masse corporelle élevée (IMC)

Dans la plus large étude de la littérature, Stapleton et *al.*, (2005) [377] ont montré que le risque de colonisation par SGB augmentait de 20% chez les femmes obèses (OR = 1,20 ; IC 95% : 1,13–1,28) et dans un travail de J. Dahan-Saal et *al.*, (2011) [390] retrouvent un effet protecteur de la maigreur (IMC < 18,5). Ce facteur n'a pas été recherché dans notre série.

Tabagisme

Le tabagisme a été considéré comme facteur prédictif de portage du streptocoque B ($p=0,012$), par certains auteurs [391], d'autres [377] le considèrent comme facteur protecteur (OR = 0,90 ; IC 95% : 0,83–0,97). Elbeitune et *al.*, (2006) [375] ne trouve pas de différence significative entre les patientes tabagiques ou non. Dans notre série, la notion de tabagisme passif n'a pas été trouvée.

Statut immunologique

Dans une étude brésilienne, le taux de portage était comparable entre les patientes VIH+ et VIH- suggérant que le portage est indépendant du statut sérologique et du degré d'immunodépression [375;377].

Autres facteurs liés à la grossesse en cours

L'âge gestationnel, où le prélèvement est réalisé, constitue un facteur influençant le taux de portage qui augmente au fur et à mesure que le délai entre le prélèvement et l'accouchement diminue: Yancey (1996) [235] a trouvé, avec un taux de portage de 26,5%, une valeur prédictive positive de 87% et une valeur prédictive négative de 96% si le prélèvement est réalisé dans les six semaines précédant l'accouchement. C'est pour cela que les recommandations émises par la plupart des sociétés savantes sont pour un prélèvement

entre 35^{ème} et 37^{ème} SA [315;316]. Jerbi (2007) [353] a retrouvé que le portage du SGB était associé de manière significative à la survenue d'épisode fébrile (fièvre > 38,5°C) au cours du travail (OR = 7,22 ; IC 95 % : 1,40–37,23 ; p = 0,03). Jerbi a recensé sept cas de **grossesse gémellaire** qui restent non significatifs, comme c'est le cas dans notre étude.

Tous les facteurs étudiés lors de la grossesse actuelle au moment du prélèvement dans notre étude, n'ont pas été retrouvés comme associés de façon significative au portage du SGB. Ces données sont en accord avec les travaux de Jaureguy et *al.*, (2003) [331].

Infections génitale

Certains auteurs repèrent une association entre le portage de SGB chez les femmes enceintes présentant une infection génitale c'est le cas de l'étude publiée par Orrett et *al.*, (2003) [254]. En outre les travaux publiés par Ferjani et *al.*, (2006) en Tunisie montrant que le risque d'infection génitale au cours de la grossesse est multiplié par trois par rapport à d'autres facteurs [255]. Dans notre étude aucune association statistique significative n'a été perçue entre le portage de SGB et la présence d'infection génitale au cours de la grossesse.

Une vaginose bactérienne est retrouvée chez 15-20% des femmes enceintes [261]. De nombreuses études concluent à un risque de prématurité multiplié par 2 en cas de vaginose bactérienne. Elle s'associe davantage encore à une grande prématurité (≤ 32 semaines d'aménorrhée [SA]), tout au moins dans les populations à forte prévalence de vaginose bactérienne [256]; Toute vaginose bactérienne doit être traitée pendant la grossesse [261].

Dans notre série, le vaginose est représenté par 34.9% des femmes enceintes, dont 8 femmes ayant un portage positif à SGB (13.1%). En outre, la vaginite mycosique a été observée chez 61.1% femmes enceintes, dont 14 (13.08%) ayant un portage positif à SGB. Parmi les différents types de mycose, c'est la mycose vaginale qui touche particulièrement les femmes enceintes. Même si elle est en principe sans risque, la femme enceinte ne doit pas la prendre à la légère et la soigner au plus vite pour écarter les risques sur le fœtus au moment de l'accouchement. D'ailleurs, elle est souvent facile à traiter, mais il faut rester vigilant pour éviter les récurrences. (<http://www.vaincrelesmycoses.com/mycose-et-grossesse-quels-sont-les-risques-comment-les-prevenir>). pour lesquelles le CDC [37], l'ANAES [261] recommandent une antibioprophylaxie systématique en per partum.

La flore vaginale est constituée de bactéries protectrices. Cet équilibre fragile doit être respecté. Aussi, un excès ou un défaut d'hygiène peuvent le perturber et entraîner des infections. Pour avoir une flore vaginale saine, il faut apprendre à adopter les bons comportements.

Pour conclure, un seul facteur de risque statistiquement significatif avec le portage de SGB a été trouvé dans notre étude, Il s'agit essentiellement du faible niveau socio-économique.

➤ **Analyse secondaire**

Première conclusion de notre travail montre l'importance de la mise en place des stratégies de dépistage des souches de *S. agalactiae* responsables d'infections materno-fœtale. Ce résultat suggère que le risque infectieux lié à la colonisation fréquente par cette bactérie chez la femme n'est pas seulement lié aux facteurs de risque de l'hôte mais est aussi dépendant de la nature phylogénétique de cette dernière.

Le deuxième objectif visionné dans cette étude a pour but de réaliser pour la première fois une recherche épidémiologique moléculaire comparative et approfondie, en décrivant les principales caractéristiques des souches de SGB isolées à Guelma et à Marseille.

Pour répondre à cette question, le premier aspect technique de cette analyse porte sur l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques ainsi que la détection du support génétique responsable de cette résistance. Les souches de *S. agalactiae* restent actuellement sensibles à la pénicilline, à l'ampicilline et à la vancomycine [8;111;120;208], sauf cas très exceptionnels décrits dans la littérature [111]. Nous avons donc choisi d'étudier et détailler les gènes de résistance (support génétique) vis-à-vis trois molécules d'antibiotiques (érythromycine, clindamycine et tétracycline), pour lesquelles une évolution de la résistance est possible [120;208;392]. Le deuxième aspect de cette recherche est le typage moléculaire par PCR et finalement le génotypage par séquençage (MLST).

Streptococcus agalactiae est une cause majeure de maladie invasive chez les nouveaux nés et un agent pathogène émergent chez les adultes [3]. Ce rapport présente pour la première fois, une analyse moléculaire détaillée des isolats de SGB circulant à Guelma et à Marseille. En outre; un seul rapport publié en 2003 par Ait et Hamidechi montrent l'effet de l'âge, du sexe

et du lieu de naissance des nouveau-nés vis-à-vis de l'infection par le SGB, ainsi que la répartition des sérotypes par des technique classique, grâce à une étude multicentrique à Constantine, Algérie. Cette étude aperçoit que la colonisation par le SGB en fonction du sexe est significative. Enfin, le statut socioprofessionnel favorable diminue considérablement le risque d'infection néonatale ainsi que les sérotypes III et Ia sont prédominants [24].

➤ **La spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS)**

Cette étude présente aussi le premier rapport de l'utilisation du MALDI-TOF pour identifier les souches de SGB isolées à Guelma, Algérie. Cette technique a été précédemment utilisée avec succès dans l'identification de *S. agalactiae* [393]. En outre, le MALDI-TOF MS pourrait différencier de façon fiable le SGB putative isolé sur milieux de culture chromogène telle que le chromID Strepto B agar. Cette étude a démontré que l'utilisation du MALDI-TOF MS est un moyen rapide, sensible et méthode précise pour l'identification de SGB, notamment les souches qui colonisent les femmes enceintes basé sur les travaux de Binghuai et *al.*, (2014) [394].

Le MALDI-TOF MS (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF, time-of-flight mass spectrometry) a émergé comme une nouvelle technique pour l'identification des espèces [395-397]. Cette technique permet l'identification des bactéries par analyse de leurs protéines totales (protéines ribosomales et protéines associées aux membranes). Selon les études, les résultats d'identification obtenus avec la spectrométrie de masse (95% - 97,4% d'identifications correctes) sont comparables, voire meilleurs, à ceux des systèmes automatisés utilisant des méthodes conventionnelles (75,2%-92,6%). La qualité de l'identification est fonction de la richesse de la banque de spectres enregistrés. Outre l'identification des micro-organismes, il est possible de réaliser du génotypage de polymorphismes ponctuels (SNPs). La spectrométrie de masse devient une alternative au séquençage standard des gènes 16S rDNA [185].

Le regroupement de dendrogramme MSP de nos isolats par MALDI-TOF MS a montré des groupes spécifiques en fonction de la source et la situation géographique (Guelma vis-à-vis Marseille). Un tel regroupement des isolats en utilisant le MALDI-TOF MS en fonction de la source géographique (Biotyping) a été récemment rapporté pour *K. pneumoniae* isolés d'Algérie et de Marseille par Berrazeg et *al.*, (2003) [21]. Outre, Lartigue et *al.*, (2001) rapportent aussi que l'analyse MALDI-TOF MS peut identifier des souches de SGB fortement

virulente appartenant au clone ST-17 ou l'émergence du clone ST-1 (Génotyping) [23]. Cependant, ces données ont été confirmées par nos résultats. Par contre, une discordance a été signalée; quatre isolats en dehors de ces deux tribus (STs 1 et 17) hébergent les pics attendus (6250 et 7625 Da). Une telle approche pouvait être mise en œuvre comme un outil ordinaire de routine pour identifier les clones de virulences.

Les applications de la spectrométrie de masse dans le domaine de la microbiologie sont en plein développement. La principale application de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF est l'identification rapide de la majorité des espèces bactériennes et fongiques ayant une importance clinique. Autres aspects de cette technologie sont potentiellement intéressants, comme sa contribution au domaine de la nouvelle caractérisation des espèces et la détection de certains mécanismes de résistance [22;398;399]. Ainsi son application en bactériologie clinique et à la distinction de variantes génétiques [400]. Par ailleurs, le génotypage des micro-organismes, à partir des produits d'amplification génique, est une autre application, pleine d'avenir [185].

➤ **Antibiotype**

En raison de la préoccupation de la résistance aux antibiotiques et l'importance de l'administration d'antibiotiques pour la prévention des maladies invasive à SGB, l'un des objectifs de cette étude était de déterminer le support génétique de la résistance.

Aucune souche résistante ou de sensibilité diminuée à la pénicilline G ou à l'amoxicilline n'a été observé dans notre collection. Pour l'instant de telles souches ont été isolées juste au Japon et aux Etats Unis [110;111].

Dans cette enquête épidémiologique, le taux global de la résistance à l'érythromycine parmi les isolats analysés était 40% (45,4% et 34,7% à Guelma et à Marseille, respectivement), dont 46.6% représente seulement les prélèvements vaginaux. Un tel niveau de résistance a été signalée au Taiwan (44%), la Tunisie (40%), le Maroc (38,5%), la Suisse (30%) et l'USA (32% -54%) [11;12;15;120;401;402]. Compte tenu des niveaux élevés de la résistance à l'érythromycine signalés aux Etats-Unis, les lignes directrices des CDC en 2010 ne recommandent plus l'utilisation de l'érythromycine [208]. Cette forte résistance diffèrent considérablement de ceux rapportés au Japon (12,8%), l'Italie (16,5 %) et la Pologne (18,4%) [14;403;404]. En outre, la résistance à l'érythromycine observée en France s'est étendue de 20,2% en 2007 à 35,3% en 2010 [288]. Par conséquent, nous avons constaté que la résistance liée à cet antibiotique a émergé dans plusieurs pays, en accord avec des observations précédentes [9;405].

Plusieurs études publiées entre 2000 et 2008 retrouvent une résistance à l'érythromycine plus fréquente entre 10.1% et 25.4% parmi les souches invasives [122;392;406;407]. Ces données exposent l'augmentation ascensionnelle de cette résistance au cours des années [120;408], où la fréquence atteint un taux de 40% en 2014. Nous avons constaté que les différences dans les taux de résistance aux macrolides sont influencées par plusieurs facteurs; la région géographique [9;114;405] et le temps. Basé sur l'étude de Lambiase et *al.*, (2012) montrant que la résistance au macrolide et à la clindamycine a été de 16,5% au cours de l'année 2005 et elle a augmenté jusqu'à 69,9% en 2008 [409]. Comme sur la base des différences dans les soins de santé, les facteurs les plus fréquemment associés à ces différences de résistance sont l'utilisation inappropriée d'antibiotique [410].

En outre, La résistance à la clindamycine a été aperçue dans 30,1% des isolats (43.2% de Guelma contre 18.3% à Marseille). La résistance croissante aux macrolides-lincosamides parmi les souches de SGB observés récemment dans de nombreux pays est un problème thérapeutique chez les patients allergiques aux β -lactamines. En raison du mécanisme commun de la résistance au MLS, si l'isolat est sensible à la clindamycine, mais résistants à l'érythromycine, la clindamycine peut être utilisée que si les tests de résistance inductible à la clindamycine est négatif [411]. La vancomycine est réservé aux femmes allergiques si leur isolat est intrinsèquement ou inductible résistant à la clindamycine, comme bien que si la sensibilité aux deux agents est inconnu [411].

Finalement, cette observation souligne la nécessité continue de la surveillance accrue et systématique des profils de sensibilité aux antibiotiques au niveau régional.

➤ Support génétique de la résistance

Dans notre étude, il y'avait une prédominance du phénotype cMLS_B observé dans les isolats de Guelma médiée par le gène *ermB*, tandis que le phénotype M était plus commun à Marseille médiée par le gène *mefA/E*. Les souches porteuses du gène *ermB* expriment toutes un phénotype cMLS_B, alors que le gène *ermA* s'exprime autant par un phénotype cMLS_B qu'un phénotype iMLS_B [116]. Les souches possédant le gène *mefA/E* expriment toutes un phénotype M.

Une prédominance du phénotype MLS_B a été rapporté dans d'autre pays; l'Australie, la Suisse et la Tunisie [9;12;15;412], alors que dans le Brésil et l'Italie, les phénotypes cMLS_B et le phénotype M ont été détectés avec des fréquences égale [13;18]. En France (Paris), le phénotype iMLS_B était plus commun (fréquent) en 2001, alors que le phénotype de résistance cMLS_B était plus dominant en 2007 jusqu'au 2010 [288;413]. Les mécanismes de résistance

aux macrolides et la distribution de ces gènes parmi les isolats de SGB dans cette étude étaient en conformité avec le phénotype de résistance au macrolide. Ces données est en accord avec des travaux antérieure [8;10;116].

Rarement, trois isolats du phénotype iMLS_B avaient une combinaison de deux gènes *ermA* et *ermB*. Cette coexistence a été documenté précédemment [109], et trois isolats présentent une combinaison entre le gène *mefA/E* et le gène *ermA*, exprimant le phénotype M, telle association a été décrite en Espagne [10]. Ces résultats suggèrent que ces souches possèdent deux mécanismes de résistance: le système d'efflux et la modification ribosomal.

Le nombre croissant observé des isolats résistants aux macrolides souligne la nécessité la surveillance et le contrôle continu des profils de sensibilité aux antimicrobiens pour identifier l'émergence de cette résistance dans une population donnée (support génétique).

Bien que la tétracycline soit un antibiotique à large spectre qui n'est pas largement utilisé comme traitement des infections à streptocoques, un taux élevé de résistance à la tétracycline a été noté dans notre étude (88,8%); 100% observé chez les isolats de Guelma vis-à-vis 77.6% à Marseille.

Les taux de résistance à la tétracycline peuvent atteindre ou dépasser les 90%, ce qui est similaire au données de la littérature [13;58]. Le mécanisme le plus fréquent de résistance à la tétracycline pour les bactéries Gram positif est la présence du gène *tetM* [404;414]. Comme attendu, la majorité de nos isolats porte le gène *tetM* (83.8 %), alors que le gène *tetO* n'est détecté que chez 4.3% des souches. Dans 3.2% des cas, il y avait une association de *tetM* et *tetO*.

Cette forte résistance a été déjà décrite en Tunis (97,3%), la France (94%) et l'Italie (69,9%) [8;15;409], quoi qu'un niveau inférieur a été détectée au Japon (46,5%) [403].

Dans cette étude, nous avons constaté que la majorité des isolats porteurs du gène *ermB* hébergent également le gène *tetM* (96,4%). La présence contemporaine à la fois du gène *ermB* et *tetM* a déjà été décrite précédemment [14].

➤ **Typage Moléculaire**

La détermination du sérotype a été traditionnellement appliquée dans les études épidémiologiques. Cette technique présente un aide important dans le développement de vaccins, qui contient globalement de protection capsulaire des polysaccharides ou des polysaccharides conjugués à une protéine [230].

Parmi les 93 souches de GBS isolées de différents prélèvements (PV, urine et hémoculture), les principaux sérotypes capsulaires identifiés dans notre population sont; le sérotype V (44,1%), les sérotypes II et III (18,3 % pour chacun) et le sérotype Ia (9.6%). Nos données montrent que le sérotype V était significativement plus répandu dans les isolats de Guelma et ceux de Marseille, comme également rapporté en USA (48.1%), Koweït (38,5%) et au Japon (19,1%) [403;415;416]. Toutefois, d'autres auteurs ont montré une prédominance des autres sérotypes tels que; le sérotype III au Maroc, le sérotype IV dans les Emirats arabes unis, le sérotype Ia au Brésil, sérotypes VI à VIII au Japon et sérotypes III (25.7%) et V (23.4%) en France [18;156;288;412].

Les sérotypes Ia, III et V sont connus depuis les années 1990, comme les sérotypes les plus fréquents dans les infections invasives néonatales dans les pays occidentaux [147], mais habituellement, c'est le sérotype III qui est prédominant et en particulier le clone ST-17 retrouvé dans une grande majorité des cas de méningites du nouveau-né [122]. Dans notre étude, nous trouvons paradoxalement une très nette prédominance du sérotype V [58]. Par ailleurs, seulement trois souches de sérotype III possède la séquence ST-17 trouvé uniquement dans les isolats de Marseille. Nous n'avons isolé que trois souches des sérotypes IV, VII et VIII et aucune souche de sérotype Ib, VI et IX n'a été trouvée. Ces sérotypes (VI, VIII et IX) ont une prévalence faible dans les pays occidentaux: les sérotypes VI et IX ne sont retrouvés quasiment qu'au Japon [146]. Des souches de sérotype VIII ont néanmoins été isolées au Danemark [417].

Les sérotypes prédominants dans les infections chez les adultes sont les sérotypes V, Ia, III et le sérotype Ib [418]. De même, dans les études de Farley (2001) [283], Phares (2008) [120] et Skoff (2009) [3] portant sur des souches de streptocoque du groupe B provenant d'infections variées chez l'adulte, les pourcentages sont semblables. Cependant, dans d'autres études réalisées chez l'adulte, les pourcentages varient sensiblement par rapport à nos résultats. Ainsi, dans l'étude de Martins (2012) [419] portant sur des streptocoques du groupe B isolés d'hémoculture, les sérotypes Ia et V représentent respectivement 34,7% et 19,6%. Outre; l'analyse de la distribution des sérotypes des souches isolés au niveau d'urine où d'hémoculture ne peuvent pas être exploitées vu le faible nombre des isolats appartenant à ces deux sources. Dans celles de Lambertsen (2004) [286] et Bergsen (2008) [420] sur des souches d'infections invasives d'origine diverse, le sérotypes III est prédominant et représente respectivement 29,4% et 24% des souches mais le sérotype V reste présent dans 18,7% et 24% des souches. Pour les souches d'infections néonatales. En effet, d'après la méta-analyse d'Edmond (2012) [234], les sérotypes les plus fréquents dans les infections néonatales sont le

sérotypes III avec 49% des souches et le sérotype Ia avec 23% des souches, quant au sérotype Ib, prédominant chez l'adulte, il représente moins de 10% des souches isolées chez le nouveau-né.

En comparant les souches d'origine vaginale isolées à Guelma vis-à-vis à celles isolées à Marseille; le sérotype V est prédominant (44.6%), tandis que les sérotypes II et III dominent la collection Algérienne (47.7% à Guelma contre 23.3% à Marseille).

Cette différence dans la distribution des sérotypes reflète les spécificités des réponses immunitaires selon la population étudiée. En outre, des études mondiales de distribution des sérotypes ont montré que la distribution des sérotypes des souches de SGB varie tant géographiquement qu'au cours du temps [8;14;421]. Tous les sérotypes (I, III et V) sont fréquemment associés dans le monde entier avec des infections à SGB chez les adultes enceintes et non enceintes [419;421;422].

La proportion des souches NT ont montré des pourcentages beaucoup plus élevés (6,4%) dans les isolats de Marseille par rapport à ceux isolés de Guelma, ceci pourrait être le résultat d'acquisition d'une capsule non caractérisé où des mutations dans gènes de capsule [416;421;423].

Les études épidémiologiques de séroprévalence sont une mesure importante pour déterminer l'incidence et la proportion des sérotypes qui circulent dans une population [421].

Note: Le taux élevé de résistance aux macrolides observé dans notre étude est sûrement lié au fait que la majorité de nos souches sont de sérotype V [412;424]. La présente étude, cependant, n'a pas montré cette association [13], quoiqu'une association entre le ST-23 et le phénotype M fût trouvée [156].

➤ **Multi Locus Sequence Typing (Génotypage)**

Ce travail présente le premier rapport d'analyse MLST des souches de SGB circulant en Algérie.

La structure de la population de SGB expose une clonalité remarquable, avec de grandes différences au sein des groupes de clones. Dans cette étude, 93 isolats appartenant à 37 séquences types ont été identifiés. D'autres études montrent la présence de diverses tribus (Séquences Types) entre les différentes collections des isolats [18;153].

En outre, 16 nouvelles combinaisons d'allèles ne figurant pas dans la base de données MLST ont été découvertes. Ces nouvelles séquences types ont été soumis à la base de données PubMLST ([http:// pubmlst.org/sagalactiae/](http://pubmlst.org/sagalactiae/)); STs 685-700.

Puisque les Séquence Types (STs) se regroupent en complexes clonaux (CCs), la signification générale concernant les proportions des STs et les CCs en fonction de l'origine des souches va dans le même sens.

Les principaux STs que nous avons identifiés dans cette étude (STs; 1, 10, 17, 19 et 23) ont également été identifiés comme les principaux STs isolées des souches au cours des maladies infectieuses [153;156]. Malgré cette grande diversité génétique, les séquences types trouvée appartiennent à cinq complexes clonaux (CCs). À ce jour, cinq grands CCs, à savoir, CC1, CC10, CC17, CC19 et CC23, ont été identifiés dans le monde entier, surlignant la diversité génétique de *S. agalactiae* chez l'homme [150;404].

Dans les études avec des effectifs peu nombreux, les logiciels d'analyse phylogénétique ne regroupent pas les isolats de la même façon. Dans l'étude de Fracis (2009) [41], pour les souches d'origine pulmonaire, ST-1 et ST-19 sont regroupés par le logiciel eBURST au sein du même complexe clonal, le CC19, alors que, par exemple, dans notre étude et l'étude de Luan (2005) [157], les souches avec ces profils sont répartis dans deux complexes clonaux distincts, CC1 et CC19. Pour la même raison, dans les différentes études, en fonction du nombre de souches pour chaque ST, le complexe clonal peut porter un numéro différent, par exemple, les complexes clonaux CC7, CC8, le CC10, CC12 sont, en réalité, le même complexe clonal, nommé CC10, démontré dans cette étude.

Nos résultats montrent aussi que la majorité des streptocoques du groupe B (d'origine vaginale) appartient aux complexes clonaux CC19, CC1, CC23 et CC10. Les CC1 et CC19 sont également prédominants respectivement dans les études de Bisharat *et al.*, (2005) et Manning *et al.*, (2006) [425]. Néanmoins, le CC17 reste associé aux souches invasives car ce complexe est peu représenté parmi les souches de colonisation maternelle [425], présenté en faible proportion dans notre étude.

Ces données montrent une différence de distribution clonale entre Guelma et Marseille. Le CC19 domine la collection Algérienne, les CCs 10, 17 et 23 dominent la collection Française, tandis que le CC1 est distribué en équivalence. Ces différences pourraient être expliquées par la variation géographique ou à la distribution des souches de colonisation maternelle [425].

Notre étude suggère la présence des différents groupes phylogénétiques (STs) entre les isolats de Guelma et de Marseille, montrant des différences dans la diversification génétique entre les séquences types (STs). Ces diverses populations clonales ont également été trouvés dans d'autres pays, dont l'Italie, la Pologne, la France, l'USA, Dakar et Bangui [14;150;156;159;404]. Les souches de SGB qui appartient à ces différents complexes clonaux

ont été exposé comme la cause majeure responsable des infections néonatale à SGB [150;404]. Tels différences entre les CCs peuvent être dues à différentes capacités de transfert horizontal des gènes, dont le mécanisme reste incertain chez le SGB.

En effet, comme montré par Mee-Marquet et *al.*, (2008) la distribution des souches des flores naturelles de l'homme dans les différents complexes clonaux diffèrent sensiblement selon la nature du site anatomique concerné [156]. Les souches des trois lignées phylogénétiques infectantes chez l'adulte sont plus particulièrement capables de coloniser le tractus digestif; en revanche, les souches de CC17 retrouvée dans les infections néonatales sont plus souvent des commensales des voies génitales. Bien que les portes d'entrée des infections invasives chez l'adulte soient peu documentées, il est assez probable que nombre d'infections chez ces patients ait comme porte d'entrée le tractus digestif. Parmi les lignées phylogénétiques impliquées dans les infections de l'adulte, aussi bien locales qu'invasives, les souches de la lignée CC1 ont une place importante. Cette lignée était quasi inexistante avant les années 1990. On peut donc considérer que l'émergence et la diffusion de ses souches n'est pas sans lien avec l'émergence des infections à *S. agalactiae* chez l'adulte observée depuis ces mêmes dates. L'homogénéité génomique d'une part et du contenu prophagique du génome d'autre part sont aussi des indices du peu d'ancienneté de cette lignée [50].

Dans les autres études chez l'adulte, les souches sont aussi réparties majoritairement dans le complexe clonal CC1-19 et dans une moindre proportion, dans les complexes clonaux CC10 et CC23. Par exemple, dans l'étude de Luan (2005) sur des souches provenant d'hémocultures et d'infections du système nerveux central [157], la majorité des souches d'infections invasives fait partie du CC1-19 (52,8%), les autres complexes clonaux étant bien moins représentés. Dans les études de Salloum sur des souches d'infections cutanées ou ostéo-articulaires [165] ou sur des souches de bactériémies [418], les souches invasives appartenant au CC1-19 représentent 48,2% et 42%, et celles appartenant au CC23, 31% et 20%. Dans l'étude d'Haguenoer (2011) [426], les souches provenant d'hémocultures chez l'adulte appartiennent aux CC1-19 et CC10 pour 29,4% et aux CC17 et CC23 pour 17,6%.

A l'inverse, dans les études portant sur les infections néonatales, le complexe clonal le plus fréquent est le CC17, suivi par les CC1-19 et CC23. Ainsi, dans l'étude d'Haguenoer (2011) [426], le CC17 représente 64,4% des souches, et le CC1-19, 18,6% des souches. De même, dans l'étude de Salloum [418], le CC17 regroupe 67% des souches, alors que les complexes clonaux CC23 et CC1-19 ne comprennent, respectivement, que 13% et 10% des souches.

Dans d'autres études, le complexe clonal CC17 est bien représenté, mais le CC1-19 est le complexe clonal majoritaire. Ainsi, dans les études de Luan [157], Bergsen [160], Manning [153], le CC1-19 représente entre 40 et 45% des souches et le CC17 comprend 30 à 35% des souches.

L'augmentation de l'incidence des infections à streptocoque du groupe B chez les adultes ne semble pas due à l'augmentation de sérotypes plus virulents, mais est probablement due au vieillissement de la population et à l'augmentation du nombre d'adultes avec des pathologies chroniques comme le diabète dont la prévalence a beaucoup augmenté chez les adultes ces dernières décennies [3].

Dans notre étude, le degré de variabilité des sérotypes diffèrent au sein de chaque CCs. Nos résultats montrent une **corrélation statistique dans la distribution** des sérotypes observé au sein de certaines des principales lignées génétiques: cps III/ST-19/CC19, cps V/ST-1/CC1 et cps II/ST-10/CC10 identifiés parmi les isolats de Guelma et de Marseille, tandis que les cps Ia/ST-23/CC23, NT/ST-8/CC10 et cps III/ST-17/CC17 incluant la majorité des isolats de Marseille. Ces différences entre la distribution des CCs peuvent être dues à des capacités différentes dans le transfert horizontal des gènes, dont le mécanisme reste restreint chez les streptocoques de group B.

A l'intérieur de chaque lignée phylogénétique plus particulièrement observé entre Guelma et Marseille, l'étude de la diversité génétique montre que les souches de SGB constituent une population particulière au sein des complexes clonaux CC1, CC10 et CC19. Ce résultat suggère qu'à l'intérieur de ces lignées le pouvoir invasif des souches peut être relativement variable. Par conséquent, la notion d'appartenance à un complexe clonal donné d'un isolat n'est pas suffisante pour évaluer le risque infectieux. Cet élément est à prendre en compte dans la mise au point d'éventuelles stratégies de dépistage et de prévention.

Partie 5. Conclusion et perspective

Le taux de portage chez la femme enceinte durant 13 mois d'étude est de 9%. Ce taux est faible comparativement à celui trouvé dans la littérature. Un seul facteur de risque cité dans la littérature a été significativement associé à ce portage; il s'agit du faible statut socio-économique.

Au terme de cette étude, nous pouvons conclure que compte tenu de la prévalence du portage maternel du SGB dans nos conditions et de l'absence de véritables facteurs prédictifs du portage vaginal du SGB, il paraît souhaitable d'instaurer une politique de dépistage (des mesures préventives) systématique à proximité du terme afin de réduire l'incidence et la mortalité due à cette affection.

La prise en charge optimale en cas d'association SGB et grossesse nécessite une collaboration étroite entre obstétriciens, pédiatres et microbiologistes pour une prise en compte immédiate des données d'anamnèse infectieuse obstétricale et l'établissement d'une surveillance et d'une thérapeutique néonatale éventuelle adaptée.

Une telle politique de prévention nécessite une approche et une harmonisation pluridisciplinaire. Nous proposons à cet effet l'adoption de quelques mesures de prévention:

- La réalisation d'un dépistage du streptocoque B par culture chez les patientes ayant consulté vers la fin du 3^{ème} trimestre avec demande d'antibiogramme en cas d'allergie à la pénicilline.
- L'intégration d'une antibioprofylaxie pour les patientes répondant aux critères et suivant les protocoles dressés par les recommandations des sociétés et l'équipement des pharmacies en produits alternatifs aux pénicillines pour les cas d'allergie.
- La considération de la stratégie basée sur les facteurs de risque dans notre contexte surtout qu'une grande partie des patientes que nous prenons en charge ne bénéficient d'aucun suivi antérieur.
- La réalisation de tests cutanés chez les patientes ayant une histoire non documentée d'allergie à la pénicilline avant de prescrire d'autres antibiotiques.
- L'intégration de ce protocole dans les séances de formation continue du personnel soignant au niveau de la salle d'accouchement.

En effet, le développement de nouveaux tests de diagnostic rapide du SGB plus fiables et moins onéreux modifiera peut être la pratique du dépistage systématique maternel. Au lieu d'effectuer un prélèvement au troisième trimestre, il sera alors possible de se contenter d'un test lors de l'admission en salle de naissance (les résultats étant disponibles en quelques

Conclusions et perspectives

minutes), ce qui permettra de ne proposer l'antibioprophylaxie qu'aux parturientes effectivement porteuses de SGB lors du travail.

Dépistage et antibioprophylaxie dans les cadres recommandés sont et demeurent les fondements d'une stratégie claire et efficace pour éviter les complications du portage du *S. agalactiae*.

En outre, ce travail présente certaines limites;

Au cours de notre étude nous n'avons pas pu inclure toutes les femmes ayant consulté dans les deux cabinets de gynécologues au cours de la période de travail, pour des problèmes d'organisation et/ou pour un suivi de grossesse. Cette base de données permettrait d'identifier réellement des facteurs de risque de portage par comparaison entre les femmes colonisées et non colonisées par le SGB.

- Faute de données complètes pour certains dossiers, nous n'avons pas pu étudier tous les cas de SGB positif.
- Il aurait été plus bénéfique de faire un suivi des femmes à statuts SGB positif afin de tirer les conclusions sur les risques encourus (rupture prématurée des membranes, nouveau-né infecté). Notre étude n'a pas non plus évalué les risques materno-foetales chez des nouveau-nés, elle ne s'est penchée que sur les femmes enceintes.

Les résultats de cette étude permettent néanmoins de fournir des données épidémiologiques sur les souches de *S. agalactiae*. Ce type d'étude d'incidence représente un des éléments épidémiologiques qui peut être intégré dans un programme plus global de lutte contre la dissémination des infections à SGB.

Parallèlement, la présente étude donne un aperçu de la distribution des sérotypes, génotypes et la sensibilité aux antibiotiques des isolats de SGB circulants à Guelma et à Marseille. Une corrélation entre les sérotypes et l'appartenance aux complexes clonaux a été mise en évidence. Les résultats suggèrent que les souches de SGB circulant ont une large diversité phénotypique et génotypique et que les isolats résistants aux macrolides peuvent survenir à la fois par la propagation clonale et l'acquisition indépendante de gènes de résistance. Ces données sont importantes pour aider à la conception des stratégies de prévention et de traitement pour les infections à SGB dans une région donnée.

Conclusions et perspectives

En utilisant le MALDI-TOF MS, tous les isolats de GBS ont été correctement identifiés au niveau de l'espèce. Cette technique change l'approche des laboratoires de routine pour l'identification des microorganismes et se positionne comme le test de première ligne pour tous les isolats, réservant aux techniques phénotypiques conventionnelles à l'identification des espèces. L'application de MALDI-TOF pour l'identification des bactéries présente les avantages suivants: rapidité, facilité d'utilisation, reproductibilité, traçabilité, accès à l'instrument 24h sur 24h. Ceci permet d'adresser les contrôles microbiologiques très rapidement et d'améliorer ainsi la prise de décision dans les investigations microbiologiques menées par les industries pharmaceutiques. Seul l'investissement de l'appareil (150-200 K€) est susceptible de ralentir l'introduction de cette technique dans les laboratoires de microbiologie. Par ailleurs, le génotypage des micro-organismes, à partir des produits d'amplification génique, est une autre application pleine d'avenir.

Les applications de la spectrométrie de masse dans le domaine de la microbiologie sont en plein développement. Cette technique expose une grande utilité dans le diagnostic microbiologique dont il faut introduire cette nouvelle technologie dans les laboratoires d'analyse Algérien.

Concernant la sensibilité aux antibiotiques, toutes les souches sont sensibles aux bêta lactamines, qui constituent le traitement de référence. En revanche, nous avons trouvé 40% des souches résistantes à l'érythromycine, ce qui confirme la nécessité de réaliser un antibiogramme en cas d'allergie aux bêta-lactamines.

Compte tenu de la sévérité de l'infection néonatale à SGB dont l'origine est la présence de ce germe dans les voies génitales de la mère, il est capital d'instaurer des mesures préventives afin de réduire l'incidence et la mortalité due à cette affection.

Par ailleurs, le sérotype capsulaire V est largement prédominant parmi nos souches (44.1%), le sérotype III connu pour sa pathogénicité chez les nourrissons représente 18.3% des souches, et seulement trois souches possèdent la séquence ST-17. Cependant, étant donné l'incidence croissante des infections à SGB chez l'adulte, l'incapacité à prévenir l'infection néonatale tardive par l'antibioprophylaxie per-partum et l'infection au cours de la grossesse, le développement d'un tel vaccin suscite un intérêt grandissant.

Conclusions et perspectives

Des essais cliniques avec administration de candidats vaccins préparés à base de capsules de différents sérotypes de SGB ont été réalisés, démontrant que la capsule constituait effectivement un candidat intéressant pour la mise au point d'un vaccin dirigé contre SGB. Cependant, la synthèse d'un vaccin procurant une immunité efficace contre tous les sérotypes demeure un problème délicat. Des protéines de surface de SGB, représentent une deuxième cible vaccinale potentielle [48].

La diversité des lignées phylogénétiques de SGB représenté dans cette étude est majoritairement impliquée dans les infections invasives chez les adultes et les nouveau-nés pour leur grande majorité, appartiennent à un seul complexe clonal CC1, CC17, CC19 et CC 23.

Pour conclure, les données obtenues dans cette étude apportent un nouvel éclairage sur le besoin d'une caractérisation plus rigoureuse et d'une détection de corrélations entre les sérotypes, les gènes de résistance et les groupes clonaux de SGB circulant dans une population. Les études génétiques comparatives de *S. agalactiae* seront essentielles pour exécuter des comparaisons épidémiologiques entre les pays, l'évolution de cette espèce et aussi bien que pour le développement des vaccins. Finalement, vu l'augmentation remarquable des taux de résistance à l'érythromycine, la surveillance statistique locale est recommandée dans la direction de l'antibiothérapie empirique pour empêcher le développement de telles infections. Plus loin, d'autres études épidémiologiques dans d'autres villes en France et dans d'autres villes Algériennes sont nécessaires pour appuyer et supporter nos conclusions.



***Références
Bibliographiques***



Références Bibliographiques

Liste des références

- 1 AL Safadi R: Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé (Infectiologie, Vaccinologie). Impact d'éléments génétiques variables sur l'expression de quatre gènes de virulence chez *streptococcus agalactiae*. Université François-Rabelais de Tours 2010.
- 2 Eskandarian N, Ismail Z, Neela V, van BA, Desa MN, Amin NS: Antimicrobial susceptibility profiles, serotype distribution and virulence determinants among invasive, non-invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* (group B *streptococcus*) from Malaysian patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015;34:579-584.
- 3 Skoff TH, Farley MM, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Gershman K, Harrison LH, Lynfield R, Mohle-Boetani J, Zansky S, Albanese BA, Stefonek K, Zell ER, Jackson D, Thompson T, Schrag SJ: Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. Clin Infect Dis 2009;49:85-92.
- 4 Udahemuka M.: Thèse de Doctorat en Pharmacie. Prévalence de streptocoque B chez les femmes enceintes consultant a l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de Rabat. Université Mohammed V de Rabat 2013.
- 5 Kago I, Ndayo-Wouafo M, Tchokoteu PF, Tetanye E, Tietche F, Doumbe P, Mbonda E, N'Koulou H, Mbede J: Neonatal *streptococcus* group B infection in Yaounde (Cameroon). Epidemiologic and clinical aspects. Ann Pediatr (Paris) 1992;39:583-587.
- 6 Mukhopadhyay S, Eichenwald EC, Puopolo KM: Neonatal early-onset sepsis evaluations among well-appearing infants: projected impact of changes in CDC GBS guidelines. J Perinatol 2013;33:198-205.
- 7 Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, Reingold AL, Harrison LH, Lefkowitz LB, Hadler JL, Danila R, Cieslak PR, Schuchat A: Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. N Engl J Med.20-342:15;2000
- 8 Poyart C, Jardy L, Quesne G, Berche P, Trieu-Cuot P: Genetic basis of antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* strains isolated in a French hospital. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:794-797.
- 9 Garland SM, Cottrill E, Markowski L, Pearce C, Clifford V, Ndisang D, Kelly N, Daley AJ: Antimicrobial resistance in group B *streptococcus*: the Australian experience. J Med Microbiol 2011;60:230-235.
- 10 Culebras E, Rodriguez-Avial I, Betriu C, Redondo M, Picazo JJ: Macrolide and tetracycline resistance and molecular relationships of clinical strains of *Streptococcus agalactiae*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1574-1576.
- 11 DiPersio LP, DiPersio JR: High rates of erythromycin and clindamycin resistance among OBGYN isolates of group B *Streptococcus*. Diagn Microbiol Infect Dis 2006;54:79-82.

Références Bibliographiques

- 12 Capanna F, Emonet SP, Cherkaoui A, Irion O, Schrenzel J, Martinez de TB: Antibiotic resistance patterns among group B *Streptococcus* isolates: implications for antibiotic prophylaxis for early-onset neonatal sepsis. *Swiss Med Wkly* 2013;143:w13778.
- 13 Pinto TC, Costa NS, Vianna Souza AR, Silva LG, Correa AB, Fernandes FG, Oliveira IC, Mattos MC, Rosado AS, Benchetrit LC: Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains isolated in Brazil between 1980 and 2006. *Braz J Infect Dis* 2013;17:131-136.
- 14 Gherardi G, Imperi M, Baldassarri L, Pataracchia M, Alfarone G, Recchia S, Orefici G, Dicuonzo G, Creti R: Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy. *J Clin Microbiol* 2007;45:2909-2916.
- 15 Hraoui M, Boutiba-Ben B, I, Rachdi M, Slim A, Ben RS: Macrolide and tetracycline resistance in clinical strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Tunisia. *J Med Microbiol* 2012;61:1109-1113.
- 16 Imperi M, Pataracchia M, Alfarone G, Baldassarri L, Orefici G, Creti R: A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. *J Microbiol Methods* 2010;80:212-214.
- 17 Lemire P, Houde M, Lecours MP, Fittipaldi N, Segura M: Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells. *Microbes Infect* 2012;14:1064-1076.
- 18 De Francesco MA, Caracciolo S, Gargiulo F, Manca N: Phenotypes, genotypes, serotypes and molecular epidemiology of erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:1741-1747.
- 19 Jones N, Bohnsack JF, Takahashi S, Oliver KA, Chan MS, Kunst F, Glaser P, Rusniok C, Crook DW, Harding RM, Bisharat N, Spratt BG: Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *J Clin Microbiol* 2003;41:253.2536-0
- 20 Lanotte P, Perivier M, Haguenoer E, Mereghetti L, Burucoa C, Claverol S, Atanassov C: Proteomic biomarkers associated with *Streptococcus agalactiae* invasive genogroups. *PLoS One* 2013;8:e54393.
- 21 Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richet H, Landraud L, Rolain JM: Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS One* 2013;8:e61428.
- 22 Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, Mesli E, Touati A, Rolain JM: Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 2012;7:e31676.
- 23 Lartigue MF, Kostrzewa M, Salloum M, Haguenoer E, Hery-Arnaud G, Domelier AS, Stumpf S, Quentin R: Rapid detection of "highly virulent" Group B

Références Bibliographiques

- Streptococcus* ST-17 and emerging ST-1 clones by MALDI-TOF mass spectrometry. J Microbiol Methods 2011;86:262-265.
- 24 Ait AA, Hamidechi MA: Incidence du streptocoque du groupe b (sgb) chez les nouveau-nés nés à Constantine (Algérie) et dans deux de ses banlieues. Intérêt de la détermination des sérotypes. Médecine et maladies infectieuses 2003;33:417-421.
 - 25 Nocard E, Mollereau A: Sur une mammite contagieuse des vaches laitières. Annales de l'Institut Pasteur 1887;1:109-126.
 - 26 Ross PW: Group-B *streptococcus*--profile of an organism. J Med Microbiol 1984;18:139-166.
 - 27 Bohnsack JF, Whiting AA, Martinez G, Jones N, Adderson EE, Detrick S, Blaschke-Bonkowsky AJ, Bisharat N, Gottschalk M: Serotype III *Streptococcus agalactiae* from bovine milk and human neonatal infections. Emerg Infect Dis 2004;10:1412-1419.
 - 28 Conseil Supérieur d'Hygiène: Prévention des infections périnatales à streptocoques du groupe B. Recommandations du Conseil Supérieur d'Hygiène Bruxelles 2003;n° 7721.
 - 29 Finch LA, Martin DR: Human and bovine group B streptococci: two distinct populations. J Appl Bacteriol 1984;57:273-278.
 - 30 Lancefield RC: A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J Exp Med 1933;57:571-595.
 - 31 Lancefield RC: A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (group B). J Exp Med 1934;59:441-458.
 - 32 Baker CJ, Barrett FF, Gordon RC, Yow MD: Suppurative meningitis due to streptococci of Lancefield group B: a study of 33 infants. J Pediatr 1973;82:724-729.
 - 33 Dermer P, Lee C, Eggert J, Few B: A history of neonatal *group B streptococcus* with its related morbidity and mortality rates in the United States. J Pediatr Nurs 2004;19:357-363.
 - 34 Eickhoff TC, Klein JO, Daly AK, Ingall D, Finland M: Neonatal sepsis and other infections due to group B beta-hemolytic streptococci. N Engl J Med 1964;271:1221-1228.
 - 35 American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn: Guidelines for prevention of group B streptococcal (GBS) infection by chemoprophylaxis: Pediatrics 1992;90:775-778.
 - 36 ACOG committee opinion. Prevention of early-onset group B streptococcal disease in newborns. Number 173--June 1996. Committee on Obstetric Practice. American College of Obstetrics and Gynecologists: Int J Gynaecol Obstet 1996;54:197-205.

Références Bibliographiques

- 37 CDC. Centers for Disease Control and Prevention: Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep 1996;45:1-24.
- 38 Anaes. Agence Nationale d'Accreditation et d'Evaluation en Sante: Antenatal prevention of early neonatal bacterial infection (September 2001). J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 2003;32:68-74.
- 39 Trivalle C, Martin E, Martel P, Jacque B, Menard JF, Lemeland JF: Group B streptococcal bacteraemia in the elderly. J Med Microbiol 1998;47:649-652.
- 40 Facklam R: What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin Microbiol Rev 2002;15:613-630.
- 41 Farcis M: Thèse de Doctorat en Médecine. Position phylogénétique des souches de *Streptococcus agalactiae* d'origine pulmonaire. Académie d'Orléans -Tours Université François-Rabelais Tours 2009.
- 42 Poyart C, Trieu-Cuot P: Physiopathologie des infections néonatales à *Streptococcus agalactiae*. Médecine thérapeutique / Pédiatrie 1999;2:27-31.
- 43 Fallon RJ: The rapid recognition of Lancefield group B haemolytic streptococci. J Clin Pathol 1974;27:902-905.
- 44 Munch-Petersen E, Christie R,: Further notes on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. Aust J Exp Biol Med Sci 19.195-23:193;45
- 45 Sridhar Rao PN: CAMP Test. JJMC Davangere 2009.
- 46 Biomerieux: Slidex strepto Plus. L'identification rapide des Streptocoques. Biomerieux 2012.
- 47 Euzéby JP: *Streptococcus agalactiae*. Dictionnaire de Bactériologie vétérinaire 2004.
- 48 CNR-Strep, Centre national de référence des streptocoques: Infection néonatale à *Streptococcus agalactiae*. CNR-Strep 2012;75014. Paris. France.
- 49 Tettelin H, Maignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli SV, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, Deboy RT, Davidsen TM, Mora M, Scarselli M, Ros I, Peterson JD, Hauser CR, Sundaram JP, Nelson WC, Madupu R, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sullivan SA, Daugherty SC, Haft DH, Selengut J, Gwinn ML, Zhou L, Zafar N, Khouri H, Radune D, Dimitrov G, Watkins K, O'Connor KJ, Smith S, Utterback TR, White O, Rubens CE, Grandi G, Madoff LC, Kasper DL, Telford JL, Wessels MR, Rappuoli R, Fraser CM: Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:13950-13955.
- 50 Salloum M: Thèse de Doctorat en Sciences de la vie. Les infections à *Streptococcus agalactiae* chez l'adulte Émergence et impact de la lysogénie. Université François - Rabelaisde Tours 2010.

Références Bibliographiques

- 51 Morrow DL, Kline JB, Douglas SD, Polin RA: Rapid detection of group B streptococcal antigen by monoclonal antibody sandwich enzyme assay. *J Clin Microbiol* 1984;19:457-459.
- 52 Baker CJ, Webb BJ, Jackson CV, Edwards MS: Countercurrent immunoelectrophoresis in the evaluation of infants with group B streptococcal disease. *Pediatrics* 1980;65:1110-1114.
- 53 Bou G, Figueira M, Canle D, Cartelle M, Eiros JM, Villanueva R: Evaluation of Group B *Streptococcus* Differential Agar for detection and isolation of *Streptococcus agalactiae*. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:676-678.
- 54 Overman SB, Eley DD, Jacobs BE, Ribes JA: Evaluation of methods to increase the sensitivity and timeliness of detection of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. *J Clin Microbiol* 2002;40:4329-4331.
- 55 Perry JD, Oliver M, Nicholson A, Wright J, Gould FK: Evaluation of a new chromogenic agar medium for isolation and identification of Group B streptococci. *Lett Appl Microbiol* 2006;43:615-6.18
- 56 Rosa-Fraile M, Rodriguez-Granger J, Cueto-Lopez M, Sampedro A, Gaye EB, Haro JM, Andreu A: Use of Granada medium to detect group B streptococcal colonization in pregnant women. *J Clin Microbiol* 1999;37:2674-2677.
- 57 Tazi A, Doloy A, Reglier-Poupet H, Hemet ME, Raymond J, Poyart C: Evaluation of the new chromogenic medium StrepB Select for screening of group B *Streptococcus* in pregnant women. *Pathol Biol (Paris)* 2009;57:225-228.
- 58 Beaudron GA: Thèse de Doctorat en Médecine. Infections urinaires à *Streptococcus agalactiae* chez le nourrisson de moins d'un an . Faculté de Médecine PARIS DESCARTES 2009;19.
- 59 Lindahl G, Stalhammar-Carlemalm M, Areschoug T: Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:102-127.
- 60 Persson E, Berg S, Bevanger L, Bergh K, Valso-Lyng R, Trollfors B: Characterisation of invasive *group B streptococci* based on investigation of surface proteins and genes encoding surface proteins. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:66-73.
- 61 Springman AC, Lacher DW, Wu G, Milton N, Whittam TS, Davies HD, Manning SD: Selection, recombination, and virulence gene diversity among group B streptococcal genotypes. *J Bacteriol* 2009;191:5419-5427.
- 62 Dmitriev A, Tkacikova L, Suvorov A, Kantikova M, Mikula I, Totolyan A: Comparative genetic study of *group B streptococcal* strains of human and bovine origin. *Folia Microbiol (Praha)* 1999;44:449-453.
- 63 Franken C, Haase G, Brandt C, Weber-Heynemann J, Martin S, Lammler C, Podbielski A, Lutticken R, Spellerberg B: Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing scpB and lmb. *Mol Microbiol* 2001;41:925-935.

Références Bibliographiques

- 64 Toomey KE, Oberschelp AG, Greenspan JR: Sexually transmitted diseases and native Americans: trends in reported gonorrhoea and syphilis morbidity, 1984-88. *Public Health Rep* 1989;104:566-572.
- 65 Adderson EE, Takahashi S, Wang Y, Armstrong J, Miller DV, Bohnsack JF: Subtractive hybridization identifies a novel predicted protein mediating epithelial cell invasion by virulent serotype III group B *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* 2003;71:6857-6863.
- 66 Santi I, Scarselli M, Mariani M, Pezzicoli A, Massignani V, Taddei A, Grandi G, Telford JL, Soriani M: BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B *Streptococcus* survival in human blood. *Mol Microbiol* 2007;63:754-767.
- 67 Seifert KN, Adderson EE, Whiting AA, Bohnsack JF, Crowley PJ, Brady LJ: A unique serine-rich repeat protein (Srr-2) and novel surface antigen (epsilon) associated with a virulent lineage of serotype III *Streptococcus agalactiae*. *Microbiology* 2006;152:1029-1040.
- 68 Dramsi S, Caliot E, Bonne I, Guadagnini S, Prevost MC, Kojadinovic M, Lalioui L, Poyart C, Trieu-Cuot P: Assembly and role of pili in group B streptococci. *Mol Microbiol* 2006;60:1401-1413.
- 69 Konto-Ghiorghi Y, Mairey E, Mallet A, Dumenil G, Caliot E, Trieu-Cuot P, Dramsi S: Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000422.
- 70 Rosini R, Rinaudo CD, Soriani M, Lauer P, Mora M, Maione D, Taddei A, Santi I, Ghezzi C, Brettoni C, Buccato S, Margarit I, Grandi G, Telford JL: Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol* 2006;61:126-141.
- 71 Schubert A, Zakikhany K, Schreiner M, Frank R, Spellerberg B, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ: A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. *Mol Microbiol* 2002;46:557-569.
- 72 Spellerberg B, Rozdzinski E, Martin S, Weber-Heynemann J, Schnitzler N, Luttkien R, Podbielski A: Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect Immun* 1999;67:871-878.
- 73 Waldemarsson J, Areschoug T, Lindahl G, Johnsson E: The streptococcal Blr and Slr proteins define a family of surface proteins with leucine-rich repeats: camouflaging by other surface structures. *J Bacteriol* 2006;188:378-388.
- 74 Seepersaud R, Hanniffy SB, Mayne P, Sizer P, Le PR, Wells JM: Characterization of a novel leucine-rich repeat protein antigen from group B streptococci that elicits protective immunity. *Infect Immun* 2005;73:1671-1683.
- 75 Michon F, Brisson JR, Dell A, Kasper DL, Jennings HJ: Multiantennary group-specific polysaccharide of group B *Streptococcus*. *Biochemistry* 1988;27:5341-5351.

Références Bibliographiques

- 76 Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, Rodrigues S, Fahey J, Wessels MR, Rubens CE: Structural and genetic diversity of group B *streptococcus* capsular polysaccharides. *Infect Immun* 2005;73:309.3103-6
- 77 Angata T, Varki A: Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* 2002;102:439-469.
- 78 Madureira P, Baptista M, Vieira M, Magalhaes V, Camelo A, Oliveira L, Ribeiro A, Tavares D, Trieu-Cuot P, Vilanova M, Ferreira P: *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein. *J Immunol* 2007;178:1379-1387.
- 79 Jones AL, Needham RH, Clancy A, Knoll KM, Rubens CE: Penicillin-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*: a novel mechanism for evasion of immune clearance. *Mol Microbiol* 2003;47:247-256.
- 80 Glaser P, Rusniok C, Buchrieser C, Chevalier F, Frangeul L, Msadek T, Zouine M, Couve E, Lalioui L, Poyart C, Trieu-Cuot P, Kunst F: Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol Microbiol* 2002;45:1499-1513.
- 81 Herbert MA, Beveridge CJ, Saunders NJ: Bacterial virulence factors in neonatal sepsis: group B *streptococcus*. *Curr Opin Infect Dis* 2004.229-17:225;
- 82 Ferrieri P: GBS enzymes, hemolysin, toxins and other products. *Antibiot Chemother (1971)* 1985;35:57-70.
- 83 Sotnikova LG, Sidorov NM, Kondrat'eva LT, Sherysheva ZG: Role of immunological component in the initiation of labor. *Akush Ginekol (Mosk)* 1975;23-28.
- 84 Bouvet A, Schlegel L, Loubinoux J, Freney J: *Streptococcaceae*; Précis de bactériologie clinique. 2015, vol 1692, pp 845-898.
- 85 Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Eisen JA, Peterson S, Wessels MR, Paulsen IT, Nelson KE, Margarit I, Read TD, Madoff LC, Wolf AM, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Lewis MR, Radune D, Fedorova NB, Scanlan D, Khouri H, Mulligan S, Carty HA, Cline RT, Van Aken SE, Gill J, Scarselli M, Mora M, Iacobini ET, Brettoni C, Galli G, Mariani M, Vegni F, Maione D, Rinaudo D, Rappuoli R, Telford JL, Kasper DL, Grandi G, Fraser CM: Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12391-12396.
- 86 Tamura GS, Kuypers JM, Smith S, Raff H, Rubens CE: Adherence of group B streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. *Infect Immun* 1994;62:2450-2458.
- 87 Denis F: Les bactéries, champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant; 2002, vol 484.

Références Bibliographiques

- 88 Pritzlaff CA, Chang JC, Kuo SP, Tamura GS, Rubens CE, Nizet V: Genetic basis for the beta-haemolytic/cytolytic activity of group B *Streptococcus*. Mol Microbiol 2001;39:236-247.
- 89 Liu GY, Doran KS, Lawrence T, Turkson N, Puliti M, Tissi L, Nizet V: Sword and shield: linked group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:14491-14496.
- 90 Jiang SM, Cieslewicz MJ, Kasper DL, Wessels MR: Regulation of virulence by a two-component system in group B *streptococcus*. J Bacteriol 2005;187:1105-1113.
- 91 Lamy MC, Zouine M, Fert J, Vergassola M, Couve E, Pellegrini E, Glaser P, Kunst F, Msadek T, Trieu-Cuot P, Poyart C: CovS/CovR of group B *streptococcus*: a two-component global regulatory system involved in virulence. Mol Microbiol 2004;54:1250-1268.
- 92 Castonguay A, Overby L, Nettesheim P, Clark GC, Philpot RM: Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in cultured rat tracheal epithelial cells. Environ Health Perspect 1995;103:254-258.
- 93 Burke J, Pettitt JM, Schachter H, Sarkar M, Gleeson PA: The transmembrane and flanking sequences of beta 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I specify medial-Golgi localization. J Biol Chem 1992;267:24433-24440.
- 94 Takahashi S, Nagano Y, Nagano N, Hayashi O, Taguchi F, Okuwaki Y: Role of C5a-ase in group B streptococcal resistance to opsonophagocytic killing. Infect Immun 1995;63:4764-4769.
- 95 Harris TO, Shelver DW, Bohnsack JF, Rubens CE: A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. J Clin Invest 2003;111:61-70.
- 96 Hancock RE, Diamond G: The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends Microbiol 2000;8:402-410.
- 97 Maisey HC, Doran KS, Nizet V: Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. Expert Rev Mol Med 2008;10:e27.
- 98 Jacobsson K: A novel family of fibrinogen-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*. Vet Microbiol 2003;96:103-113.
- 99 Stalhammar-Carlemalm M, Stenberg L, Lindahl G: Protein rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. J Exp Med 1993;177:1593-1603.
- 100 Manning SD, Ki M, Marrs CF, Kugeler KJ, Borchardt SM, Baker CJ, Foxman B: The frequency of genes encoding three putative group B streptococcal virulence factors among invasive and colonizing isolates. BMC Infect Dis 2006;6:116.

Références Bibliographiques

- 101 Brochet M, Couve E, Zouine M, Vallaeys T, Rusniok C, Lamy MC, Buchrieser C, Trieu-Cuot P, Kunst F, Poyart C, Glaser P: Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. *Microbes Infect* 2006;8:1227-1243.
- 102 Madoff LC, Hori S, Michel JL, Baker CJ, Kasper DL: Phenotypic diversity in the alpha C protein of group B streptococci. *Infect Immun* 1991;59:2638-2644.
- 103 Doran KS, Engelson EJ, Khosravi A, Maisey HC, Fedtke I, Equils O, Michelsen KS, Arditi M, Peschel A, Nizet V: Blood-brain barrier invasion by group B *Streptococcus* depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid. *J Clin Invest* 2005;115:2499-2507.
- 104 Lin B, Hollingshead SK, Coligan JE, Egan ML, Baker JR, Pritchard DG: Cloning and expression of the gene for group B streptococcal hyaluronate lyase. *J Biol Chem* 1994;269:30116-30113.
- 105 Musser JM, Mattingly SJ, Quentin R, Goudeau A, Selander RK: Identification of a high-virulence clone of type III *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) causing invasive neonatal disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:473.4735-1
- 106 Hellerqvist CG, Rojas J, Green RS, Sell S, Sundell H, Stahlman MT: Studies on group B beta-hemolytic *Streptococcus*. I. Isolation and partial characterization of an extracellular toxin. *Pediatr Res* 1981;15:892-898.
- 107 Yan HP, Carter CE, Wang EZ, Page DL, Washington K, Wamil BD, Yakes FM, Thurman GB, Hellerqvist CG: Functional studies on the anti-pathoangiogenic properties of CM101. *Angiogenesis* 1998;2:219-233.
- 108 Wiles KG, Panizzi P, Kroh HK, Bock PE: Skizzle is a novel plasminogen- and plasmin-binding protein from *Streptococcus agalactiae* that targets proteins of human fibrinolysis to promote plasmin generation. *J Biol Chem* 2010;285:21153-21164.
- 109 Betriu C, Gomez M, Sanchez A, Cruceyra A, Romero J, Picazo JJ: Antibiotic resistance and penicillin tolerance in clinical isolates of group B streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2183-2186.
- 110 Dahesh S, Hensler ME, van Sorge NM, Gertz RE, Jr., Schrag S, Nizet V, Beall BW: Point mutation in the group B streptococcal pbp2x gene conferring decreased susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2915-2918.
- 111 Kimura K, Suzuki S, Wachino J, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, Nagano N, Kato H, Shibayama K, Arakawa Y: First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2890-2897.
- 112 Liddy H, Holliman R: Group B *Streptococcus* highly resistant to gentamicin. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:142-143.

Références Bibliographiques

- 113 Murdoch DR, Reller LB: Antimicrobial susceptibilities of group B streptococci isolated from patients with invasive disease: 10-year perspective. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3623-3624.
- 114 Uh Y, Jang IH, Hwang GY, Yoon KJ, Song W :Emerging erythromycin resistance among group B streptococci in Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:52-54.
- 115 Domelier AS, Mee-Marquet N, Arnault L, Mereghetti L, Lanotte P, Rosenau A, Lartigue MF, Quentin R: Molecular characterization of erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* strains. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:1227-1233.
- 116 De MD, Cavallo JD, Leclercq R, Fabre R: Antibiotic susceptibility and mechanisms of erythromycin resistance in clinical isolates of *Streptococcus agalactiae*: French multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2400-2402.
- 117 Morales WJ, Dickey SS, Bornick P, Lim DV: Change in antibiotic resistance of group B *streptococcus*: impact on intrapartum management. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181.314-310:
- 118 Gyax SE, Schuyler JA, Kimmel LE, Trama JP, Mordechai E, Adelson ME: Erythromycin and clindamycin resistance in group B streptococcal clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1875-1877.
- 119 Gibbs RS, Schrag S, Schuchat A: Perinatal infections due to group B streptococci. *Obstet Gynecol* 2004;104:1062-1076.
- 120 Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Zansky SM, Gershman K, Stefonek KR, Albanese BA, Zell ER, Schuchat A, Schrag SJ: Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA* 2008;299:2056-2065.
- 121 Quentin R, Loulergue J, Mala R, Porcheron A, Grasmick C, Mee-Marquet V.D.: Streptocoque du groupe B en pathologie humaine: origine des isolats et sensibilité aux antibiotiques. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 45 2006.
- 122 Poyart C, Reglier-Poupet H, Tazi A, Billoet A, Dmytruk N, Bidet P, Bingen E, Raymond J, Trieu-Cuot P: Invasive group B streptococcal infections in infants, France. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1647-1649.
- 123 Bergstrom T, Larson H, Lincoln K, Winberg J: Studies of urinary tract infections in infancy and childhood. XII. Eighty consecutive patients with neonatal infection. *J Pediatr* 1972;80:858-866.
- 124 Uh Y, Kim HY, Jang IH, Hwang GY, Yoon KJ: Correlation of serotypes and genotypes of macrolide-resistant *Streptococcus agalactiae*. *Yonsei Med J* 2005;46:480-483.
- 125 Hill HR, Riter ME, Menge SK, Johnson DR, Matsen JM: Rapid identification of group B streptococci by counterimmunoelectrophoresis. *J Clin Microbiol* 1975;1:188-191.

Références Bibliographiques

- 126 Hakansson S, Burman LG, Henrichsen J, Holm SE: Novel coagglutination method for serotyping group B streptococci. J Clin Microbiol 1992;3:3269-0:3268
- 127 Arakere G, Flores AE, Ferrieri P, Frasc CE: Inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for serotyping of group B streptococcal isolates. J Clin Microbiol 1999;37:2564-2567.
- 128 Jelinkova J, Motlova J: Worldwide distribution of two new serotypes of group B streptococci: type IV and provisional type V. J Clin Microbiol 1985;21:361-362.
- 129 Jensen NE: Production and evaluation of antisera for serological type determination of group-B streptococci by double diffusion in agarose gel. Acta Pathol Microbiol Scand B 1979;87B:77-83.
- 130 Motlova J, Wagner M, Jelinkova J: A search for new group-B streptococcal serotypes. J Med Microbiol 1986;22:101-105.
- 131 Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL: Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. J Clin Microbiol 2007;45:2929-2936.
- 132 Slotved HC, Elliott J, Thompson T, Konradsen HB: Latex assay for serotyping of group B *Streptococcus* isolates. J Clin Microbiol 2003;41:4445-4447.
- 133 Sellin M, Olofsson C, Hakansson S, Norgren M: Genotyping of the capsule gene cluster (cps) in nontypeable group B streptococci reveals two major cps allelic variants of serotypes III and VII. J Clin Microbiol 2000;38:3420-3428.
- 134 Stringer J: The development of a phage-typing system for group-B streptococci. J Med Microbiol 1980;13:133-143.
- 135 Haug RH, Hoiby EA, Lermark G: Serotyping and bacteriophage typing of group B streptococci. NIPH Ann 1983;6:119-123.
- 136 Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS: Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl Environ Microbiol 1986;51:873-884.
- 137 Ochman H, Selander RK: Evidence for clonal population structure in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 1984;81:198-201.
- 138 Terec TM, Mirabal-Font E, Ortiz A, Wallace WM: Stool losses and acidosis in diarrheal disease of infancy. Pediatrics 1965;36:704-713.
- 139 Kong F, Gowan S, Martin D, James G, Gilbert GL: Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing. J Clin Microbiol 2002;40:216-226.
- 140 Kong F, Ma L, Gilbert GL: Simultaneous detection and serotype identification of *Streptococcus agalactiae* using multiplex PCR and reverse line blot hybridization. J Med Microbiol 2005;54:1133-1138.

Références Bibliographiques

- 141 Kong F, Lambertsen LM, Slotved HC, Ko D, Wang H, Gilbert GL: Use of phenotypic and molecular serotype identification methods to characterize previously nonserotypeable group B streptococci. *J Clin Microbiol* 2008;46:2745-2750.
- 142 Manning SD, Lacher DW, Davies HD, Foxman B, Whittam TS: DNA polymorphism and molecular subtyping of the capsular gene cluster of group B *streptococcus*. *J Clin Microbiol* 2005;43:6113-6116.
- 143 Poyart C, Tazi A, Reglier-Poupet H, Billoet A, Tavares N, Raymond J, Trieu-Cuot P: Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci. *J Clin Microbiol* 2007;45:1985-1988.
- 144 Fluegge K, Supper S, Siedler A, Berner R: Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in infants: results from a nationwide active laboratory surveillance study over 2 years in Germany. *Clin Infect Dis* 2005;40:760-763.
- 145 Mee-Marquet N, Jouannet C, Domelier AS, Arnault L, Lartigue MF, Quentin R: Genetic diversity of *Streptococcus agalactiae* strains and density of vaginal carriage. *J Med Microbiol* 2009;58:169-173.
- 146 Lachenauer CS, Kasper DL, Shimada J, Ichiman Y, Ohtsuka H, Kaku M, Paoletti LC, Ferrieri P, Madoff LC: Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. *J Infect Dis* 1999;179:1030-1033.
- 147 Blumberg HM, Stephens DS, Modansky M, Erwin M, Elliot J, Facklam RR, Schuchat A, Baughman W, Farley MM: Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. *J Infect Dis* 1996;173:365-373.
- 148 Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG: Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3140-3145.
- 149 Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG: eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 2004;186:1518-1530.
- 150 Bohnsack JF, Whiting A, Gottschalk M, Dunn DM, Weiss R, Azimi PH, Philips JB, III, Weisman LE, Rhoads GG, Lin FY: Population structure of invasive and colonizing strains of *Streptococcus agalactiae* from neonates of six U.S. Academic Centers from 1995 to 1999. *J Clin Microbiol* 2008;46:1285-1291.
- 151 Lin FY, Whiting A, Adderson E, Takahashi S, Dunn DM, Weiss R, Azimi PH, Philips JB, III, Weisman LE, Regan J, Clark P, Rhoads GG, Frasch CE, Troendle J, Moyer P, Bohnsack JF: Phylogenetic lineages of invasive and colonizing strains of serotype III group B Streptococci from neonates: a multicenter prospective study. *J Clin Microbiol* 2006;44:1257-1261.
- 152 Manning SD, Lewis MA, Springman AC, Lehotzky E, Whittam TS, Davies HD: Genotypic diversity and serotype distribution of group B *streptococcus* isolated from women before and after delivery. *Clin Infect Dis* 2008;46:1829-1837.

Références Bibliographiques

- 153 Manning SD, Springman AC, Lehotzky E, Lewis MA, Whittam TS, Davies HD: Multilocus sequence types associated with neonatal group B streptococcal sepsis and meningitis in Canada. *J Clin Microbiol* 2009;47:1143-1148.
- 154 Jones N, Oliver KA, Barry J, Harding RM, Bisharat N, Spratt BG, Peto T, Crook DW: Enhanced invasiveness of bovine-derived neonatal sequence type 17 group B *streptococcus* is independent of capsular serotype. *Clin Infect Dis* 2006;42:915-924.
- 155 Lamy MC, Dramsi S, Billoet A, Reglier-Poupet H, Tazi A, Raymond J, Guerin F, Couve E, Kunst F, Glaser P, Trieu-Cuot P, Poyart C: Rapid detection of the "highly virulent" group B *Streptococcus* ST-17 clone. *Microbes Infect* 2006;8:1714-1722.
- 156 Mee-Marquet N, Fourny L, Arnault L, Domelier AS, Salloum M, Lartigue MF, Quentin R: Molecular characterization of human-colonizing *Streptococcus agalactiae* strains isolated from throat, skin, anal margin, and genital body sites. *J Clin Microbiol* 2008;46:2906-2911.
- 157 Luan SL, Granlund M, Sellin M, Lagergard T, Spratt BG, Norgren M: Multilocus sequence typing of Swedish invasive group B *streptococcus* isolates indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching. *J Clin Microbiol* 2005;43:3727-3733.
- 158 Len C, Goldenberg J, Ferraz MB, Hilario MO, Oliveira LM, Sacchetti S: Crosscultural reliability of the Childhood Health Assessment Questionnaire. *J Rheumatol* 1994;21:2349-2352.
- 159 Brochet M, Couve E, Bercion R, Sire JM, Glaser P: Population structure of human isolates of *Streptococcus agalactiae* from Dakar and Bangui. *J Clin Microbiol* 2009;47:800-803.
- 160 Bergseng H, Afset JE, Radtke A, Loeseth K, Lyng RV, Rygg M, Bergh K: Molecular and phenotypic characterization of invasive group B *streptococcus* strains from infants in Norway 2006-2007. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:1182-1185.
- 161 Bisharat N, Crook DW, Leigh J, Harding RM, Ward PN, Coffey TJ, Maiden MC, Peto T, Jones N: Hyperinvasive neonatal group B *streptococcus* has arisen from a bovine ancestor. *J Clin Microbiol* 2004;42:2161-2167.
- 162 Bisharat N, Jones N, Marchaim D, Block C, Harding RM, Yagupsky P, Peto T, Crook DW: Population structure of group B *streptococcus* from a low-incidence region for invasive neonatal disease. *Microbiology* 2005;15:1881-1:1875
- 163 Davies HD, Jones N, Whittam TS, Elsayed S, Bisharat N, Baker CJ: Multilocus sequence typing of serotype III group B *streptococcus* and correlation with pathogenic potential. *J Infect Dis* 2004;189:1097-1102.
- 164 Hery-Arnaud G, Bruant G, Lanotte P, Brun S, Rosenau A, Mee-Marquet N, Quentin R, Mereghetti L: Acquisition of insertion sequences and the GBSi1 intron by *Streptococcus agalactiae* isolates correlates with the evolution of the species. *J Bacteriol* 2005;187:6248-6252.

Références Bibliographiques

- 165 Salloum M, Mee-Marquet N, Domelier AS, Arnault L, Quentin R: Molecular characterization and prophage DNA contents of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from adult skin and osteoarticular infections. *J Clin Microbiol* 2010;48:1261-1269.
- 166 Martins ER, Pessanha MA, Ramirez M, Melo-Cristino J: Analysis of group B streptococcal isolates from infants and pregnant women in Portugal revealing two lineages with enhanced invasiveness. *J Clin Microbiol* 2007;45:3224-3229.
- 167 Nagano Y, Nagano N, Takahashi S, Murono K, Fujita K, Taguchi F, Okuwaki Y: Restriction endonuclease digest patterns of chromosomal DNA from group B beta-haemolytic streptococci. *J Med Microbiol* 1991;35:297-303.
- 168 Takahashi S, Adderson EE, Nagano Y, Nagano N, Briesacher MR, Bohnsack JF: Identification of a highly encapsulated, genetically related group of invasive type III group B streptococci. *J Infect Dis* 1998;177:1116-1119.
- 169 Welsh J, McClelland M: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:7213-7218.
- 170 Chatellier S, Ramanantsoa C, Harriau P, Rolland K, Rosenau A, Quentin R: Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1997;35:2573-2579.
- 171 Quentin R, Huet H, Wang FS, Geslin P, Goudeau A, Selander RK: Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by multilocus enzyme genotype and serotype: identification of multiple virulent clone families that cause invasive neonatal disease. *J Clin Microbiol* 1995;33:2576-2581.
- 172 Schwartz DC, Cantor CR: Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984;37:67-75.
- 173 Elliott JA, Farmer KD, Facklam RR: Sudden increase in isolation of group B streptococci, serotype V, is not due to emergence of a new pulsed-field gel electrophoresis type. *J Clin Microbiol* 1998;36:2115-2116.
- 174 Bidet P, Brahimi N, Chalas C, Aujard Y, Bingen E: Molecular characterization of serotype III group B-streptococcus isolates causing neonatal meningitis. *J Infect Dis* 2003;188:1132-1137.
- 175 Oliveira IC, de Mattos MC, Pinto TA, Ferreira-Carvalho BT, Benchetrit LC, Whiting AA, Bohnsack JF, Figueiredo AM: Genetic relatedness between group B streptococci originating from bovine mastitis and a human group B *Streptococcus* type V cluster displaying an identical pulsed-field gel electrophoresis pattern. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:887-893.
- 176 Thong KL, Ling GY, Kong LW, Theam LC, Ngeow YF: Macrorestriction analysis of *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) isolates from Malaysia. *J Med Microbiol* 2004;53:991-997.

Références Bibliographiques

- 177 Moussaoui L: Applications de la spectrométrie de masse type MALDI-TOF a la bacteriologie et a la distinction de variants genetiques. HAL 2012;Sciences agricoles. Université de Strasbourg. France:NNT : 2012STRAJ124.
- 178 Zhou C, Tao L, Hu B, Ma J, Ye X, Huang S, Ma Y, Shan Y: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of beta-hemolytic streptococci. *J Thorac Dis* 2015;7:591-595.
- 179 Barnini S, Ghelardi E, Brucculeri V, Morici P, Lupetti A: Rapid and reliable identification of Gram-negative bacteria and Gram-positive cocci by deposition of bacteria harvested from blood cultures onto the MALDI-TOF plate. *BMC Microbiol* 2015;15:124.
- 180 Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, Fenselau C: Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal Chem* 1999;71:2732-2738.
- 181 Ashcroft AE: An Introduction to Mass Spectrometry. Mass Spectrometry Facility Manager. Astbury Centre for Structural Molecular Biology, Astbury Building, The University of Leeds 2015.
- 182 Sellier N, Morin N: Qu'est-ce que la spectrométrie de masse ?. *Culture Sciences Chimie* 2002; Accès: <http://culturesciences.chimie.ens.fr/content/quest-ce-que-la-spectrometrie-de-masse-751>.
- 183 Arnold RJ, Reilly JP: Fingerprint matching of E. coli strains with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of whole cells using a modified correlation approach. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998;12:630-636.
- 184 Fenselau C, Demirev PA: Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2001;20:157-171.
- 185 Courcol R :Quelles utilisations de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie médicale ? *Revue Francophone des Laboratoires*; Nov 2009 2009;2009.
- 186 Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, Chakraborty T, Hain T: Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:5402-5407.
- 187 Bright JJ, Claydon MA, Soufian M, Gordon DB: Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *J Microbiol Methods* 2002;48:127-138.
- 188 Ecker JA, Massire C, Hall TA, Ranken R, Pennella TT, Agasino IC, Blyn LB, Hofstadler SA, Endy TP, Scott PT, Lindler L, Hamilton T, Gaddy C, Snow K, Pe M, Fishbain J, Craft D, Deye G, Riddell S, Milstrey E, Petruccelli B, Brisse S, Harpin V, Schink A, Ecker DJ, Sampath R, Eshoo MW: Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2006;44:2921-2932.

Références Bibliographiques

- 189 Sturenburg E, Storm N, Sobottka I, Horstkotte MA, Scherpe S, Aepfelbacher M, Muller S: Detection and genotyping of SHV beta-lactamase variants by mass spectrometry after base-specific cleavage of in vitro-generated RNA transcripts. *J Clin Microbiol* 2006;44:909-915.
- 190 Madalinski G, Godat E, Alves S, Lesage D, Genin E, Levi P, Labarre J, Tabet JC, Ezan E, Junot C: Direct introduction of biological samples into a LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer as a tool for fast metabolome analysis. *Anal Chem* 2008;80:3291-3303.
- 191 Basile F, Beverly MB, Voorhees KJ: Pathogenic bacteria: their detection and differentiation by rapid lipid profiling and pyrolysis mass spectrometry. *Trends Anal Chem* 1998;17.
- 192 Foster AG: Rapid Identification of microbes in positive blood cultures by use of the vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. *J Clin Microbiol* 2013;51:3719-3717.
- 193 Stevenson LG, Drake SK, Murray PR: Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48:444-447.
- 194 Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-Hernandez A, Gonzalez-Buitrago JM, Munoz-Bellido JL: Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48:2110-2115.
- 195 Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Porrás-Guerra I, Garcia-Garcia MI, Garcia-Sanchez JE, Gonzalez-Buitrago JM, Munoz-Bellido JL: Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:546-551.
- 196 Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, Prevost G: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:1631-1638.
- 197 Hart PJ, Wey E, McHugh TD, Balakrishnan I, Belgacem O: A method for the detection of antibiotic resistance markers in clinical strains of *Escherichia coli* using MALDI mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 2015;111:1-8.
- 198 Hrabak J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T: Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011;49:3222-3227.
- 199 Papagiannitsis CC, Studentova V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, Hrabak J: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol* 2015;53:1731-1735.

Références Bibliographiques

- 200 Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, Raoult D, Rolain JM: MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:467-470.
- 201 Belmekki M, Mammeri H, Hamdad F, Rousseau F, Canarelli B, Biendo M: Comparison of Xpert MRSA/SA Nasal and MRSA/SA ELITE MGB assays for detection of the *mecA* gene with susceptibility testing methods for determination of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 2013;51:3183-3191.
- 202 Josten M, Dischinger J, Szekat C, Reif M, Al-Sabti N, Sahl HG, Parcina M, Bekeredjian-Ding I, Bierbaum G: Identification of *agr*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring the class A *mec* complex by MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Med Microbiol* 2014;304:1018-1023.
- 203 Romero-Gomez MP, Munoz-Velez M, Gomez-Gil R, Mingorance J: Evaluation of combined use of MALDI-TOF and Xpert((R)) MRSA/SA BC assay for the direct detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles. *J Infect* 2013;67:91-92.
- 204 Ohlsson A, Shah VS: Intrapartum antibiotics for known maternal Group B streptococcal colonization. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;6:CD007467.
- 205 Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R, Kliucinskas M, Maleckiene L, Nadisauskiene R: Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008;87:260-271.
- 206 Hansen SM, Uldbjerg N, Kilian M, Sorensen UB: Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *J Clin Microbiol* 2004;42:83-89.
- 207 Dillon HC, Jr., Gray E, Pass MA, Gray BM: Anorectal and vaginal carriage of group B streptococci during pregnancy. *J Infect Dis* 1982;145:794-799.
- 208 Verani JR, McGee L, Schrag SJ: Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010;59:1-36.
- 209 McKenna DS, Matson S, Northern I: Maternal group B streptococcal (GBS) genital tract colonization at term in women who have asymptomatic GBS bacteriuria. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2003;11:203-207.
- 210 Ferrieri P, Cleary PP, Seeds AE: Epidemiology of group-B streptococcal carriage in pregnant women and newborn infants. *J Med Microbiol* 1977;10:103-114.
- 211 Hoogkamp-Korstanje JA, Gerards LJ, Cats BP: Maternal carriage and neonatal acquisition of group B streptococci. *J Infect Dis* 1982;145:800-803.
- 212 Spellerberg B: Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes Infect* 2000;2:1733-1742.
- 213 Verani JR, Schrag SJ: Group B streptococcal disease in infants: progress in prevention and continued challenges. *Clin Perinatol* 2010;37:375-392.

Références Bibliographiques

- 214 Bingen E, Denamur E, Lambert-Zechovsky N, Aujard Y, Brahimi N, Geslin P, Elion J: Analysis of DNA restriction fragment length polymorphism extends the evidence for breast milk transmission in *Streptococcus agalactiae* late-onset neonatal infection. J Infect Dis 1992;165:569-573.
- 215 Gajdos V, Domelier AS, Castel C, Guibert M, Perreaux F, Mollet A, Lebrun L, Quentin R, Labrune P: Late-onset and recurrent neonatal *Streptococcus agalactiae* infection with ingestion of infected mother's milk. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2008;136:265-267.
- 216 Christensen KK, Dahlander K, Esktrom A, Svenningsen N, Christensen P: Colonization of newborns with group B streptococci: relation to maternal urogenital carriage. Scand J Infect Dis 1981;13:23-27.
- 217 Paredes A, Wong P, Mason EO, Jr., Taber LH, Barrett FF: Nosocomial transmission of group B Streptococci in a newborn nursery. Pediatrics 1977;59:679-682.
- 218 Grenier B, Gold F: Développement et maladies de l'enfant; 2015.
- 219 Quentin R: Prise en charge des infections à *Streptococcus agalactiae* en obstétrique. Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction. Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction 2002;65-73.
- 220 Madzivhandila M, Adrian PV, Cutland CL, Kuwanda L, Schrag SJ, Madhi SA: Serotype distribution and invasive potential of group B *streptococcus* isolates causing disease in infants and colonizing maternal-newborn dyads. PLoS One 2011;6:e17861.
- 221 Fry RM: Fatal infections by hemolytic *streptococcus* group B. Lancet 1938;199-201.
- 222 Anthony BF, Okada DM: The emergence of group B streptococci in infections of the newborn infant. Annu Rev Med 1977;28:355-369.
- 223 Garland SM: Early onset neonatal group B *streptococcus* (GBS) infection: associated obstetric risk factors. Aust N Z J Obstet Gynaecol 1991;31:117-118.
- 224 Yagupsky P, Menegus MA, Powell KR: The changing spectrum of group B streptococcal disease in infants: an eleven-year experience in a tertiary care hospital. Pediatr Infect Dis J 1991;10:801-808.
- 225 McKenna DS, Iams JD: Group B streptococcal infections. Semin Perinatol 1998;22:267-276.
- 226 Blond MH, Lenclen R, Poulain P, Guillaume S: What are the risks associated with vaginal carriage and lower genital infections for the mother, the fetus and the newborn?. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 1997;26:13-28.
- 227 Dillon HC, Jr., Khare S, Gray BM: Group B streptococcal carriage and disease: a 6-year prospective study. J Pediatr 1987;110:31-36.
- 228 Greatrex B: A review of beta-haemolytic streptococcal infection in babies. Br J Nurs 1997;6:486, 488, 490-486, 488, 493.

Références Bibliographiques

- 229 Rajagopal L: Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiol* 2009;4:201-221.
- 230 Baker CJ: Group B streptococcal infections. *Clin Perinatol* 1997;24:59-70.
- 231 Barbero S, Ponte PL: Infectious diseases in the fetus and newborn infant. *Arch Sci Med (Torino)* 1977;134:413-435.
- 232 Melin P, Schmitz M, De MP, Foidart JM, Rigo J: Group B *streptococcus*, primary cause of life-threatening infections in infants. Epidemiology and prevention strategy. *Rev Med Liege* 1999;54:460-467.
- 233 Binnouna S :Thèse de Doctorat en Médecine. Prévalence du portage génital du streptocoque b chez la femme enceinte au chu hassan ii de fès: etude prospective. Université Sidi Mohammed Ben Abdella Faculte De Medecine et De Pharmacie 2010.
- 234 Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, Schrag SJ, Zaidi AK, Cousens S, Heath PT: Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2012;379:547-556.
- 235 Yancey MK, Schuchat A, Brown LK, Ventura VL, Markenson GR: The accuracy of late antenatal screening cultures in predicting genital group B streptococcal colonization at delivery. *Obstet Gynecol* 1996;88:811-815.
- 236 Schrag SJ, Zell ER, Lynfield R, Roome A, Arnold KE, Craig AS, Harrison LH, Reingold A, Stefonek K, Smith G, Gamble M, Schuchat A: A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. *N Engl J Med* 2002;347:233-239.
- 237 Brimil N, Barthell E, Heindrichs U, Kuhn M, Lutticken R, Spellerberg B: Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany. *Int J Med Microbiol* 2006;296:39-44.
- 238 Jones N, Oliver K, Jones Y, Haines A, Crook D: Carriage of group B *streptococcus* in pregnant women from Oxford, UK. *J Clin Pathol* 2006;59:366-363.
- 239 Kieran E, Matheson M, Mann AG, Efstratiou AA, Butler K, Gorman W: Group B *streptococcus* (GBS) colonisation among expectant Irish mothers. *Ir Med J* 1998;91:21-22.
- 240 Motlova J, Strakova L, Urbaskova P, Sak P, Sever T: Vaginal & rectal carriage of *Streptococcus agalactiae* in the Czech Republic: incidence, serotypes distribution & susceptibility to antibiotics. *Indian J Med Res* 2004;119 Suppl:84-87.
- 241 Savoia D, Gottimer C, Crocilla' C, Zucca M: *Streptococcus agalactiae* in pregnant women: phenotypic and genotypic characters. *J Infect* 2008;56:120-125.
- 242 Crifo C, Strom R: Method of determination of octopamine in rat tissues. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1974;50:684-689.

Références Bibliographiques

- 243 Campbell JR, Hillier SL, Krohn MA, Ferrieri P, Zaleznik DF, Baker CJ: Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. *Obstet Gynecol* 2000;96:498-503.
- 244 Shet A, Ferrieri P: Neonatal & maternal group B streptococcal infections: a comprehensive review. *Indian J Med Res* 2004;120:141-150.
- 245 Schuchat A: Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:497-513.
- 246 Dupont C, Touzet S, Cao D, Prunaret JV, Audra P, Putet G, Dupuis O, Rudigos RC: Application d'un protocole de prévention de l'infection materno-foetale à streptocoque à hémolytique au sein du réseau périnatal Aurore. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2005;34:589-599.
- 247 Vinyts'kyi OI: Hystero-graphic studies of uterine contractile activity during partusysten treatment of threatened late abortion and premature labor. *Pediatr Akus Ginekol* 1979;40-41.
- 248 Matorras R, Garcia-Perea A, Omenaca F, Diez-Enciso M, Madero R, Usandizaga JA: Intrapartum chemoprophylaxis of early-onset group B streptococcal disease. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991;40:57-62.
- 249 ACOG committee opinion: No. 485: Prevention of early-onset group B streptococcal disease in newborns. *Obstet Gynecol* 2011;117:1019-1027.
- 250 Berg S, Trollfors B, Lagergard T, Zackrisson G, Claesson BA: Serotypes and clinical manifestations of group B streptococcal infections in western Sweden. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:9-13.
- 251 Gilbert GL: Vaccines for other neonatal infections: are group B streptococcal infections vaccine-preventable? *Expert Rev Vaccines* 2004;3:371-374.
- 252 Pettersson K: Perinatal infection with Group B streptococci. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007;12:193-197.
- 253 Sinha A, Lieu TA, Paoletti LC, Weinstein MC, Platt R: The projected health benefits of maternal group B streptococcal vaccination in the era of chemoprophylaxis. *Vaccine* 2005;23:3187-3195.
- 254 Orrett FA: Colonization with Group B streptococci in pregnancy and outcome of infected neonates in Trinidad. *Pediatr Int* 2003;45:319-323.
- 255 Ferjani A, Ben AH, Ben SN, Gozzi C, Boukadida J: Vaginal colonization of the *Streptococcus agalactiae* in pregnant woman in Tunisia: risk factors and susceptibility of isolates to antibiotics. *Bull Soc Pathol Exot* 2006; 99:99-102.
- 256 Blond MH, Poulain P, Gold F, Bingen E, Watier H, Quentin R: Infection bactérienne maternofoetale. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale Gynecologie obstétrique* 2004;5-040-C-10.

Références Bibliographiques

- 257 Borderon E, Desroches A, Tescher M, Bondeux D, Chillou C, Borderon JC: Value of examination of the gastric aspirate for the diagnosis of neonatal infection. *Biol Neonate* 1994;65:353-366.
- 258 Quentin R: Flore bactérienne génitale chez la femme enceinte. *Gynécol Obstét Biol Reprod* 21997;26:9-12.
- 259 Quentin R, Van der Mee N, Mereghetti L: Infections materno-foetales : les prélèvements bactériologiques. In: Progrès en néonatalogie n 23 . XXXIIIes Journées nationales de néonatalogie, Paris 2003;301-334.
- 260 Borderon E, Desroches A, Tescher M ,Bondeux D, Chillou C, Borderon JC: Value of examination of the gastric aspirate for the diagnosis of neonatal infection. *Biol Neonate* 1994;65:353-366.
- 261 Anaes.Agence Nationale d'Accreditation et d'Evaluation en Sante: Recommandations pour la pratique clinique. Prévention anténatale du risque infectieux bactérien néonatal précoce. ANAES / Service des recommandations et références professionnelles 2001;P.136.
- 262 Jahic M, Mulavdic M, Nurkic J, Jahic E, Nurkic M: Clinical characteristics of aerobic vaginitis and its association to vaginal candidiasis, trichomonas vaginitis and bacterial vaginosis. *Med Arch* 2013;67:428-430.
- 263 van SJ, Yudin MH, Yudin MH, Allen V, Bouchard C, Boucher M, Boucoiran I, Caddy S, Castillo E, Kennedy VL, Money DM ,Murphy K, Ogilvie G, Paquet C, van Schalkwy JK: Vulvovaginitis: screening for and management of trichomoniasis, vulvovaginal candidiasis, and bacterial vaginosis. *J Obstet Gynaecol Can* 2015;37:266-276.
- 264 Aguin TJ, Sobel JD: Vulvovaginal candidiasis in pregnancy. *Curr Infect Dis Rep* 2015;17:462.
- 265 Hedayati MT, Taheri Z, Galinimoghadam T, Aghili SR, Yazdani CJ, Mosayebi E: Isolation of different species of *Candida* in patients with vulvovaginal candidiasis from sari, iran. *Jundishapur J Microbiol* 2015;8:e15992.
- 266 Yue XA, Chen P, Tang Y, Wu X, Hu Z: The dynamic changes of vaginal microecosystem in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis: a retrospective study of 800 patients. *Arch Gynecol Obstet* 2015.
- 267 Redelinguys MJ, Ehlers MM, Dreyer AW, Kock MM: Normal flora and bacterial vaginosis in pregnancy: an overview. *Crit Rev Microbiol* 2015;1-12.
- 268 Baruah FK, Sharma A, Das C, Hazarika NK, Hussain JH: Role of *Gardnerella vaginalis* as an etiological agent of bacterial vaginosis. *Iran J Microbiol* 2014;6:409-414.
- 269 Li XD, Tong F, Zhang XJ, Pan WJ, Chen ML, Wang CC, Li X, Gao GP, Sun L, Sun YH: Incidence and risk factors of bacterial vaginosis among pregnant women: A prospective study in Maanshan city, Anhui Province ,China. *J Obstet Gynaecol Res* 2015.

Références Bibliographiques

- 270 Edwards T, Burke P, Smalley H, Hobbs G: *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. *Crit Rev Microbiol* 2014;1-12.
- 271 Hezarjaribi HZ, Fakhari M, Shokri A, Teshnizi SH, Sadough A, Taghavi M: *Trichomonas vaginalis* infection among Iranian general population of women: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol Res* 2015;114:1291-1300.
- 272 Miranda AE, Pinto VM, Gaydos CA: *Trichomonas vaginalis* infection among young pregnant women in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2014;18:669-671.
- 273 Guise JM, Mahon SM, Aickin M, Helfand M, Peipert JF, Westhoff C: Screening for bacterial vaginosis in pregnancy. *Am J Prev Med* 2001;20:62-72.
- 274 Carey JC, Klebanoff MA, Hauth JC, Hillier SL, Thom EA, Ernest JM, Heine RP, Nugent RP, Fischer ML, Leveno KJ, Wapner R, Varner M: Metronidazole to prevent preterm delivery in pregnant women with asymptomatic bacterial vaginosis. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *N Engl J Med* 2000;342:534-540.
- 275 Bliss SJ, Manning SD, Tallman P, Baker CJ, Pearlman MD, Marris CF, Foxman B: Group B *Streptococcus* colonization in male and nonpregnant female university students: a cross-sectional prevalence study. *Clin Infect Dis* 2002;34:184-190.
- 276 Easmon CS, Tanna A, Munday P, Dawson S: Group B streptococci--gastrointestinal organisms? *J Clin Pathol* 1981;34:921-923.
- 277 Edwards MS, Baker CJ: Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* 2005;41:839-847.
- 278 Manning SD, Neighbors K, Tallman PA, Gillespie B, Marris CF, Borchardt SM, Baker CJ, Pearlman MD, Foxman B: Prevalence of group B *streptococcus* colonization and potential for transmission by casual contact in healthy young men and women. *Clin Infect Dis* 2004;39:380-388.
- 279 Manning SD, Tallman P, Baker CJ, Gillespie B, Marris CF, Foxman B: Determinants of co-colonization with group B *streptococcus* among heterosexual college couples. *Epidemiology* 2002;13:539-33.
- 280 Meyn LA, Moore DM, Hillier SL, Krohn MA: Association of sexual activity with colonization and vaginal acquisition of group B *Streptococcus* in nonpregnant women. *Am J Epidemiol* 2002;155:949-957.
- 281 Sendi P, Johansson L, Norrby-Teglund A: Invasive group B Streptococcal disease in non-pregnant adults : a review with emphasis on skin and soft-tissue infections. *Infection* 2008;36:100-111.
- 282 Meyn LA, Moore DM, Hillier SL, Krohn MA: Association of sexual activity with colonization and vaginal acquisition of group B *Streptococcus* in nonpregnant women. *Am J Epidemiol* 2002;155:949-957.
- 283 Farley MM: Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin Infect Dis* 2001;33:556-561.

Références Bibliographiques

- 284 Ekelund K, Skinhoj P, Madsen J, Konradsen HB: Invasive group A, B, C and G streptococcal infections in Denmark 1999-2002: epidemiological and clinical aspects. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:569-576.
- 285 Matsubara K, Yamamoto G: Invasive group B streptococcal infections in a tertiary care hospital between 1998 and 2007 in Japan. *Int J Infect Dis* 2009;13:679-684.
- 286 Lambertsen L, Ekelund K, Skovsted IC, Liboriussen A, Slotved HC: Characterisation of invasive group B streptococci from adults in Denmark 1999 to 2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:1071-1077.
- 287 Tyrrell GJ, Senzilet LD, Spika JS, Kertesz DA, Alagaratnam M, Lovgren M, Talbot JA: Invasive disease due to group B streptococcal infection in adults: results from a Canadian, population-based, active laboratory surveillance study--1996. Sentinel Health Unit Surveillance System Site Coordinators. *J Infect Dis* 2000;182:168-173.
- 288 Tazi A, Morand PC, Reglier-Poupet H, Dmytruk N, Billoet A, Antona D, Trieu-Cuot P, Poyart C: Invasive group B streptococcal infections in adults, France (2007-2010). *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1587-1589.
- 289 Bolanos M, Canas A, Santana OE, Perez-Arellano JL, de M, I, Martin-Sanchez AM: Invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:837-839.
- 290 Blancas D, Santin M, Olmo M, Alcaide F, Carratala J, Gudiol F: Group B streptococcal disease in nonpregnant adults: incidence, clinical characteristics, and outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:168-173.
- 291 Lefebvre N, Forestier E, Mohseni-Zadeh M, Remy V, Lesens O, Kuhnert C, Poindron V, Riegel P, Piemont Y, Christmann D, Hansmann Y: Invasive *Streptococcus agalactiae* infections in non-pregnant adults. *Med Mal Infect* 2007;37:796-801.
- 292 Quentin R: Streptocoque du groupe B en pathologie humaine: origine des isolats et sensibilité aux antibiotiques. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 2006;45:352-354.
- 293 Harrison LH, Elliott JA, Dwyer DM, Libonati JP, Ferrieri P, Billmann L, Schuchat A: Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. Maryland Emerging Infections Program. *J Infect Dis* 1998;177:998-1002.
- 294 Karunakaran R, Raja NS, Hafeez A, Puthuchear SD: Group B *Streptococcus* infection: epidemiology, serotypes, and antimicrobial susceptibility of selected isolates in the population beyond infancy (excluding females with genital tract- and pregnancy-related isolates) at the University Malaya Medical Centre, Kuala Lumpur. *Jpn J Infect Dis* 2009;62:192-194.
- 295 Sunkara B, Bheemreddy S, Lorber B, Lephart PR, Hayakawa K, Sobel JD, Kaye KS, Marchaim D: Group B *Streptococcus* infections in non-pregnant adults: the role of immunosuppression. *Int J Infect Dis* 2012;16:e182-e186.

Références Bibliographiques

- 296 Harrison LH, Ali A, Dwyer DM, Libonati JP, Reeves MW, Elliott JA, Billmann L, Lashkerwala T, Johnson JA: Relapsing invasive group B streptococcal infection in adults. *Ann Intern Med* 1995;123:421-427.
- 297 Del GP, Mee-Marquet N, David-Rubin F, Le DF, Benchia K, Counillon E, Domelier AS, Quentin R: Severe relapsing erysipelas associated with chronic *Streptococcus agalactiae* vaginal colonization. *Clin Infect Dis* 2006;43:e67-e70.
- 298 Blancas D, Santin M, Olmo M, Alcaide F, Carratala J, Gudiol F: Group B streptococcal disease in nonpregnant adults: incidence, clinical characteristics, and outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:168-173.
- 299 Farley MM: Group B streptococcal infection in older patients. Spectrum of disease and management strategies. *Drugs Aging* 1995;6:293-300.
- 300 Ho CM, Chi CY, Ho MW, Chen CM, Liao WC, Liu YM, Lin PC, Wang JH: Clinical characteristics of group B *streptococcus* bacteremia in non-pregnant adults. *J Microbiol Immunol Infect* 2006;39:396-401.
- 301 Jackson LA, Hilsdon R, Farley MM, Harrison LH, Reingold AL, Plikaytis BD, Wenger JD, Schuchat A: Risk factors for group B streptococcal disease in adults. *Ann Intern Med* 1995;123:415-420.
- 302 Kim BN, Bae IG, Kim MN, Woo JH, Ryu J, Kim YS: Group B streptococcal bacteremia in nonpregnant adults with hepatic disease in Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:639-642.
- 303 Lee NY, Yan JJ, Wu JJ, Lee HC, Liu KH, Ko WC: Group B streptococcal soft tissue infections in non-pregnant adults. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:577-579.
- 304 Perovic O, Crewe-Brown HH, Khoosal M, Karstaedt AS: Invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:362-364.
- 305 Verghese A, Mireault K, Arbeit RD: Group B streptococcal bacteremia in men. *Rev Infect Dis* 1986;8:912-917.
- 306 Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL: Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991;29:297-301.
- 307 Abbara A: Vaginose bactérienne. Evaluation du score de Nugent de la flore vaginale. Accès: http://www.aly-abbara.com/livre_gyn_obs/termes/hygiene/flore_vaginale/score_nugent.html 2011.
- 308 Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La SB, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D: Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009;49:543-551.

Références Bibliographiques

- 309 JEHL F: COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE. Recommandations 2014. S F M Société Française de Microbiologie 2014.
- 310 Malhotra-Kumar S, Lammens C, Piessens J, Goossens H: Multiplex PCR for simultaneous detection of macrolide and tetracycline resistance determinants in streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4798-4800.
- 311 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 1992;24:104-108.
- 312 Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, Rolain JM: ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:212-220.
- 313 Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389-3402.
- 314 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;24:1596-1599.
- 315 Duclaux E: *Traité de microbiologie clinique*. ed 1, Masson, 1898.
- 316 Eyquem A., Alouf J., Montagnier L.: *Traité de microbiologie clinique*. Piccin, 2005.
- 317 Schuchat A, Deaver-Robinson K, Plikaytis BD, Zangwill KM, Mohle-Boetani J, Wenger JD: Multistate case-control study of maternal risk factors for neonatal group B streptococcal disease. The Active Surveillance Study Group. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:623-629.
- 318 Gotoff SP, Boyer KM: Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease. *Pediatrics* 1997;99:866-869.
- 319 Revised guidelines for prevention of early-onset group B streptococcal (GBS) infection. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn: *Pediatrics* 1997;99:489-496.
- 320 Anaes. Agence Nationale d'Accreditation et d'Evaluation en Sante: Diagnosis and treatment of early bacterial infection in newborns. *Arch Pediatr* 2003;10:489-496.
- 321 Anthony BF, Eisenstadt R, Carter J, Kim KS, Hobel CJ: Genital and intestinal carriage of group B streptococci during pregnancy. *J Infect Dis* 1981;143:761-766.
- 322 HAS. Haute Autorité de Santé: Prévention anténatale du risque infectieux bactérien néonatal précoce. http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_272118/prevention-antenatale-durisque-2001.
- 323 Colbourn T, Gilbert R: An overview of the natural history of early onset group B streptococcal disease in the UK. *Early Hum Dev* 2007;83:149-156.

Références Bibliographiques

- 324 Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A: Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm Rep* 2002;51:1-22.
- 325 Loulergue J, Couche C., Gramick C.Laudat P., Quentin R.: Sensibilité aux Antibiotiques des Souches de streptocoque du groupe B de portage vaginal isolées en France. RÉPUBLIQUE FRANÇAISE ministère de la Santé et de la Protection sociale Institut de veille sanitaire BEH 2004;69-70.
- 326 Onipede A., Adefusi O., Adeyemi A., Adejuyigbe E., Oyelese A., Ogunniyi T.: Group B *Streptococcus* Carriage during Late Pregnancy in Ile-Ife, Nigeria. *AFRICAN JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL MICROBIOLOGY* 2012;13:135-143.
- 327 Bevilacqua G: Prevention of perinatal infection caused by group B beta-hemolytic *streptococcus*. *Acta Biomed Ateneo Parmense* 1999;70:87-94.
- 328 Horvath B, Grasselly M, Lakatos F, Kneffel P: Intrapartum administration of antibiotics in the prevention of neonatal *Streptococcus* B infections. *Orv Hetil* 1998;139:2899-2901.
- 329 Claeys G, Verschraegen G, Temmerman M: Modified Granada Agar Medium for the detection of group B *Streptococcus* carriage in pregnant women. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:22-24.
- 330 Gil EG, Rodriguez MC, Bartolome R, Berjano B, Cabero L, Andreu A: Evaluation of the Granada agar plate for detection of vaginal and rectal group B streptococci in pregnant women. *J Clin Microbiol* 1999;37:2648-2651.
- 331 Jaureguy F, Carton M, Teboul J, Butel MJ, Panel P, Ghnassia JC, Doucet-Populaire F: Risk factors and screening strategy for group B streptococcal colonization in pregnant women: results of a prospective study. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2003;32:132-138.
- 332 Philipson EH, Palermino DA, Robinson A: Enhanced antenatal detection of group B *streptococcus* colonization. *Obstet Gynecol* 1995;85:437-439.
- 333 Dzewela T, Komolafe OO, Igbigbi A: Prevalence of group b *Streptococcus* colonization in antenatal women at the Queen Elizabeth Central Hospital, BlantyreG_ôa preliminary study. *Malawi Medical Journal* 2006;17:97-99.
- 334 Mohammed M, Asrat D, Woldeamanuel Y, Demissie A: Prevalence of group B *Streptococcus* colonization among pregnant women attending antenatal clinic of Hawassa Health Center, Hawassa, Ethiopia. *Ethiopian Journal of Health Development* 2012;26:36-42.
- 335 Hickman ME, Rench MA, Ferrieri P, Baker CJ: Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatrics* 1999;104:203-209.
- 336 Glantz JC, Kedley KE: Concepts and controversies in the management of group B *streptococcus* during pregnancy. *Birth* 1998;25:45-53.

Références Bibliographiques

- 337 Piper JM, Georgiou S, Xenakis EM, Langer O: Group B *streptococcus* infection rate unchanged by gestational diabetes. *Obstet Gynecol* 1999;93:292-296.
- 338 Bosch-Mestres J, Martin-Fernandez RM, Jimenez de Anta-Losada MT: Comparative study of three culture media for detecting group B *Streptococcus* colonization in pregnant women. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21:346-349.
- 339 Votava M, Tejkalova M, Drabkova M, Unzeitig V, Braveny I: Use of GBS media for rapid detection of group B streptococci in vaginal and rectal swabs from women in labor. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:120-122.
- 340 Kwatra G, Madhi SA, Cutland CL, Buchmann EJ, Adrian PV: Evaluation of Trans-Vag broth, colistin-nalidixic agar, and CHROMagar StrepB for detection of group B *Streptococcus* in vaginal and rectal swabs from pregnant women in South Africa. *Journal of clinical microbiology* 2013;51:2515-2519.
- 341 Poisson DM, Evrard ML, Freneaux C, Viv_Đs Mi, Mesnard L: Evaluation of CHROMagarG_Ê StrepB agar, an aerobic chromogenic medium for prepartum vaginal/rectal Group B *Streptococcus* screening. *Journal of microbiological methods* 2011;84:490-491.
- 342 Tazi A, Reglier-Poupet H, Dautzac F, Raymond J, Poyart C: Comparative evaluation of Strepto B ID chromogenic medium and Granada media for the detection of Group B *streptococcus* from vaginal samples of pregnant women. *J Microbiol Methods* 2008;73:263-265.
- 343 de Steenwinkel FD, Tak HV, Muller AE, Nouwen JL, Oostvogel PM, Mocumbi SM: Low carriage rate of group B *streptococcus* in pregnant women in Maputo, Mozambique. *Trop Med Int Health* 2008;13:427-429.
- 344 Balaka B, Agb_Đr_Đ A, Dagnra A, Baeta S, Kessie K, Assimadi K: Portage génital bactérien au dernier trimestre de grossesse et infection néonatale précoce. *Archives de pédiatrie* 2005;12:514-519.
- 345 Stupak ALEK, Kwa_Äniewska ANNA, Semczuk MARI, Zdzienicka GRA, Malm ANNA: The colonization of women genital tract by *Streptococcus agalactiae*. *Arch Perinat Med* 2010;16:48-50.
- 346 Yang MJ, Sun PL, Wen KC, Chao KC, Chang WH, Chen CY, Wang PH: Prevalence of maternal group B *streptococcus* colonization and vertical transmission in low-risk women in a single institute. *J Chin Med Assoc* 2012;75:25-28.
- 347 Foumane P, Mboudou E, Dohbit JS, Nkemayim DC, Tchokoteu PF, Doh AS: Streptocoque Beta Hemolytique Du Groupe B Et Consequences Materno-Foetales Observees A LG_Âhopital General De Yaounde: Etude descriptive. *Clinics in Mother and Child Health* 2009;6.
- 348 Stoll BJ, Schuchat A: Maternal carriage of group B streptococci in developing countries. *The Pediatric infectious disease journal* 1998;17:499-503.
- 349 Donbraye-Emmanuel OOB, Okonko ID, Donbraye E, Fadeyi A, Abubakar MJ, Adebisi OE, Fashina NA: Isolation and characterization of Group B Steptococci and

Références Bibliographiques

- other pathogens among pregnant women in Ibadan Southwest Nigeria. *Journal of Applied Biosciences* 2010;29:1781-1792.
- 350 Amin A, Abdulrazzaq YM, Uduman S: Group B streptococcal serotype distribution of isolates from colonized pregnant women at the time of delivery in United Arab Emirates. *J Infect* 2002;45:42-46.
- 351 Assouik F.Z.: Thèse de Doctorat en Médecine. Portage vaginal du streptocoque du groupe B chez la femme. Université Mohammed V de Rabat 2011.
- 352 Zamzami TY, Marzouki AM, Nasrat HA: Prevalence rate of group B streptococcal colonization among women in labor at King Abdul-Aziz University Hospital. *Arch Gynecol Obstet* 2011;284:677-679.
- 353 Jerbi M, Hidar S, Hannachi N, El MS, Djebbari H, Boukadida J, Chaieb A, Khairi H: Risk factors for group B streptococcal colonization in pregnant women at term: prospective study of 294 cases. *Gynecol Obstet Fertil* 2007;35:312-316.
- 354 Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R, Maleckiene L, Vitkauskiene A, Nadisauskiene R: Group B *streptococcus* and *Escherichia coli* colonization in pregnant women and neonates in Lithuania. *Int J Gynaecol Obstet* 2012;117:69-73.
- 355 Dzowela T, Komolafe OO, Igbigbi A: Prevalence of group b *Streptococcus* colonization in antenatal women at the Queen Elizabeth Central Hospital, BlantyreG_ôa preliminary study. *Malawi Medical Journal* 2006;17:97-99.
- 356 Laufer J, Scasso S, Sosa CG, Rodriguez-Cuns G, Alonso J, Pons JE: Group B *streptococcus* colonization among pregnant women in Uruguay. *Int J Gynaecol Obstet* 2009;104:242-243.
- 357 Seoud M, Nassar AH, Zalloua P, Boghossian N, Ezeddine J, Fakhoury H, Abboud J, Melki I, Araj G, Nacouzi G: Prenatal and neonatal Group B *Streptococcus* screening and serotyping in Lebanon: incidence and implications. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 2010;89:399-403.
- 358 Kovavisarach E, Ying WS, Kanjanahareutai S: Risk factors related to group B streptococcal colonization in pregnant women in labor. *J Med Assoc Thai* 2007;90:1287-1292.
- 359 Valkenburg-van den Berg AW, Sprij AJ, Oostvogel PM, Mutsaers JA, Renes WB, Rosendaal FR, Joep DP: Prevalence of colonisation with group B Streptococci in pregnant women of a multi-ethnic population in The Netherlands. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;124:178-183.
- 360 Grimwood K, Stone PR, Gosling IA, Green R, Darlow BA, Lennon DR, Martin DR: Late antenatal carriage of group B *Streptococcus* by New Zealand women. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2002;42:18.186-2
- 361 Mahmoud M, Yahyaoui G, Benseddik N, Saadi M, Chacara H, Melhouf M: Dépistage de streptocoque du groupe B au cours du troisième trimestre de grossesse au CHU Hassan II de Fès. *Revue Tunisienne d'Infectiologie* 2011;5:12-15.

Références Bibliographiques

- 362 Lorquet S, Melin P, Minon JM, Carpentier M, Gerday C, Rigo J, Foidart JM: Group B *Streptococcus* in the antenatal clinic and in the delivery room: a matter of systematic attitude. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 2005;34:115-127.
- 363 Shabayek SA, Abdalla SM, Abouzeid AM: Vaginal carriage and antibiotic susceptibility profile of group B *Streptococcus* during late pregnancy in Ismailia, Egypt. J Infect Public Health 2009;2:86-90.
- 364 Rocchetti TT, Marconi C, Rall VL, Borges VT, Corrente JE, da Silva MG :Group B streptococci colonization in pregnant women: risk factors and evaluation of the vaginal flora. Arch Gynecol Obstet 2011;283:717-721.
- 365 Sunna E, el-Daher N, Bustami K, Na'was T: A study of group B streptococcal carrier state during late pregnancy. Trop Geogr Med 1991;43:161-164.
- 366 Moyo SR, Mudzori J, Tswana SA, Maeland JA: Prevalence, capsular type distribution, anthropometric and obstetric factors of group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*) colonization in pregnancy. Cent Afr J Med 2000;46:115-120.
- 367 Money DM, Dobson S: The prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease. J Obstet Gynaecol Can 2004;26:826-840.
- 368 Kubota T: Relationship between maternal group B streptococcal colonization and pregnancy outcome. Obstet Gynecol 1998;92:926-930.
- 369 Krohn MA, Hillier SL, Baker CJ: Maternal peripartum complications associated with vaginal group B streptococci colonization. J Infect Dis 1999;179:1410-1415.
- 370 Weber P: *Streptococcus pneumoniae*: lack of emergence of pristinamycin resistance. Pathol Biol (Paris) 2001;49:840-845.
- 371 Adawaye CÑ, Michel T, Paul AJ, Th_Ñr_Đse N, Hortense G, Koanga M, Sinata KS: Vaginal colonization and resistance profile of group B *Streptococcus* among pregnant women in Yaound_Ñ Gynecology, Obstetric and Pediatric Hospital in Cameroon. 2014; 30:18-22.
- 372 Dzwela T, Komolafe OO, Igbigbi A: Prevalence of group b *Streptococcus* colonization in antenatal women at the Queen Elizabeth Central Hospital, BlantyreG_ôa preliminary study. Malawi Medical Journal 2006;17:97-99.
- 373 Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP: The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Obstet Gynecol 1991;77:604-610.
- 374 Quentin R, Pierre F, LEBLOND MH, Lecointe V: Prélèvements vaginaux et endocervicaux: quand et comment les réaliser?: Recommandations pour la Pratique Clinique. J Gynécologie Obstétr Biologie Reprod 1997;26:29-37.
- 375 El Beitune P, Duarte G, Maffei CM, Quintana SM, De Sa Rosa E Silva AC, Nogueira AA: Group B *Streptococcus* carriers among HIV-1 infected pregnant

Références Bibliographiques

- women: prevalence and risk factors. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2006;128:54-58.
- 376 Yow MD, Leeds LJ, Thompson PK, Mason EO, Jr., Clark DJ, Beachler CW: The natural history of group B streptococcal colonization in the pregnant woman and her offspring. I. Colonization studies. Am J Obstet Gynecol 1980;137:34-38.
- 377 Stapleton RD, Kahn JM, Evans LE, Critchlow CW, Gardella CM: Risk factors for group B streptococcal genitourinary tract colonization in pregnant women. Obstet Gynecol 2005;106:1246-1252.
- 378 Ramos E, Gaudier FL, Hearing LR, Del Valle GO, Jenkins S, Briones D: Group B *streptococcus* colonization in pregnant diabetic women. Obstet Gynecol 1997;89:257-260.
- 379 Schauf V, Hlaing V: Group B streptococcal colonization in pregnancy. Obstet Gynecol 1976;47:719-721.
- 380 Raimer K, O'Sullivan MJ: Influence of diabetes on group B *Streptococcus* colonization in the pregnant patient. J Matern Fetal Med 1997;6:120-123.
- 381 Piper JM, Georgiou S, Xenakis EM, Langer O: Group B *streptococcus* infection rate unchanged by gestational diabetes. Obstet Gynecol 1999;93:292-296.
- 382 McDonald HM, Chambers HM: Intrauterine infection and spontaneous midgestation abortion: is the spectrum of microorganisms similar to that in preterm labor? Infect Dis Obstet Gynecol 2000;8:220-227.
- 383 Daugaard HO, Thomsen AC, Henriques U, Ostergaard A: Group B streptococci in the lower urogenital tract and late abortions. Am J Obstet Gynecol 1988;158:28-31.
- 384 El-Kersh TA, Al-Nuaim LA, Kharfy TA, Al-Shammary FJ, Al-Saleh SS, Al-Zamel FA: Detection of genital colonization of group B streptococci during late pregnancy. Saudi Med J 2002;23:56-61.
- 385 Charra S: Thèse de Docyorat en Médecine. Les menaces d'accouchement prématuré : Facteurs pronostics d'accouchement imminent et éléments prédictifs du bien être néonatal. À propos de 68 cas à la maternité du chu de Dijon. Université de Bourgogne France 2005.
- 386 Goffinet F, Maillard F, Mihoubi N, Kayem G, Papiernik E, Cabrol D, Paul G: Bacterial vaginosis: prevalence and predictive value for premature delivery and neonatal infection in women with preterm labour and intact membranes. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2003;108:146-151.
- 387 Abbara A.: La flore bactérienne vaginale; le pH du vagin; Score de Nugent. Accès: http://www.waly-abbara.com/livre_gyn_obs/termes/hygiene/flore_vaginale/vaginose_bacterienne.html 2008.
- 388 Lansac J: La menace d'accouchement prématuré à membranes intactes. Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 2002.

Références Bibliographiques

- 389 Recommandations du Conseil Supérieur d'Hygiène Bruxelles: Prévention des infections périnatales à streptocoques du groupe B. Recommandations du Conseil Supérieur d'Hygiène Bruxelles 2003.
- 390 Dahan-Saal J, Gerardin P, Robillard PY, Barau G, Bouveret A, Picot S, Fianu A, Boukerrou M: Determinants of group B *streptococcus* maternal colonization and factors related to its vertical perinatal transmission: case-control study. *Gynecol Obstet Fertil* 2011;39:281-288.
- 391 Terry RR, Kelly FW, Gauzer C, Jeitler M: Risk factors for maternal colonization with group B beta-hemolytic streptococci. *J Am Osteopath Assoc* 1999;99:571-573.
- 392 Lin FY, Azimi PH, Weisman LE, Philips JB, III, Regan J, Clark P, Rhoads GG, Clemens J, Troendle J, Pratt E, Brenner RA, Gill V: Antibiotic susceptibility profiles for group B streptococci isolated from neonates, 1995-1998. *Clin Infect Dis* 2000;31:76-79.
- 393 Cherkaoui A, Emonet S, Fernandez J, Schorderet D, Schrenzel J: Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of Beta-hemolytic streptococci. *J Clin Microbiol* 2011;49:3004-3005.
- 394 Binghuai L, Yanli S, Shuchen Z, Fengxia Z, Dong L, Yanchao C: Use of MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of group B *Streptococcus* on chromID Strepto B agar. *Int J Infect Dis* 2014;27:44-48.
- 395 Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, Lay JO, Jr.: Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1996;10:1227-1232.
- 396 Krishnamurthy T, Ross PL, Rajamani U: Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1996;10:883-888.
- 397 Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, Dunn J, Hall G, Wilson D, Lasala P, Kostrzewa M, Harmsen D: Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol* 2008;46:1946-1954.
- 398 Suarez S: *Microbiologie clinique et spectrométrie de masse. Human health and pathology* 2013.
- 399 Mimica MJ, Martino MDV, Pasternak J: MALDI-TOF MS in the clinical microbiology laboratory. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2013;49:256-259.
- 400 Moussaoui L: Thèse de Doctorat en Recherche clinique et innovation technologique. Applications de la spectrométrie de masse type MALDI-TOF à la bactériologie et à la distinction de variants génétiques. Ecole doctorale Sciences de la vie et de la santé (Strasbourg) 2012.

Références Bibliographiques

- 401 Janapatla RP, Ho YR, Yan JJ, Wu HM, Wu JJ: The prevalence of erythromycin resistance in group B streptococcal isolates at a University Hospital in Taiwan. *Microb Drug Resist* 2008;14:293-297.
- 402 Sahnoun O, Ben AH, Noomen S, Ben Elhadj KA, Mastouri M: Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae* strains in Monastir. *Med Mal Infect* 2007;37:734-737.
- 403 Ueno H, Yamamoto Y, Yamamichi A, Kikuchi K, Kobori S, Miyazaki M: Characterization of group B *streptococcus* isolated from women in Saitama city, Japan. *Jpn J Infect Dis* 2012;65:516-521.
- 404 Sadowy E, Matynia B, Hryniewicz W: Population structure, virulence factors and resistance determinants of invasive, non-invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* in Poland. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1907-1914.
- 405 Hsueh PR, Teng LJ, Lee LN, Ho SW, Yang PC, Luh KT: High incidence of erythromycin resistance among clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3205-3208.
- 406 Fluegge K, Supper S, Siedler A, Berner R: Antibiotic susceptibility in neonatal invasive isolates of *Streptococcus agalactiae* in a 2-year nationwide surveillance study in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4444-4446.
- 407 Andrews JI, Diekema DJ, Hunter SK, Rhomberg PR, Pfaller MA, Jones RN, Doern GV: Group B streptococci causing neonatal bloodstream infection: antimicrobial susceptibility and serotyping results from SENTRY centers in the Western Hemisphere. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:859-862.
- 408 Borchardt SM, DeBusscher JH, Tallman PA, Manning SD, Marrs CF, Kurzynski TA, Foxman B: Frequency of antimicrobial resistance among invasive and colonizing Group B streptococcal isolates. *BMC Infect Dis* 2006;6:57.
- 409 Lambiase A, Agangi A, Del PM, Quaglia F, Testa A, Rossano F, Martinelli P, Catania MR: In vitro resistance to macrolides and clindamycin by Group B *Streptococcus* isolated from pregnant and nonpregnant women. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2012;2012:913603.
- 410 Bronzwaer SL, Cars O, Buchholz U, Molstad S, Goettsch W, Veldhuijzen IK, Kool JL, Sprenger MJ, Degener JE: A European study on the relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis* 2002;8:278-282.
- 411 Allardice JG, Baskett TF, Seshia MM, Bowman N, Malazdrewicz R: Perinatal group B streptococcal colonization and infection. *Am J Obstet Gynecol* 1982;142:617-620.
- 412 Otaguiri ES, Morguette AE, Tavares ER, dos Santos PM, Morey AT, Cardoso JD, Perugini MR, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF: Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Parana, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants. *BMC Microbiol* 2013;13:297.

Références Bibliographiques

- 413 Fitoussi F, Loukil C, Gros I, Clermont O, Mariani P, Bonacorsi S, Le T, I, Deforche D, Bingen E: Mechanisms of macrolide resistance in clinical group B streptococci isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1889-1891.
- 414 Roberts MC: Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev* 1996;19:1-24.
- 415 Boswihi SS, Udo EE, Al-Sweih N: Serotypes and antibiotic resistance in Group B *streptococcus* isolated from patients at the Maternity Hospital, Kuwait. *J Med Microbiol* 2012;61:126-131.
- 416 Dogan B, Schukken YH, Santisteban C, Boor KJ: Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. *J Clin Microbiol* 2005;43:5899-5906.
- 417 Ekelund K, Slotved HC, Nielsen HU, Kalsoft MS, Konradsen HB: Emergence of invasive serotype VIII group B streptococcal infections in Denmark. *J Clin Microbiol* 2003;41:4442-4444.
- 418 Salloum M, Mee-Marquet N, Valentin-Domelier AS, Quentin R: Diversity of prophage DNA regions of *Streptococcus agalactiae* clonal lineages from adults and neonates with invasive infectious disease. *PLoS One* 2011;6:e20256.
- 419 Martins ER, Melo-Cristino J, Ramirez M: Dominance of serotype Ia among group B Streptococci causing invasive infections in nonpregnant adults in Portugal. *J Clin Microbiol* 2012;50:12.1227-19
- 420 Bergseng H, Rygg M, Bevanger L, Bergh K: Invasive group B *streptococcus* (GBS) disease in Norway 1996-2006. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27:1193-1199.
- 421 Ippolito DL, James WA, Tinnemore D, Huang RR, Dehart MJ, Williams J, Wingerd MA, Demons ST: Group B *streptococcus* serotype prevalence in reproductive-age women at a tertiary care military medical center relative to global serotype distribution. *BMC Infect Dis* 2010;10:336.
- 422 Martins ER, Andreu A, Correia P, Juncosa T, Bosch J, Ramirez M, Melo-Cristino J: Group B streptococci causing neonatal infections in barcelona are a stable clonal population: 18-year surveillance. *J Clin Microbiol* 2011;49:2911-2918.
- 423 Ramaswamy SV, Ferrieri P, Flores AE, Paoletti LC: Molecular characterization of nontypeable group B streptococcus. *J Clin Microbiol* 2006;44:2398-2403.
- 424 von BU, Ruess M, Mueller U, Fluegge K, Sander A, Berner R: A serotype V clone is predominant among erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* isolates in a southwestern region of Germany. *J Clin Microbiol* 2003;41:2166-2169.
- 425 Bouvet D.: Thèse de Doctorat en Médecine. Infection et colonisation à *Streptococcus agalactiae* chez les femmes enceintes et les nouveau-nés : caractérisation des souches sur une période de 10 ans au CHU de Tours. Académie d'Orléans -Tours Université François-Rabelais 2011.

Références Bibliographiques

- 426 Haguenoer E, Baty G, Pourcel C, Lartigue MF, Domelier AS, Rosenau A, Quentin R, Mereghetti L, Lanotte P: A multi locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) scheme for *Streptococcus agalactiae* genotyping. BMC Microbiol 2011;11:171.



Résumé(s)



Résumé

Objectif

Depuis longtemps, *Streptococcus agalactiae* est reconnu comme principal agent des infections maternofoetales dont les conséquences sont dramatiques et il apparaît également comme un pathogène émergent dans les infections chez les adultes. Notre objectif est d'évaluer la prévalence du portage de SGB chez la femme enceinte dans notre contexte Algérien et de rechercher les éventuels facteurs prédictifs de ce portage. Parallèlement, rechercher la résistance bactérienne aux antibiotiques, les différents sérotypes circulant dans notre région ainsi que la diversité génétique de ces isolats, en comparant à ceux isolés de Marseille, France.

La présente étude décrit pour la première fois la diversité génétique et phénotypique des 93 isolats de *Streptococcus agalactiae* (SGB) collectés à Guelma, Algérie, et à Marseille, France.

Méthodes

Sur une période de trois ans, 93 isolats de SGB ont été collectés entre Guelma et Marseille.

Un prélèvement vaginal a été réalisé de manière prospective dans notre région chez 494 parturientes au cours des trois trimestres de la grossesse. L'identification de *Streptococcus agalactiae* dans les prélèvements vaginaux nous a permis de mesurer la prévalence de portage chez les femmes enceintes. Une analyse statistique des données a permis de tirer certaines conclusions.

Toutes les souches ont été identifiées par MALDI-TOF MS. Ensuite, les tests de sensibilité aux antibiotiques (méthode de diffusion de disques sur gélose et CMI par E. Test) ont été réalisés selon les recommandations de la société Française de Microbiologie. Le support moléculaire de la résistance aux antibiotiques et le sérotypage ont été étudiés par PCR et séquençage. La lignée phylogénétique de chaque isolat de SGB a été déterminée par multilocus sequence typing (MLST) et regroupés dans des complexes clonaux (CC) en utilisant le programme eBURST.

Résultats

La fréquence globale de portage chez la femme enceinte dans notre région est faible par rapport à celle trouvée dans la littérature (9%). Un seul facteur favorisant la colonisation maternelle est constamment retrouvé.

Les isolats représentent 37 séquences types (STs), dont 16 étaient des nouveaux STs, regroupés en cinq CCs et appartenant à sept sérotypes. Le sérotype V était le sérotype le plus répandu dans notre collection (44,1%). Les isolats de SGB de chaque sérotype ont été répartis entre plusieurs CCs, y compris cps III / CC19, cps V / CC1, cps Ia / CC23, cps II / CC10 et

cps III / CC17. Tous les isolats présentent une sensibilité à la pénicilline; alors que la résistance à l'érythromycine a été détectée dans 40% et la tétracycline dans 82,2% des isolats. Sur les 37 isolats résistants à l'érythromycine, 75,7% ont montré une résistance au macrolide-lincosamide-streptogramine (MLS_B phénotype) et 24,3% présentent une résistance au macrolide (M phénotype). Une résistance constitutive MLS_B (46%) médiée par le gène *ermB* était significativement associée aux isolats de Guelma, tandis que le phénotype de résistance M (24,3%) médiée par le gène *mefA/E* domine parmi les isolats de Marseille et appartenait à la séquence type ST-23. La résistance à la tétracycline était principalement due à *tetM*, qui a été détecté seul (95,1%) ou associé à *tetO* (3,7%).

Conclusions

La colonisation génitale par *Streptococcus agalactiae* chez la femme enceinte est une réalité à ne pas sous-estimer vu les conséquences néonatales qui en découlent. Il serait souhaitable d'instaurer une politique de dépistage systématique à terme chez toutes les femmes enceintes dans notre contexte.

Ces résultats fournissent des données épidémiologiques dans ces régions qui établissent une base pour surveiller une résistance accrue à l'érythromycine et fournissent également un aperçu des corrélations entre les clones, les sérotypes et les gènes de résistance.

Mots clés: *Streptococcus agalactiae*, prévalence, infections, MALDI-TOF-MS, gènes de résistance, sérotypage, génotypage, MLST.

Abstract

Objective

Historically, *Streptococcus agalactiae* is recognized as the principal agent maternofetales infection whose consequences are dramatic and it also appears as an emerging pathogen in infections in adults. Our objective is to evaluate the prevalence of GBS carriage in pregnant women in our Algerian context and seek potential predictors of this port. In parallel, search bacterial resistance to antibiotics, different serotypes circulating in our region as well as the genetic diversity of these isolates, comparing to those isolated from Marseille, France. This study describes for the first time the genetic and phenotypic diversity of 93 isolates of *Streptococcus agalactiae* (GBS) collected in Guelma, Algeria, and in Marseille, France.

Methods

Over a period of three years, 93 GBS isolates were collected between Guelma and Marseille. A vaginal swab was performed prospectively in our region among 494 women in labor during the three trimesters of pregnancy. The identification of *Streptococcus agalactiae* in vaginal specimens allowed us to measure the prevalence among pregnant women carrying statistical analysis of the data allowed to draw some conclusions.

All strains were identified by MALDI-TOF MS. Then, antibiotics susceptibility testing (disc diffusion method and agar MIC E. Test) is carried out according to the recommendations of the French Society for Microbiology. The molecular carrier antibiotic resistance and serotyping have been studied by PCR and sequencing. The phylogenetic lineage of each isolate of GBS was determined by Multilocus Sequence Typing (MLST) and grouped into clonal complex (CC) using the eBURST program.

Results

The overall frequency of carry pregnant women in our area is low compared to that found in the literature (9%). One factor promoting maternal colonization is constantly found. The isolates represented 37 sequence types (STs), 16 of which were novel, grouped into five CCs and belonging to seven serotypes. Serotype V was the most prevalent serotype in our collection (44.1%). GBS isolates of each serotype were distributed among multiple CCs, including cps III/CC19, cps V/CC1, cps Ia/CC23, cps II/CC10 and cps III/CC17. All isolates presented susceptibility to penicillin; whereas resistance to erythromycin was detected in 40% and tetracycline in 82.2% of isolates. Of the 37 erythromycin-resistant isolates, 75.7% showed the macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS)_B-resistant phenotype and 24.3% exhibited the macrolide (M)-resistant phenotype. Constitutive MLS_B resistance (46%) mediated by the *ermB* gene was significantly associated with the Guelma isolates, whereas the M resistance

phenotype (24.3%) mediated by the *mefA/E* gene dominated among the Marseille isolates and belonged to ST-23. Tetracycline resistance was predominantly due to *tetM*, which was detected alone (95.1%) or associated with *tetO* (3.7%).

Conclusions

Genital colonization by *Streptococcus agalactiae* in pregnant women is a reality not seen underestimate neonatal consequences. It would be desirable to introduce a term systematic screening policy for all pregnant women in our context.

These results provide epidemiological data in these regions which establish a basis for monitoring increased resistance to erythromycin and also provide insight into the relationships between the clones of the serotypes and the resistance genes.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, prevalence, infections, MALDI-TOF-MS, resistance genes, serotyping, genotyping, MLST.

الملخص

الهدف:

لفترة طويلة أعتبرت العقديات B العامل الرئيسي في الالتهابات التي تنتقل من الأم للجنين, حيث النتائج تكون وخيمة و تعتبر أيضا مسؤولة عن العدوى عند البالغين.

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم مدى انتشار حمل مجموعة العقديات B عند النساء الحوامل الحوامل في السياق الجزائري و كذا البحث عن العوامل المؤثرة في حمل هذه البكتيريا وفي نفس الوقت البحث عن المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية، مختلف sérotypes المنتشرة في منطقتنا و وكذلك التنوع الجيني لهذه العزلات، مقارنة مع تلك المعزولة من مرسليليا، فرنسا.

توضح هذه الدراسة لأول مرة التنوع الوراثي و المظهري ل93 عينة من المجموعة العقدية B التي تم جمعها في قالمة (الجزائر) ومرسليليا (فرنسا).

الطريقة :

على مدى فترات ثلاثة سنوات قمنا بدراسة استطلاعية شملت 93 عينة من المجموعات العقدية B التي تم جمعها ما بين قالمة و مرسليليا. تم اجراء مسحة مهبلية في منطقتنا شملت 494 امرأة خلال المراحل الثلاثة من الحمل. تحديد جرثوم S. agalactiae في العينات المهبلية سمحت لنا بقياس مدى انتشارها بين النساء الحوامل. تحليل بياني احصائي للبيانات سمح باستخلاص الاستنتاجات.

جميع المكورات العقدية B تم تشخيصها بواسطة MALDI-TOF MS, بعد ذلك اختبارات الحساسية ضد المضادات الحيوية (طريقة الانتشار القرصي في gélose au sang وتحديد الحد الأدنى للتركيزات المثبطة بواسطة (E. Test) وفقا لتوصيات الجمعية الفرنسية لعلم الأحياء الدقيقة.

كما تم التعرف على الجينات المسؤولة على المقاومة للمضادات الحيوية و sérotypage بواسطة تقنيات البيولوجيا الجزيئية PCR et séquençage. العلاقة بين السلالات المتعددة لكل مكورة عقدية B تم تحديدها بواسطة Multilocus Sequence Typing (MLST) و التي تم تجميعها باستخدام البرنامج eBURST.

النتائج :

معدل النقل العام للمرأة الحامل في منطقتنا يعتبر منخفض (9%) مقارنة مع تلك التي ذكرت في المراجع الأدبية. تم العثور على عامل واحد مؤهل ثابت لانتشار بكتيريا العقديات B عند الأمهات.

جميع العينات مثلت 37 séquence types (STs), منها 16 كانت جديدة , مقسمة الى 5 CCs و 7 sérotypes. Le sérotype V هو الأكثر شيوعا في مجموعتنا ب (44,1%).

جميع العينات من المكورات العقدية B و الموزعة في كل sérotype تم تقسيمها في مجموعات ما بين CCs. منها III cps / CC19, cps V / CC1, cps Ia / CC23, CPS II / CC10.

كل العينات كانت حساسة للبنسلين, في حين تم الكشف عن مقاومة لérythromycine, أظهرت منها 40% و tétracycline مثلت 82,2% عينة.

من 37 عينة مقاومة للérothromycine, أظهرت 75,7% مقاومة من نوع macrolide-lincosamide- و 24.3% مثلت مقاومة لstreptogramine (MLS_B phénotype) و macrolide (M phénotype).

Résumés

المقاومة (46%) constitutive MLS_B مرتبطة بالجينات *ermB* كانت مرتبطة significativeme بالعينات الموجودة في قالمة في حين المقاومة M de résistance المرتبط بالجينات *Mef A/E* تهيمن في العينات المأخوذة من مرسليليا و تنتمي الى ST-23.

المقاومة ل tetracycline كانت مرتبطة أساسا ب *TetM* التي تم كشفها وحيدة (95,1%) أو مرتبطة ب *etO* (3,7%).

الخلاصة :

الاستعمار في الأعضاء التناسلية من قبل الجرثومة التناسلية *Streptococcus agalactiae* للنساء الحوامل حقيقة لا ينبغي التقليل من اهميتها نظرا للآثار الجانبية التي يشهدها الاطفال حديثي الولادة والتي تترتب عليه. سيكون من المرغوب فيه ادخال سياسة على المدى للفحص المنتظم لجميع النساء الحوامل في سياقنا.

هذه النتائج توفر بيانات وبائية في هذه المناطق التي تنشئ قاعدة لرصد زيادة المقاومة ل *érythromycine*, كما توفر نظرة عامة على الترابطات بين sérotypes و الجينات الناتجة عن المضادات الحيوية .

الكلمات المفتاحية: العقدية القاطعة للدر، وانتشار، والالتهابات، MALDI-TOF-MS، الجينات المقاومة، المصلي، التتميط الجيني، MLST.



Annexes



Liste des annexes

Annexe 1. Model d'extraction des pics par le logiciel; Excel (Capture écran).

Annexe 2. Exemple du blast du gène *ermA* de la souche M6 sur NCBI.

Annexe 3. PCR multiplexe selon le modèle de Poyart et *al.*, (2007).

Annexe 4. PCR multiplexe selon le modèle de Imperi et *al.*, (2010).

Annexe 5. Résultats de typage moléculaire par PCR.

Annexe 6. Caractéristiques phénotypiques et moléculaires des 44 SGB isolés à Guelma en fonction des trimestres de la grossesse.

Annexe 7. Article publié.

Annexe 2. Exemple du blast du gène *ermA* de la souche M6 sur NCBI

The screenshot displays the NCBI BLAST web interface. At the top, the browser address bar shows the URL: `blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome`. The page title is "BLAST® Basic Local Alignment Search Tool".

The main section is titled "Standard Nucleotide BLAST". It contains several input fields and options:

- Enter Query Sequence:** A text area containing the FASTA sequence of the *ermA* gene from strain M6. The sequence starts with `> M6` followed by several lines of nucleotide code.
- Job Title:** A text field containing "M15".
- Choose Search Set:** A section with radio buttons for "Human genomic + transcript", "Mouse genomic + transcript", and "Others (nr etc.)". The "Others (nr etc.)" option is selected, and the database is set to "Nucleotide collection (nr/nt)".
- Program Selection:** A section with radio buttons for "Highly similar sequences (megablast)", which is selected.

Below the search form, the results page is displayed. The title is "NCBI/BLAST/blastn suite/Formatting Results - 46W3JGTB014". It includes links for "Edit and Resubmit", "Save Search Strategies", "Formatting options", and "Download".

The results section shows the following information:

- M6** (Strain name)
- RID:** 46W3JGTB014 (Expires on 10-20 16:04 pm)
- Query ID:** Id|44725
- Description:** M6
- Molecule type:** nucleic acid
- Query Length:** 589
- Database Name:** nr
- Description:** Nucleotide collection (nt)
- Program:** BLASTN 2.2.30+ > Citation

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

The "Graphic Summary" section is expanded, showing a "Distribution of 22 Blast Hits on the Query Sequence" bar chart. The chart has a color key for alignment scores:

- <40 (Black)
- 40-50 (Blue)
- 50-80 (Green)
- 80-200 (Pink)
- >=200 (Red)

The x-axis represents the query sequence position from 1 to 500. The y-axis represents the 22 blast hits. The chart shows that most hits have high alignment scores, indicated by red and pink bars, particularly in the region between positions 100 and 500.

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Nocardia transvalensis strain CNM20071153 erythromycin resistance methylase (ermA) gene, partial cds	1055	1055	100%	0.0	99%	KM194593.1
<input type="checkbox"/> Streptococcus pyogenes integrative conjugative element ICESp1108_strain C1	1055	1055	100%	0.0	99%	FR891054.1
<input type="checkbox"/> Aerococcus urinae ACS-120-V-Col10a_complete genome	1055	1055	100%	0.0	99%	CP002512.1
<input type="checkbox"/> Streptococcus pneumoniae AF200_complete genome	1055	1055	100%	0.0	99%	CP002121.1
<input type="checkbox"/> Streptococcus pyogenes ermTR element_strain C1	1055	1055	100%	0.0	99%	FM162351.1
<input type="checkbox"/> Streptococcus pyogenes MGAS10750_complete genome	1055	1055	100%	0.0	99%	CP00262.1
<input type="checkbox"/> Streptococcus pyogenes leader peptides 1 (lpp1) and 2 (lpp2) and erythromycin resistance methylase (ermTR) genes_complete cds	1055	1055	100%	0.0	99%	AF002716.1
<input type="checkbox"/> Streptococcus agalactiae strain NGBS061_complete genome	1050	1050	100%	0.0	99%	CP007631.2
<input type="checkbox"/> Streptococcus pyogenes ICESp2905 DNA containing erm(TR)-carrying element and tet(O) fragment_strain IB21	1050	1050	100%	0.0	99%	FR891055.1
<input type="checkbox"/> Streptococcus anghinosus C238_complete genome	1044	1044	100%	0.0	99%	CP00386.1
<input type="checkbox"/> Streptococcus pyogenes leader peptide (lpp) gene_complete cds and erythromycin-resistant methylase (ermTR-variant A) gene_partial cds	1044	1044	100%	0.0	99%	AF443782.1
<input type="checkbox"/> Streptococcus sp. 'group G' erythromycin resistance methylase (ermTR) gene_partial cds	963	963	91%	0.0	99%	AY355403.1
<input type="checkbox"/> Helicobacterium juncii erythromycin resistance methylase (ermA) gene_partial cds	952	952	89%	0.0	99%	DQ082900.1
<input type="checkbox"/> Streptococcus suis isolate B1 erythromycin resistance methylase (ermA) gene_partial cds	531	531	94%	6e-147	84%	EU047809.1
<input type="checkbox"/> Streptococcus lutetiensis strain F5S7 rRNA methylase (ermTR) gene_partial cds	501	501	81%	5e-138	85%	KF245576.1
<input type="checkbox"/> Streptococcus suis strain 36a erythromycin resistance methylase (ermA) gene_partial cds	477	477	86%	8e-131	84%	EU348757.1
<input type="checkbox"/> Oceanobacillus ihvensis HTE831 DNA_complete genome	468	468	97%	5e-128	81%	BA000028.3
<input type="checkbox"/> Streptococcus suis strain 2-17 erythromycin resistance methylase (ermA) gene_partial cds	462	462	84%	2e-126	84%	EU348756.1
<input type="checkbox"/> Streptococcus pyogenes strain 1-CT leader peptide 1 (lpp1) and leader peptide 2 (lpp2) genes_complete cds and erythromycin resistance methylase (ermA) gene_partial cds	344	344	31%	8e-91	100%	EU492923.1

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Download GenBank Graphics

Nocardia transvalensis strain CNM20071153 erythromycin resistance methylase (ermA) gene, partial cds
Sequence ID: [gb|KM194593.1](#) Length: 678 Number of Matches: 1

Next Previous Descriptions

Related Information

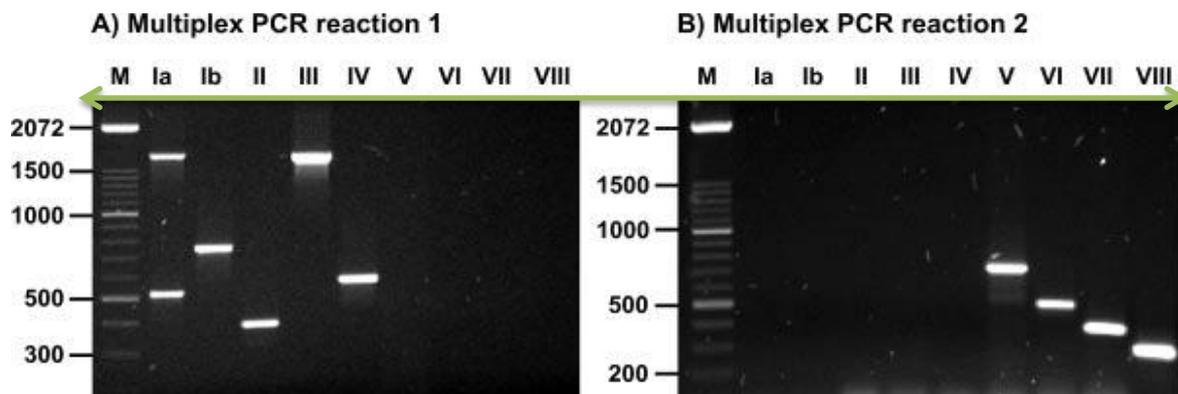
Range 1: 7 to 595 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1055 bits(571)	0.0	593/599(99%)	0/599(0%)	Plus/Minus
Query 1	CCCTGTTTACCCTTTATAAACGAAAAATCTACACTTTTTGTAGTCCTCTTTAAAAATAA	60		
Sbjct 595	CCCTGTTTACCCTTTATAAACGAAAAATCTACACTTTTTGTAGTCCTCTTTAAAAATAA	536		
Query 61	ATGGTTAGGCCTTTCAAGTCAATCAAAACGAAATCTACATTAGGCATAGGGTAAAAAT	120		
Sbjct 535	ATGGTTATGCCTTTCAAGTCAATCAATACGAAATCTACATTAGGCATTAGGGTAAAAAT	476		
Query 121	ATGCTCGTGGCACTTTTTAAGAAATTTTTATATCCATTCCACCAATTAACGCAAACTTA	180		
Sbjct 475	ATGCTCGTGGCACTTTTTAAGAAATTTTTATATCCATTCCACCAATTAACGCAAACTTA	416		
Query 181	AAGCTGTTGGGTATTTTGCAACTTTTAGCAAAATCCCTCTACAATAAGGTAGCTAT	240		
Sbjct 415	AAGCTGTTGGGTATTTTGCAACTTTTAGCAAAATCCCTCTACAATAAGGTAGCTAT	356		
Query 241	ATTTGCTTGACTATCAAAAAGCAATCTTTTTACAATATCACTAATATTTGTAGGGAA	300		
Sbjct 355	ATTTGCTTGACTATCAAAAAGCAATCTTTTTACAATATCACTAATATTTGTAGGGAA	296		
Query 301	TATTACCAATATTTTATAGTCTGATTTTTAGGAAAGCTAAACTTCAAAATATCCTCAT	360		
Sbjct 295	TATTACCAATATTTTATAGTCTGATTTTTAGGAAAGCTAAACTTCAAAATATCCTCAT	236		
Query 361	GAATAACTTTTATATCTGAAAAGGTTCAACTGCTTTTTGCGGCATGACATAAACCTT	420		
Sbjct 235	GAATAACTTTTATATCTGAAAAGGTTCAACTGCTTTTTGCGGCATGACATAAACCTT	176		
Query 421	CATCAATCTCTATAGCAATCACCGTGGACTCATTCCACAGTTCCTTGGTAAAAATGTC	480		
Sbjct 175	CATCAATCTCTATAGCAATCACCGTGGACTCATTCCACAGTTCCTTGGTAAAAATGTC	116		
Query 481	CTTTTCTGACCAATTTCTATATTTATCTGTTTATTGATATTGATATTTTAAATA	540		
Sbjct 115	CTTTTCTGACCAATTTCTATATTTATCTGTTTATTGATATTGATATTTTAAATA	56		
Query 541	TTTTCTTACATGCTTTTATAGATGAATGAAATTTTGGCTATTTTTGGG	599		
Sbjct 55	TTTTCTTACATGCTTTTATAGATGAATGAAATTTTGGCTATTTTTGGG	7		

Download GenBank Cookies

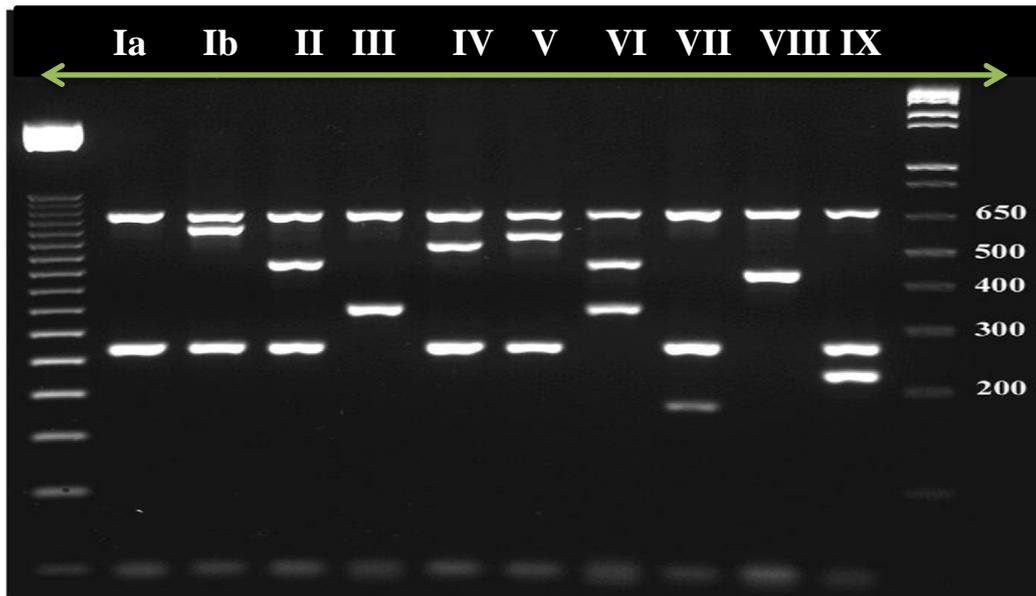
Next Previous Descriptions

Annexe 3. PCR multiplexe selon le modèle de Poyart et *al.*, (2007)



- Les types de souches analysées CPS sont indiqués ci-dessus leurs couloirs respectifs. (A) Multiplex PCR pour la détection de types CPS Ia, Ib, II, III, et IV; (B) PCR multiplex pour la détection de types de CPS V, VI, VII, et VIII. Voies M, taille standard moléculaire (échelle de 100 pb; Invitrogen). Les nombres sur la droite de chaque panneau sont en paires de bases.

Annexe 4. PCR multiplexe selon le modèle de Imperi et *al.*, (2010)

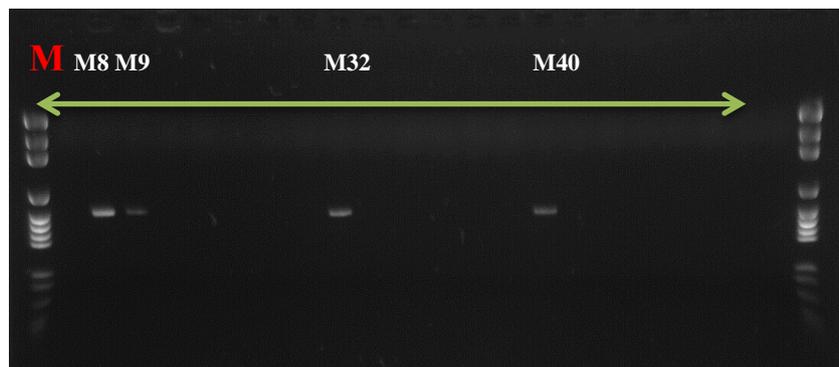
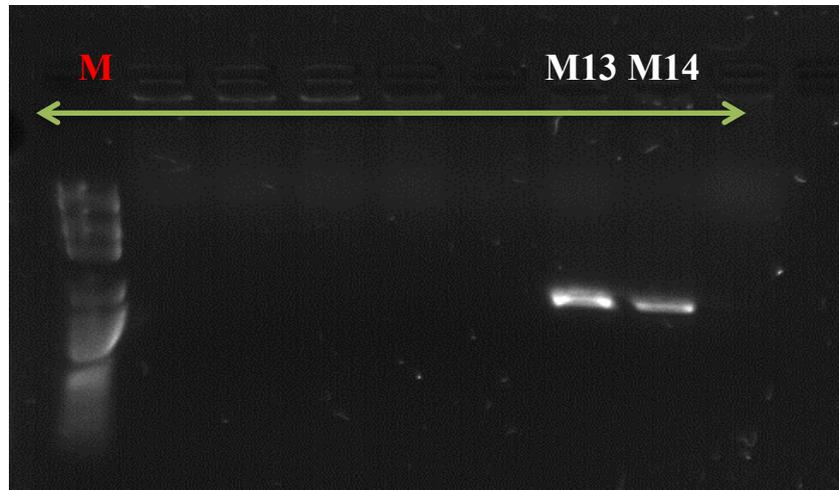


- Les Profils des produits de PCR attendu pour les 10 sérotypes sont mentionnés dans le tableau ci-dessous.

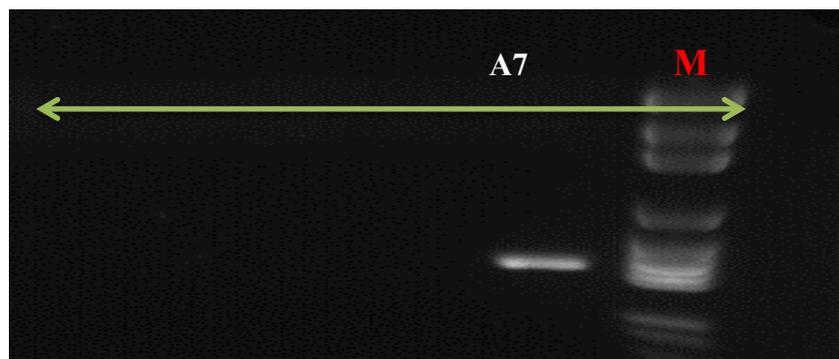
Sérotype	Taille des amplicons en paires de base (gène ciblé)
Ia	688 (cpsL) ; 272 (cpsG)
Ib	688 (cpsL) ; 621 (cpsJ) ; 272 (cpsG)
II	688 (cpsL) ; 465 (cpsJ) ; 272 (cpsG)
III	688 (cpsL) ; 352 (cpsG)
IV	688 (cpsL) ; 538 (cpsJ) ; 272 (cpsG)
V	688 (cpsL) ; 582 (cpsN) ; 272 (cpsG)
VI	688 (cpsL) ; 470 (cpsI) ; 352 (cpsG)
VII	688 (cpsL) ; 272 (cpsG) ; 179 (cpsI)
VIII	688 (cpsL) ; 438 (cpsJ)
IX	688 (cpsL) ; 272 (cpsG) ; 229 (cpsI)

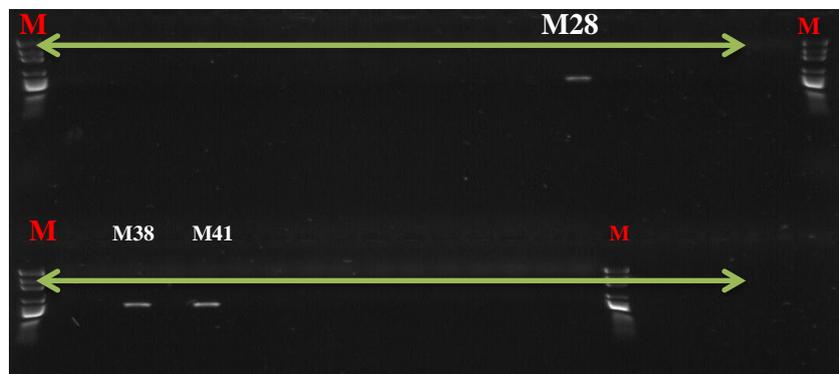
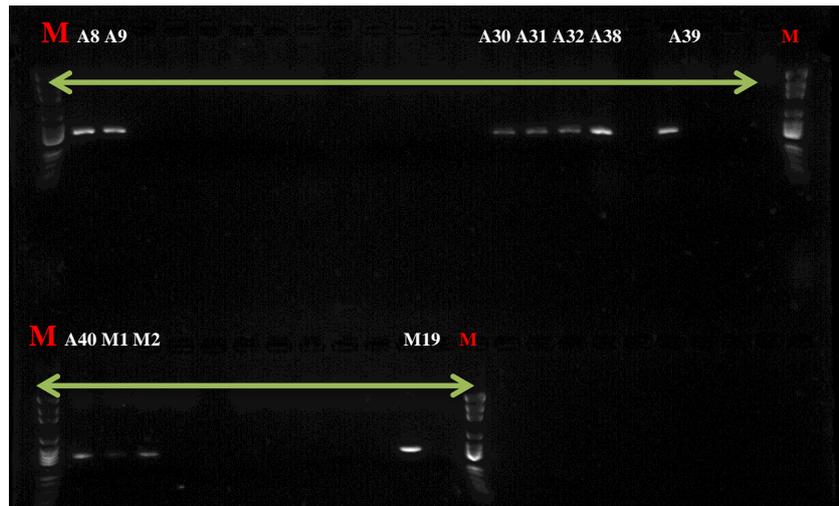
Annexe 5. Résultats de typage moléculaire par PCR

➤ Sérotype: Ia

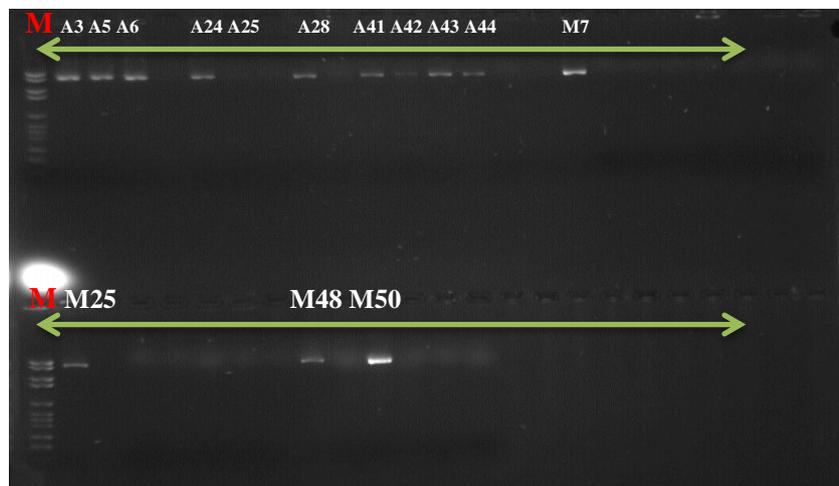


➤ Sérotype : II

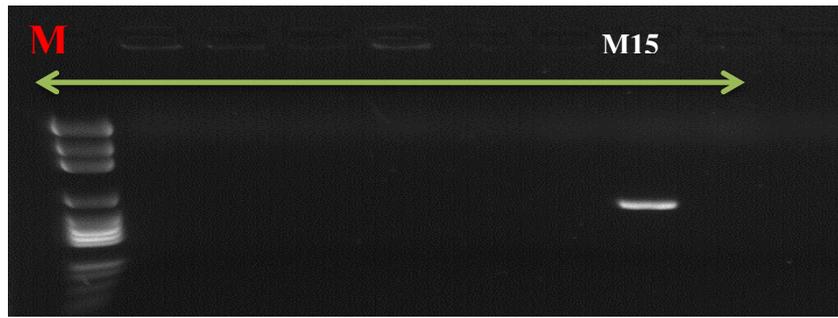




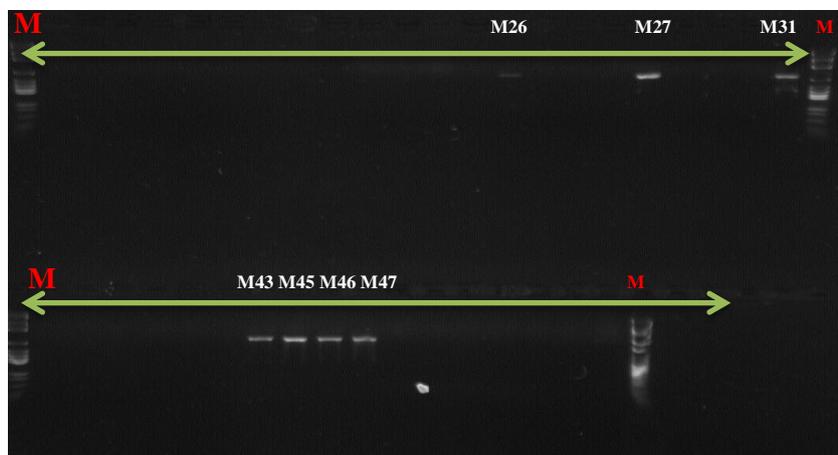
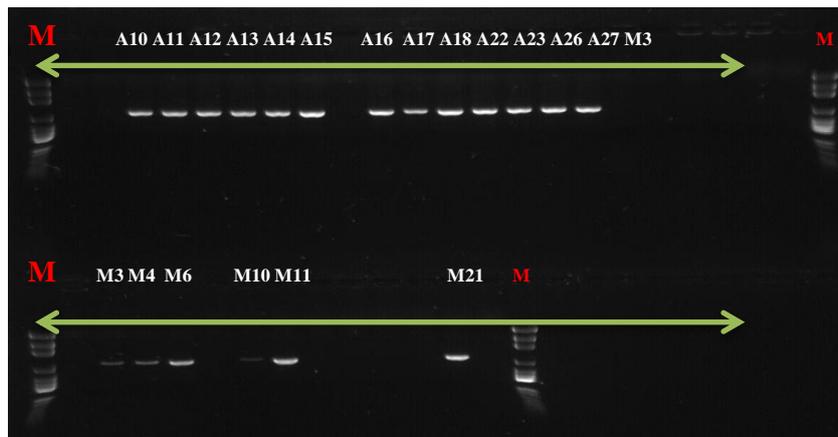
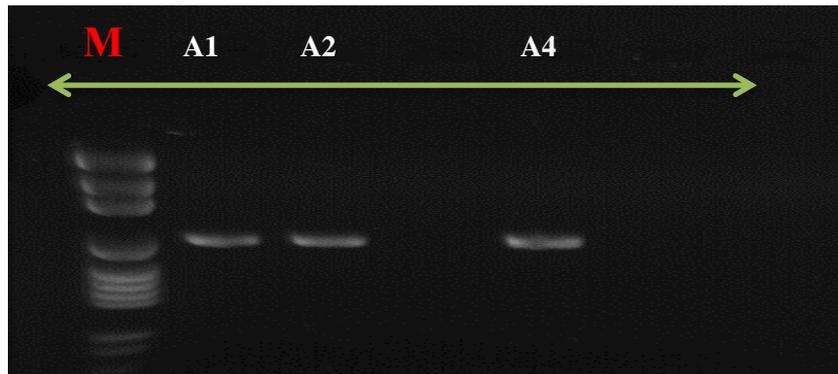
➤ Sérotype : III

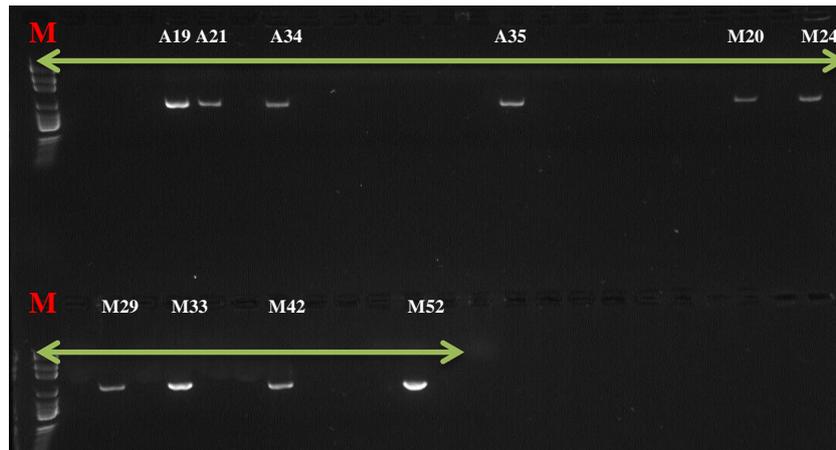


➤ Sérotype : IV

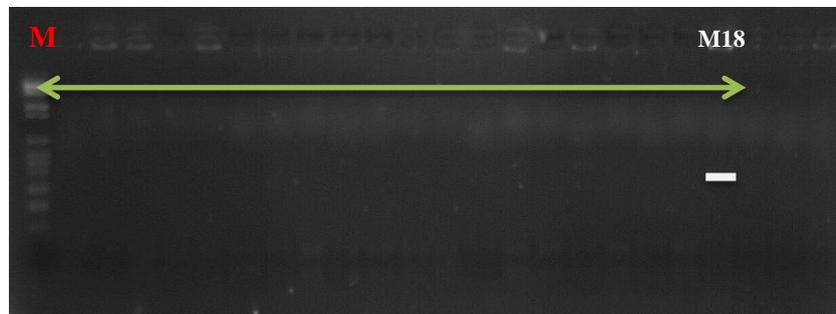


➤ Sérotype : V

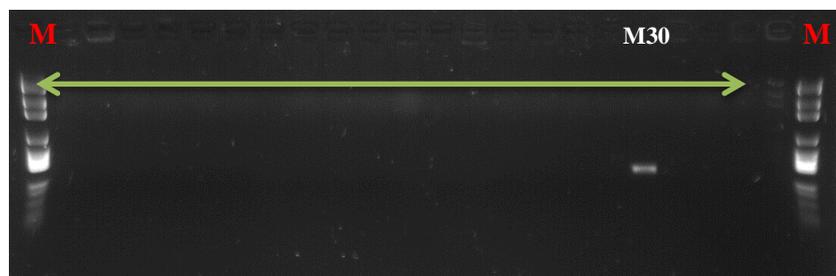




➤ Sérotype : VII



➤ Sérotype : VIII



Annexe 6. Caractéristiques phénotypiques et moléculaires des 44 souches de SGB isolées à Guelma en fonction des trimestres de la grossesse.

1 ^{er} T		2 ^{ème} T		3 ^{ème} T			
03-15 SA (n=4)		16-28 SA (n=21)		29-41 SA (n=7)		34-38 SA (n=12)	
A17	<i>mlsbc-Tet-V-686*-Sg</i>	A1	<i>tet-V-1-CC1</i>	A6	<i>Tet-III-19-CC19 (39SA)</i>	A2	<i>tet-V-1-CC1</i>
A20	<i>Tet-Ia-166-CC23</i>	A3	<i>tet-III-19-CC19</i>	A8	<i>tet-II-10-CC10</i>	A5	<i>tet-III-19-CC19</i>
A36	<i>Tet-V-521-CC19</i>	A4	<i>tet-V-1-CC1</i>	103	<i>mlsbc-Tet-V-460-CC1</i>	A12	<i>mlsbc-Tet-V-19-CC19</i>
A43	<i>mlsbi-Tet-III-19-CC19</i>	A7	<i>tet-II-10-CC10</i>	A13	<i>mlsbc-Tet-V-687*-CC19</i>	A16	<i>mlsbi-Tet-V-19-CC19</i>
		A9	<i>mlsbc-tet-II-19-CC19</i>	A18	<i>mlsbc-Tet-V-689*-CC1</i>	A21	<i>tet-V-1-CC1</i>
		A10	<i>mlsbc-Tet-V-19-CC19</i>	A30	<i>mlsbc-tet-II-1-CC1 (40SA)</i>	A31	<i>mlsbc-tet-II-1-CC1</i>
		A11	<i>mlsbi-Tet-V-233-CC19</i>	A35	<i>Tet-V-690*-CC10</i>	A32	<i>mlsbc-tet-II-1-CC1</i>
		A14	<i>mlsbi-Tet-V-685*-CC19</i>			A33	<i>tet-Ia-158-CC19</i>
		A15	<i>mlsbc-Tet-V-1-CC1</i>			A34	<i>tet-V-1-CC1</i>
		A19	<i>mlsbi-Tet-V-688*-Sg</i>			A40	<i>M-tet-II-241-CC19</i>
		A23	<i>Tet-V-19-CC19</i>			A41	<i>mlsbi-Tet-III-19-CC19</i>
		A24	<i>Tet-III-19-CC19</i>			A44	<i>mlsbc-tet-III-691-CC19</i>
		A25	<i>Tet-III-19-CC19</i>				
		A26	<i>tet-V-677-CC19</i>				
		A27	<i>Tet-V-19-CC19</i>				
		A28	<i>Tet-III-19-CC19</i>				
		A29	<i>tet-II-10-CC10</i>				
		A37	<i>tet-II-10-CC10</i>				
		A38	<i>tet-II-563-Sg</i>				
		366	<i>tet-II-569-CC10</i>				
		478	<i>mlsbc-tet-III-19-CC19</i>				

*Nouveau ST; T. Trimestre; Sg. Single ST; SA. Semaine d'aménorrhée.

Annexe 7. Article

Article publié

Molecular epidemiology and distribution of serotypes, genotypes, and antibiotic resistance genes of *Streptococcus agalactiae* clinical isolates from Guelma, Algeria, and Marseille, France.

Amira Bergal, Lotfi Loucif, Djamel Eddine Benouareth, Ahmed Aimen Bentorki, Cédric Abat and Jean-Marc Rolain.

Nom du journal: European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.

Pays de journal: Allemagne

Impact factor: 2.668 (2014)

Editor-in-Chief: Alex Van Belkum

ISSN: 0934-9723 (print version)

ISSN: 1435-4373 (electronic version)

Journal no. 10096