

# UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Ecole doctorale Gc2iD

**Thèse pour obtenir le grade de  
Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé  
Spécialité : Microbiologie**

Présentée et soutenue publiquement le 15 Novembre 2013

Par Céline PLAINVERT

**Etude de la biodiversité des souches de  
*Streptococcus pyogenes* responsables d'infections  
invasives et de cas groupés par une approche de  
génomique comparative**

*Devant le JURY composé de*

Pr François VANDENESCH  
Dr Agnès FOUET  
Pr Claire POYART  
Dr Chantal LE BOUGUENEC  
Pr Stéphane BONACORSI  
Pr Anne COLLIGNON  
Dr Isabelle PODGLAJEN

*Président du Jury et rapporteur  
Co-directeur de thèse  
Co-directeur de thèse  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Membre invité*

En essayant continuellement On finit par réussir.  
Donc : plus ça rate, plus on a de chances que ça marche.

**Devise des Shadoks**

J'adresse mes sincères remerciements à

Monsieur le Professeur François Vandenesch qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse et qui a accepté d'être le rapporteur de ce mémoire de thèse,

Madame le Docteur Agnès Fouet pour avoir accepté de diriger mes travaux de thèse, pour sa rigueur, sa disponibilité et ses encouragements,

Madame le Professeur, Claire Poyart pour avoir accepté de me prendre au sein de son équipe et de diriger mes travaux de thèse ainsi que pour l'espace de liberté qu'elle m'a accordé dans la gestion de mon emploi du temps,

Madame le Docteur Chantal Le Bouguéneq qui me fait l'honneur de participer à ce jury et qui a accepté d'être le rapporteur de ce mémoire de thèse,

Monsieur le Professeur Stéphane Bonacorsi, Madame le Professeur Anne Collignon et Madame le Docteur Isabelle Podglajen qui me font l'honneur de participer à ce jury,

Monsieur le Docteur Philippe Glaser et Madame le Docteur Isabelle Rosinski-Chupin pour leur précieuse collaboration au cours de ce travail,

Madame le Docteur Isabelle Tardieux pour son aide et ses conseils,

Madame le Professeur Anne Bouvet pour m'avoir témoigné sa confiance en me permettant d'intégrer cette équipe de recherche,

Enfin j'ai une pensée émue pour Monsieur le Professeur Edouard Bingen qui a m'a toujours soutenue et encouragée depuis mon DEA.

Je remercie tout le personnel des laboratoires de Microbiologie de l'Hôtel-Dieu et de Bactériologie de l'hôpital Cochin pour m'avoir soutenue durant ce travail. En particulier, je tiens à remercier Malik Al Nakib, Nadjat Benhaddou, Anne Casetta, Sophie Coignard, Naïma Dahane, Alexandra Doloy, Julien Loubinoux, Philippe Morand, Hélène Poupet, Josette

Raymond, Sébastien Spinali et Asmaa Tazi de m'avoir permis de m'échapper à la fac afin de réaliser ce travail.

Je remercie tout particulièrement Julien pour son aide, son écoute et ses conseils dans de nombreux domaines.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe BM/CNR : Annick Billoët, Gislène Collobert, Nicolas Dmytruk, Nicole Tavarès et Gérald Touak pour leur aide, leur bonne humeur et leur grande disponibilité.

Je remercie tous les membres de l'équipe « Barrières et pathogènes » Abdel, Anne, Magalie, Samuel, Vanessa et Virginie et celles qui sont parties : Asmaa, Claire, Liliana, mon binôme Márcia et Sophie. Je tiens à les remercier pour leurs conseils et pour la patience dont ils ont fait preuve afin de supporter mon caractère breton mais aussi pour tous les bons moments passés, et à venir, partagés ensemble.

Je remercie bien évidemment Carole et Pierre, Jo, Bruno, Yann et Anna, Cédric, Mickaël et Sonia pour leur écoute, leurs encouragements et les (trop rares) moments de détente partagés pendant la rédaction de ce mémoire. Je remercie également tous ceux qui ont fait preuve d'indulgence à mon égard lorsque je n'ai pas pu honorer leur invitation pour cause de thèse.

Je remercie très sincèrement ma famille : mes grands-parents, Hélène et Nicholas, Marianne et Alexander, Jules, Marie et Jean Mich, Nono et Davy, pour leur gentillesse et leur soutien sans faille mais aussi pour les nombreuses raisons qui font que je suis très heureuse d'être si proche d'eux.

Je remercie infiniment Jean qui m'a laissé installer mon bureau dans le salon, la chambre et finalement aussi dans la cuisine. Un grand merci pour ta compréhension, ta sérénité et ta capacité à relativiser.

Je dédie ce travail à mes parents en les remerciant pour les valeurs et l'amour qu'ils m'ont transmis.

## Résumé

*Streptococcus pyogenes* (Streptocoque du Groupe A (SGA)) est un germe humain responsable d'un large éventail de pathologies invasives et non-invasives, mais aucun attribut génétique ne rend compte à lui seul de cette diversité. Notre objectif a été de rechercher des liens entre génotype, présence de gènes de virulence et caractère invasif des souches par une approche d'épidémiologie moléculaire.

Une association entre génotypes et présence de certains gènes de virulence a été établie sur une collection de souches françaises de SGA responsables d'infections invasives chez des adultes. De même, la présence du locus *sil*, codant un système de quorum-sensing, est liée au génotype des souches, mais non à leur caractère invasif.

Concernant la réponse immunitaire innée, contrairement aux souches *emm1*, *emm4* et *emm28*, les souches invasives *emm3* et *emm89* sont plus phagocytées par les macrophages que leurs homologues non-invasives. Les souches *emm89* sont plus phagocytées et survivent plus longtemps dans les macrophages que les souches des autres génotypes. Par ailleurs, les souches *emm3* induisent l'apoptose des macrophages. Enfin, la cinétique de production des médiateurs pro et anti-inflammatoires est dépendante du génotype.

La souche de colonisation d'un cas groupé, incluant aussi une souche invasive, présente une mutation originale dans *covS* (codant le senseur d'un système de régulation à deux composants). La protéine CovSY39H répond peu aux signaux de l'environnement, correspondant à une protéine CovS constitutive. Le phénotype de ce mutant, résultant de l'expression de certains gènes de virulence, est favorable à la colonisation. Sa survie dans les macrophages et sa virulence sont altérées.

### Mots-clés

*Streptococcus pyogenes*, pathogénicité, infection invasive, colonisation, facteurs de virulence, épidémiologie moléculaire, système de régulation à deux composants.

---

Mlle Céline PLAINVERT

INSERM, Institut Cochin, Département 3I, Equipe « Barrières et Pathogènes »

22 rue Méchain, 75014 Paris

## Abstract

*Streptococcus pyogenes* (Group A *Streptococcus* (GAS)) is a human pathogen responsible for a wide range of diseases including non-invasive and invasive infections. To date no specific GAS attribute has been associated with a type of infection although a link between genetic background and tissue tropism has been demonstrated. Our objective was to investigate the relationship between genotype, the presence of genes encoding virulence factors and invasive strains by molecular epidemiology approach.

An association between genotypes and the presence of genes encoding virulence factors has been established among a collection of French strains responsible for invasive GAS infections in adults. Similarly, the presence of *sil* locus, encoding a quorum sensing system, is related to genotype, but not to the invasive status of the GAS strains.

Regarding the innate immune response, unlike *emm1*, *emm4* and *emm28* strains, invasive *emm3* and *emm89* strains are more phagocytosed by macrophages than their non-invasive counterparts. The *emm89* strains are phagocytosed and survive longer in macrophages than strains belonging to any other genotype. Moreover, *emm3* strains induce macrophage apoptosis. Finally, the kinetics of production of pro- and anti-inflammatory mediators are genotype-dependent.

A colonization strain belonging to a cluster that also includes an invasive strain, has a unique mutation in *covS* (encoding the sensor of a two-component system). The CovSY39H protein responds less to some environmental signals, corresponding to a constitutive CovS protein. The phenotype of the mutant, resulting in the expression of certain genes encoding virulence factors, favors a colonization state. Survival in macrophages and virulence are also altered.

### Keywords

*Streptococcus pyogenes*, pathogenicity, invasive infection, colonization, virulence factors, molecular epidemiology, regulatory two-component system.

# Table des matières

<i>Avant-propos</i> .....	14
<i>Revue bibliographique : physiopathologie des infections à S. pyogenes</i> .....	16
<b>1. Aspects microbiologies, cliniques et épidémiologiques des infections à S. pyogenes ...</b>	<b>17</b>
1.1. Contexte historique.....	17
1.2. Caractéristiques microbiologiques .....	17
1.2.1 Le genre <i>Streptococcus</i> .....	17
1.2.2 Caractères d'identification de <i>S. pyogenes</i> .....	18
1.3. Caractéristiques génétiques de <i>S. pyogenes</i> .....	19
1.3.1 Typage intra spécifique .....	20
1.3.2 Variabilité des génomes de <i>S. pyogenes</i> .....	25
1.4. Epidémiologie des infections à <i>S. pyogenes</i> .....	26
1.4.1 Facteurs de risques sociétares d'infection à <i>S. pyogenes</i> .....	26
1.4.2 Infections invasives à <i>S. pyogenes</i> .....	27
1.4.3 Infections non invasives à <i>S. pyogenes</i> .....	31
1.4.3 Séquelles post-streptococciques.....	31
1.4.4 Colonisation asymptomatique .....	33
1.5. Traitement et prévention.....	33
1.5.1 Traitement curatif.....	33
1.5.2 Traitement préventif.....	36
1.5.3 Epidémiologie de la résistance de <i>S. pyogenes</i> .....	39
<b>2. Facteurs de virulence impliqués dans la physiopathologie des infections à S. pyogenes</b> .....	<b>42</b>
2.1. Adhésion cellulaire.....	46
2.2. Colonisation.....	48
2.3. Internalisation.....	49

2.4.	Echappement au système immunitaire inné .....	51
2.4.1	<i>Inhibition du recrutement des polynucléaires neutrophiles (PNN)</i> .....	51
2.4.2	<i>Barrières physiques inhibant la phagocytose</i> .....	52
2.4.3	<i>Altération de l'opsonisation</i> .....	53
2.4.4	<i>Lyse des PNN</i> .....	55
2.4.5	<i>Survie dans les PNN</i> .....	55
2.5.	Transition infection locale – infection invasive .....	57
2.6.	Dissémination .....	58
2.6.1	<i>Domages tissulaires</i> .....	58
2.6.2	<i>Réaction inflammatoire</i> .....	59
2.7.	Séquelles post-streptococciques .....	62
2.7.1	<i>Rhumatisme articulaire aigu</i> .....	62
2.7.2	<i>Glomérulonéphrite aigüe</i> .....	63
2.8.	Facteurs d'hôte .....	64
<b>3.</b>	<b>Adaptation de <i>S. pyogenes</i> à son environnement, conséquences sur sa virulence .....</b>	<b>66</b>
3.1.	Le système CovR/CovS.....	66
3.1.1	<i>Le régulon</i> .....	67
3.1.2	<i>Mécanisme d'action</i> .....	68
3.1.3	<i>Mutation dans le système CovR/CovS in vivo</i> .....	73
3.2.	Rôle du « quorum sensing » dans la virulence de <i>S. pyogenes</i> .....	76
	<b><i>Contexte et objectifs des travaux</i>.....</b>	<b>78</b>
	<b><i>Résultats expérimentaux</i> .....</b>	<b>80</b>
<b>1.</b>	<b>Epidémiologie des infections invasives à <i>S. pyogenes</i> de l'adulte survenues en France entre 2006 et 2010 : article I, annexe I .....</b>	<b>81</b>
<b>2.</b>	<b>La réponse immunitaire innée induite par <i>S. pyogenes</i> est variable selon les souches cliniques mais reste corrélée au génotype <i>emm</i> : article II, annexe II .....</b>	<b>92</b>
<b>3.</b>	<b>La présence du locus <i>sil</i> est corrélée au génotype <i>emm</i> des souches cliniques de <i>S. pyogenes</i> mais pas à leur caractère invasif : article III, annexe III.....</b>	<b>103</b>



<b>4. Une nouvelle mutation dans <i>covS</i> favorise le phénotype de colonisation chez <i>S. pyogenes</i> : article IV, annexe IV .....</b>	<b>112</b>
<b><i>Discussion et perspectives</i> .....</b>	<b>126</b>
<b><i>Références bibliographiques</i> .....</b>	<b>136</b>
<b><i>Annexes</i> .....</b>	<b>172</b>

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ALAT	Alanine amino transférase
ASAT	Aspartate amino transférase
ATP	Adénosine triphosphate
BPCO	Broncho-pneumopathie chronique obstructive
C-terminal	Carboxy-terminal
CDC	Center for disease control and prevention
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
CNR-Strep	Centre national de référence des streptocoques
CRP	Protéine C réactive
DHN	Dermo-hypodermite nécrosante
ECG	Electrocardiogramme
FCT	Fibronectin, collagen-binding T-antigen
GNA	Glomérulonéphrite aiguë
ICE	Integrated conjugative element
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
InVS	Institut national de veille sanitaire
IV	Intra-veineuse
LTA	Acide lipotéichoïque
MLS <sub>B</sub>	Macrolides, lincosamides et streptogramine B
MLST	Multi locus sequence typing
N	Valeur normale
NET	Pièges neutrophiles extracellulaires
N-terminal	Amino-terminal
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
PLP	Protéines liant la pénicilline
PNN	Polynucléaires neutrophiles
QRDR	Quinolone resistance-determining region
qRT-PCR	PCR quantitative en temps réel
QS	Quorum sensing
RAA	Rhumatisme articulaire aigu
SCTS	Syndrome de choc toxique streptococcique
SEM	Standard error of the mean
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOF	Serum opacity factor
TCS	Système de régulation transcriptionnelle à deux composants
THY	Todd Hewitt yeast
UFC	Unité formant colonie
VS	Vitesse de sédimentation
WT	Wild type

# Table des illustrations

## Liste des figures

Figure 1. Morphologie de <i>S. pyogenes</i> .....	19
Figure 2. Caractéristiques de la structure de la protéine M6.....	21
Figure 3. Représentation schématique des différents types de protéines M de <i>S. pyogenes</i> .....	22
Figure 4. Organisation des gènes au sein des 9 loci FCT différents chez <i>S. pyogenes</i> .....	24
Figure 5. Incidence des infections invasives à <i>S. pyogenes</i> pour 100 000 habitants, 1991-2011, en France métropolitaine selon Epibac.....	30
Figure 6. Phénotypes de résistances de <i>S. pyogenes</i> aux macrolides et apparentés .....	40
Figure 7. Adhésion de <i>S. pyogenes</i> à une cellule épithéliale pharyngée .....	51
Figure 8. Echappement au système immunitaire inné par <i>S. pyogenes</i> .....	57
Figure 9. Interaction d'un super-antigène de <i>S. pyogenes</i> avec le CMH II d'une cellule présentatrice de l'antigène et le récepteur des lymphocytes T .....	61
Figure 10. Représentation schématique des épitopes croisant avec la myosine, les tissus articulaire et cérébral et les membranes sarcolemmes au sein des différentes régions répétées de la protéine M5 .....	63
Figure 11. Représentation schématique d'un TCS classique .....	67
Figure 12. Sites de fixation de CovR sur les régions promotrices de <i>ska</i> , <i>has</i> , <i>sagA</i> et <i>cov</i> et conséquences sur la transcription .....	70
Figure 13. Représentation schématique du système CovR/CovS .....	72
Figure 14. Représentation schématique de CovS .....	73
Figure 15. Caractéristiques démographiques des souches invasives de <i>S. pyogenes</i> isolées chez l'adulte entre 2006 et 2010.....	82
Figure 16. Fréquence des principaux génotypes <i>emm</i> responsables d'infections invasives adultes entre 2006 et 2010.....	86
Figure 17. Caractérisation moléculaire des combinaisons de gènes de super-antigènes en fonction du génotype <i>emm</i> .....	89
Figure 18. Phagocytose et survie dans les macrophages des souches cliniques de <i>S. pyogenes</i> ...	97
Figure 19. Les souches des <i>S. pyogenes emm3</i> compromettent les BMDMs .....	98
Figure 20. La viabilité des BMDMs est affectée par les souches de <i>S. pyogenes emm3</i> .....	99

Figure 21. Les souches de <i>S. pyogenes emm3</i> induisent l'apoptose des BMDMs.....	100
Figure 22. Les souches de <i>S. pyogenes</i> induisent la production des médiateurs immunitaires par les BMDMs infectés.....	102
Figure 23. Apparition de mutation dans <i>silC</i> et <i>silCR</i> .....	110
Figure 24. Apparition de mutation dans <i>silD</i> .....	111
Figure 25. Alignement des 50 premiers acides aminés des protéines CovS prédites pour les souches des cas groupés 1 et 2 .....	113
Figure 26. La croissance de CovS1, contrairement à celle de CovS2, est affectée en THY mais restaurée après addition de plasma humain ou de MgCl <sub>2</sub> .....	115
Figure 27. La mutation Y39H dans <i>covS</i> n'affecte pas l'accumulation de SpeB ni d'acide hyaluronique capsulaire.....	117
Figure 28. CovS2 présente un profil de transcriptome atypique et répond mal aux signaux environnementaux .....	120
Figure 29. CovS2 accumule plus de SpeB et répond moins aux facteurs environnementaux que WT2.....	122
Figure 30. La capacité de survie de CovS2 est affaiblie .....	123
Figure 31. CovS2 est moins virulente que WT2 dans un modèle murin d'infection invasive....	125

## Liste des tableaux

Tableau I. Corrélation entre le typage moléculaire des souches de <i>S. pyogenes</i> et le tropisme tissulaire.....	25
Tableau II. Facteurs prédisposant à une infection invasive à <i>S. pyogenes</i> .....	27
Tableau III. Définition du syndrome de choc toxique streptococcique..	28
Tableau IV. Critères de Jones modifiés.....	32
Tableau V. Traitement antibiotique curatif des angines à <i>S. pyogenes</i> .....	34
Tableau VI. Schémas d'antibioprophylaxie des infections invasives communautaires à <i>S. pyogenes</i> . .....	37
Tableau VII. Prophylaxie secondaire du RAA.....	37
Tableau VIII. Principaux facteurs de virulence impliqués dans la pathogénie de <i>S. pyogenes</i> ....	43
Tableau IX. Manifestations cliniques des souches invasives adultes de <i>S. pyogenes</i> selon le genre et la tranche d'âges .....	83
Tableau X. Corrélation entre les manifestations cliniques et les 17 génotypes <i>emm</i> les plus fréquents .....	87
Tableau XI. Résistance aux macrolides et apparentés et à la tétracycline en fonction du génotype <i>emm</i> .....	91
Tableau XII. Caractérisation moléculaire des 60 souches de <i>S. pyogenes</i> .....	94
Tableau XIII. Caractéristiques cliniques des 637souches de <i>S. pyogenes</i> et prévalence du locus <i>sil</i> .....	106
Tableau XIV. Prévalence du locus <i>sil</i> et d'un locus <i>sil</i> fonctionnel présumé parmi les 87 génotypes <i>emm</i> différents selon le caractère invasif des 637souches de <i>S. pyogenes</i> .....	107
Tableau XV. Souches cliniques de <i>S. pyogenes</i> étudiées.....	113
Tableau XVI. WT2 et CovS2 adhèrent de façon similaire à différentes lignées cellulaires épithéliales.....	123

## **Avant-propos**

---

## Avant-propos

*Streptococcus pyogenes* ou streptocoque du groupe A est un pathogène humain dont les réservoirs naturels sont constitués par le pharynx et la peau. *S. pyogenes* est responsable d'un large éventail de manifestations cliniques allant de l'angine banale à des infections invasives sévères au cours desquelles le pronostic vital peut être engagé. Afin d'assurer toute l'étendue de ces manifestations cliniques *S. pyogenes* dispose d'un vaste panel de facteurs de virulence. Cependant à ce jour, la présence d'aucun facteur de virulence à elle seule ne peut expliquer cette variabilité clinique. Tout au plus, une corrélation entre la présence d'un type de protéine de surface et un tropisme tissulaire a été montrée. L'amélioration des connaissances relatives à l'épidémiologie des facteurs de virulence de *S. pyogenes* revêt toute son importance dans le cadre de l'élaboration de nouvelles stratégies diagnostiques ou d'outils pour le traitement et la prévention et notamment vaccinales. La première partie de cette introduction est consacrée à une revue bibliographique abordant les données microbiologiques, épidémiologiques et cliniques des infections à *S. pyogenes*. La deuxième partie de cette introduction porte sur les connaissances actuelles relatives aux principaux facteurs de virulence de *S. pyogenes* impliqués dans les différentes étapes successives du processus infectieux. Le dernier chapitre aborde la régulation par un système à deux composants et par un système de «quorum sensing» des gènes codant les principaux facteurs de virulence de *S. pyogenes*.

**Revue bibliographique**  
**Physiopathologie des infections à *S. pyogenes***

---



# Physiopathologie des infections à *S. pyogenes*

## 1. Aspects microbiologiques, cliniques et épidémiologiques des infections à *S. pyogenes*

### 1.1. Contexte historique

Le nom *Streptococcus* a été attribué pour la première fois en 1877 par Bilot et Ehrlich à des bactéries coccoïdes observées dans des blessures surinfectées (216). Ce terme a été proposé en relation avec la terminologie grecque *streptus* ; flexible et *coccus* ; grain. Un cocci similaire a été décrit en 1883 par Fehleisen comme agent de l'érysipèle. Finalement Rosenbach attribua le nom de *Streptococcus pyogenes* à des cocci regroupés en chaînettes isolées de lésions suppuratives humaines. Par la suite, Rebecca Lancefield s'attacha à typer, par des méthodes sérologiques, les souches de *Streptococcus* et en particulier les souches de *S. pyogenes*.

### 1.2. Caractéristiques microbiologiques

*S. pyogenes* appartient à la famille des *Streptococcaceae* regroupant les genres *Lactococcus*, *Lactovum* et *Streptococcus*. Ces genres partagent les caractéristiques suivantes : cocci à Gram positif, asporulé, aéro-anaérobie facultatif et absence de catalase.

#### 1.2.1 Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* regroupe 102 espèces et 17 sous-espèces commensales ou pathogènes de l'homme et des animaux. Les streptocoques sont des cocci à Gram positif regroupés en diplocoques ou en chaînettes de longueur variable et dépourvus de cytochrome. De plus, la présence d'une capsule est observée chez certaines espèces. Les streptocoques étant exigeants en vitamines et en acides aminés, leur culture se fait sur milieux usuels enrichis à hauteur de 5% en sang de mouton ou de cheval. Leur multiplication est favorisée en

présence de CO<sub>2</sub> ou en atmosphère anaérobie. Leur fermentation des glucides est homofermentaire conduisant à la production d'acide lactique sans formation de gaz.

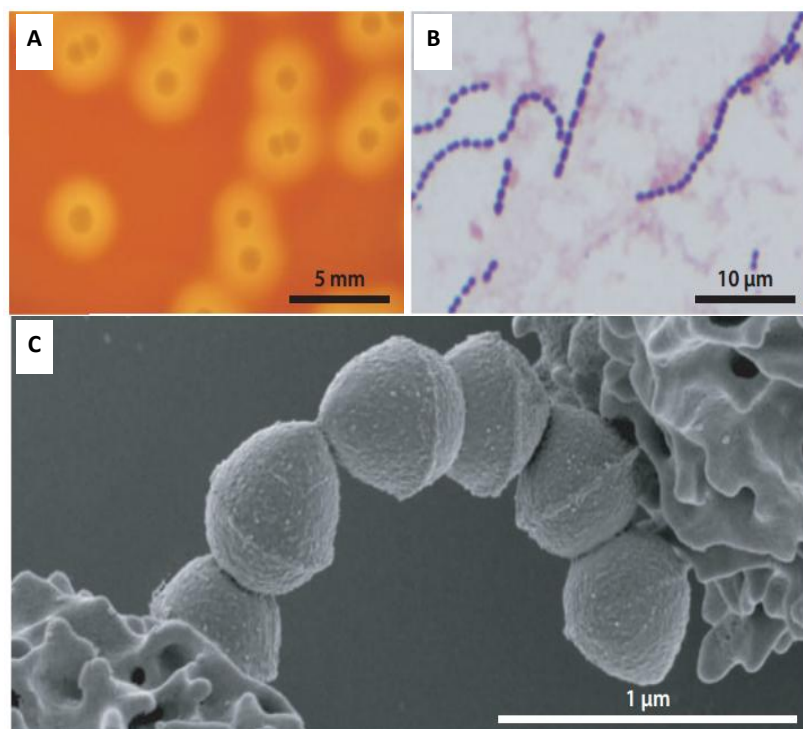
Les streptocoques sont des bactéries à bas G+C% dont la classification est en constante évolution. Celle utilisée en bactériologie médicale repose sur le caractère hémolytique des différentes espèces. La culture des streptocoques sur gélose enrichie à 5% en sang de mouton ou de cheval permet d'observer le type d'hémolyse ; bêta ou complète avec éclaircissement de la gélose autour de la colonie, alpha ou incomplète avec une coloration verdâtre de la gélose autour de la colonie et enfin l'absence d'hémolyse. Cette propriété permet de distinguer les streptocoques bêta-hémolytiques et alpha-hémolytiques des streptocoques non hémolytiques. Par ailleurs, l'utilisation d'immuns sérums de lapin par Rebecca Lancefield a permis de mettre en évidence la présence du polysaccharide C immunogène ou d'acides lipotéichoïques spécifiques dans la paroi de nombreux streptocoques, différenciant 19 marqueurs antigéniques (A-H, K-P, R-V) (271). La combinaison de ces deux propriétés (type d'hémolyse et groupe sérologique de Lancefield) permet de distinguer les streptocoques pyogènes (streptocoques bêta-hémolytiques des groupes A, B, C, G), les streptocoques oraux et les streptocoques du groupe D (commensaux du tube digestif).

### **1.2.2 Caractères d'identification de *S. pyogenes***

Après 18 heures d'incubation sur gélose au sang, les colonies de *S. pyogenes* apparaissent sphériques, bombées, transparentes ou translucides avec un pourtour bien défini. Ces colonies ont un diamètre d'environ 0,5 mm et sont entourées d'une large hémolyse bêta dont le diamètre est 2 à 4 fois supérieur à celui de la colonie (Figure 1A). A la coloration de Gram, *S. pyogenes* apparaît sous forme de cocci sphériques de diamètre inférieur à 2µm, regroupés en chaînette pouvant évoquer « un collier de perles », immobiles et asporulés (Figure 1B).

L'identification microbiologique associe la mise en évidence des caractéristiques de la famille des *Streptococcaceae* et de l'antigène du groupe A de Lancefield grâce à des particules de latex sensibilisées avec des immunoglobulines spécifiques. Cette identification est complétée par la mise en évidence de la pyrrolidonyl-arylamidase, absente des espèces *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *Streptococcus anginosus* et *Streptococcus constellatus* qui occasionnellement présentent un antigène du groupe A de Lancefield. Ce test consiste en l'hydrolyse du L-pyrrolidonyl-béta-naphtylamide libérant la bêta-naphtylamine

qui peut être détectée par du N,N-diméthylaminocinnamaldéhyde. Ces réactifs sont commercialisés sous forme de kits. Enfin, la sensibilité à la bacitracine, autrefois utilisée, ne peut plus être considérée comme un test de confirmation de l'espèce *S. pyogenes*, depuis la mise en évidence de souches résistantes (319).



**Figure 1. Morphologie de *S. pyogenes*.**

(A) Isolement sur gélose Columbia additionnée de sang de mouton défibriné. (B) Coloration de Gram de *S. pyogenes* isolé de sang humain. (C) Chaînette de *S. pyogenes* interagissant avec des polynucléaires neutrophiles humains par microscopie électronique à balayage. D'après (367).

### 1.3. Caractéristiques génétiques de *S. pyogenes*

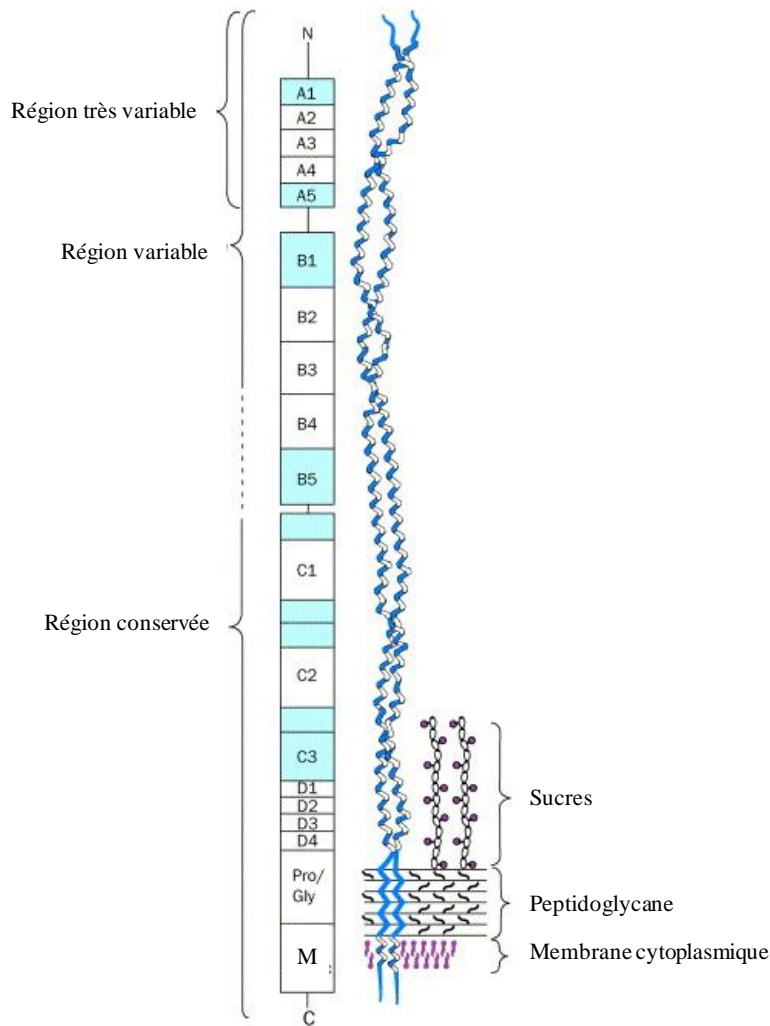
Le réservoir de *S. pyogenes* étant constitué par le pharynx et la peau, la transmission interhumaine s'effectue par l'intermédiaire de gouttelettes de salive générées par la toux, les éternuements ou la parole ou par contact direct avec les lésions cutanées. Ce mode de transmission favorise la dissémination de *S. pyogenes* dans la population sur un mode épidémique. Dès lors, le typage des souches de *S. pyogenes* revêt toute son importance afin d'identifier l'origine d'une épidémie pour pouvoir l'endiguer. Par ailleurs, les données épidémiologiques constituent une information indispensable pour le développement d'une

stratégie vaccinale. Initialement, le typage des souches de *S. pyogenes* reposait sur les propriétés antigéniques de différents composants présents dans la paroi de *S. pyogenes*. Désormais, le typage des souches de *S. pyogenes* consiste à détecter, par des techniques moléculaires, les gènes codant les protéines initialement détectées par des techniques sérologiques voire à séquencer le génome complet.

### **1.3.1 Typage intra spécifique**

#### **1.3.1.1 La protéine M**

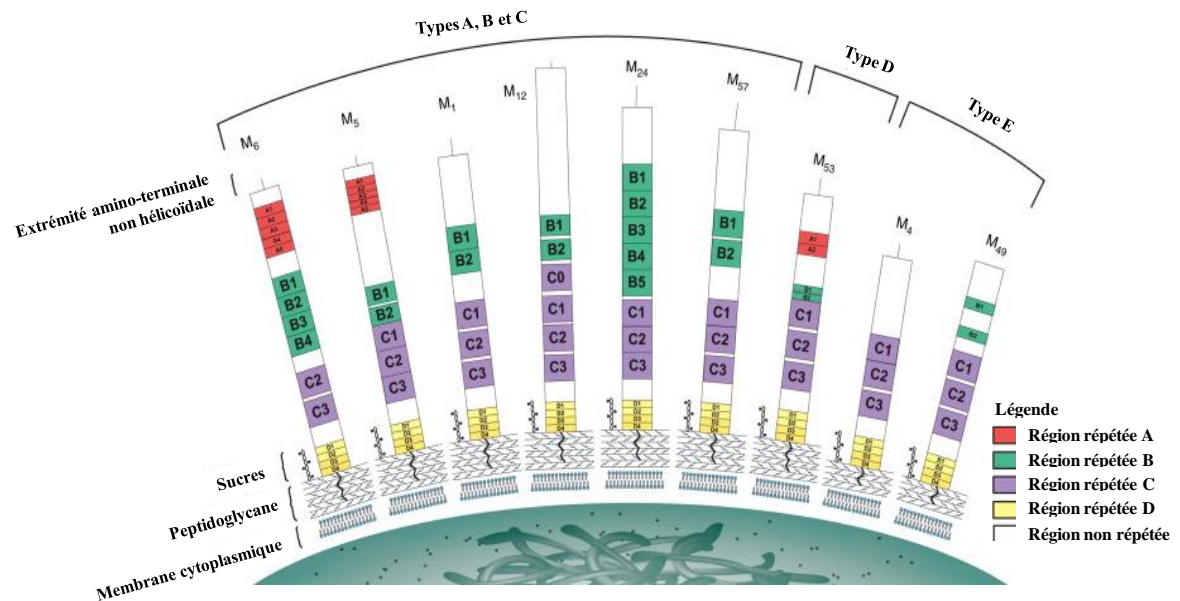
La protéine M de surface, facteur de virulence majeur, est constituée de deux chaînes polypeptidiques enroulées en hélice alpha dont l'extrémité N-terminale présente une grande diversité antigénique (154, 155) (Figure 2). La protéine M est ancrée au peptidoglycane et apparaît sous forme de fibrilles à la surface des bactéries (157, 340). Chaque homodimère est constitué de quatre régions répétées (A à D) qui diffèrent par leur taille et leur séquence en acides aminés (Figure 2). En revanche, l'extrémité carboxy-terminale constituée d'un domaine transmembranaire hydrophobe riche en proline et en glycine est conservée. Les régions répétées C et D, qui extrudent de la paroi bactérienne, sont hautement conservées alors que la région répétée B, est considérée comme une région semi-variable. Enfin la région répétée A amino-terminale, lorsqu'elle est présente, est très variable et constitue la spécificité antigénique de la protéine M (154, 155). L'extrémité amino-terminale est de structure non hélicoïdale et de longueur inégale selon les différents types de protéine M.



### Figure 2. Caractéristiques de la structure de la protéine M6.

Les lettres A, B, C, et D désignent l'emplacement des 4 régions répétées. Chaque chiffre associé à une lettre correspond à un numéro de sous-unité. Chaque sous-unité A, B, C1, C2 et D est constituée respectivement de 14, 25, 42 et 7 acides aminés. La sous-unité C3 est constituée de 21 acides aminés. Pro / Gly représente la région riche en proline et en glycine située dans le peptidoglycane. M représente la région transmembranaire ancrée dans la membrane cytoplasmique, avant l'étape de maturation, riche en acides aminés hydrophobes. Sont matérialisées en bleu les régions les plus variables au sein des 4 régions répétées. D'après (55, 155).

Les variations de taille et de séquence en acides aminés au sein des quatre régions répétées de la protéine M, permettent de distinguer les différents types de protéine M. Chaque protéine M est donc caractérisée par sa taille et sa structure (156, 438). La comparaison des différentes protéines M a permis de les répartir en cinq types A, B, C, D et E (Figure 3) (439).



**Figure 3. Représentation schématique des différents types de protéines M de *S. pyogenes*.**

Organisation générale des 9 types de protéines M décrits. Les types A, B et C regroupent les protéines M les plus longues, en moyenne 444 acides aminés, dont les protéines M6, M5, M1, M12, M24 et M57. Le type D représenté par la protéine M53 est de taille intermédiaire avec 355 acides aminés. Le type E regroupe, entre autres, les protéines M4 et M49 les plus courtes, en moyenne 316 acides aminés. D'après (439).

Le type E se différencie des types A, B, C et D par un domaine transmembranaire plus court (29 acides aminés pour 48), cette particularité restant inexplicée (188). Une région répétée C est présente parmi l'ensemble des types de protéines M mais le nombre de sous-unités varie entre deux sous-unités pour la protéine M6 et quatre pour la protéine M12. Une région répétée B est également présente parmi l'ensemble des motifs de protéines M à l'exception de la protéine M4, le nombre de sous-unités étant très variable. Enfin, la région répétée A n'est retrouvée que dans les protéines M6, M5 et M53 avec une taille et un nombre de sous-unités très inégaux.

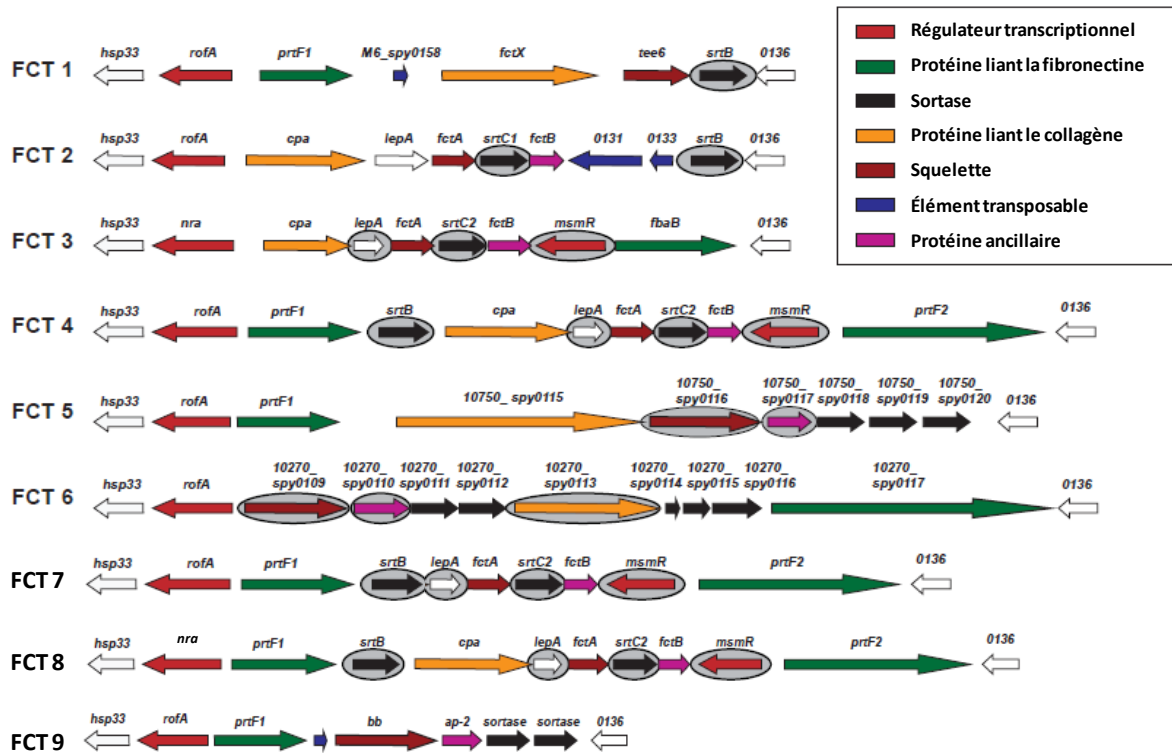
Les anticorps dirigés contre l'extrémité amino-terminale de la protéine M étant spécifiques, cette propriété a permis à Rebecca Lancefield de développer le sérotypage de l'espèce *S. pyogenes* au sein de laquelle 93 sérotypes différents ont été identifiés (144, 230, 268, 269). Ce sérotypage constituait l'outil de référence pour l'épidémiologie des souches de *S. pyogenes*. Désormais, cette technique par agglutination tend à être remplacée par le typage moléculaire du gène *emm* codant la protéine M (25). Ce génotypage consiste à amplifier

l'extrémité 5' variable du gène *emm* puis à la séquencer pour la comparer à la banque de données des séquences de référence du Center for Disease Control and Prevention (CDC) aux Etats Unis (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>). Cette technique moléculaire a permis d'identifier plus de 225 génotypes *emm* différents et constitue le marqueur épidémiologique de référence pour *S. pyogenes* (280). Ainsi plusieurs études épidémiologiques ont permis d'établir une association entre le type de pathologie et le génotype des souches de *S. pyogenes* ; les génotypes *emm1* et *emm3* étant plutôt associés aux dermo-hypodermes nécrosantes (DHN) et syndromes de chocs toxiques streptococciques (SCTS) et le génotype *emm28* aux infections du post-partum (81, 289, 354, 384, 455, 519).

Il est à noter que la plupart des souches de *S. pyogenes* possèdent un gène *emm* codant une protéine M. Cependant, chez certaines souches le gène *emm* appartient à l'opéron *mrp*, *emm*, *enn* codant respectivement les protéines Mrp (M-related protein), Emm et Enn. La protéine Emm est plus couramment dénommée protéine M, par extension, sans distinction du type de gène *emm* (93).

#### 1.3.1.2 L'antigène T

Le sérotypage de l'antigène T présent à la surface de *S. pyogenes* a été développé par Rebecca Lancefield (272). Il permet en association avec le sérotypage M, d'apprécier la diversité des souches de *S. pyogenes*. Récemment il a été montré que cet antigène T est un constituant d'un appendice de type pilus dont la structure et l'organisation exactes ne sont pas connues. Les gènes de structure du pilus sont regroupés sur le chromosome au sein d'un même locus dénommé FCT (fibronectin, collagen-binding T-antigen) (329). L'analyse des génomes de *S. pyogenes* disponibles dans les bases de données a permis d'identifier 9 loci FCT différents partageant néanmoins une organisation des gènes similaire (Figure 4) (146, 256). Ainsi, ces 9 régions FCT différentes sont caractérisées par la présence d'un à deux gènes codant une protéine liant la fibronectine, un gène codant une protéine liant le collagène, un gène codant le squelette du pilus, un gène codant des protéines ancillaires décorant le squelette, un gène codant un régulateur transcriptionnel et des gènes codant des sortases (337). L'analyse moléculaire de souches de *S. pyogenes* a permis de retrouver une région FCT dans chaque souche et chaque région FCT est rattachée à un type d'antigène T (146). De plus, les souches de *S. pyogenes* partageant un même génotype *emm* possèdent une région FCT identique (146, 250, 256). Ces données moléculaires confirment la corrélation qui avait été établie entre les sérotypes T et les sérotypes M (230).



**Figure 4. Organisation des gènes au sein des 9 loci FCT différents chez *S. pyogenes*.** D'après (146, 250, 256, 337).

### 1.3.1.3 Facteur d'opacification du sérum

La détection de la capacité à opacifier le sérum humain par certaines souches de *S. pyogenes* constituait un outil supplémentaire de typage au sein de l'espèce *S. pyogenes*. Elle repose sur la présence du facteur d'opacification du sérum (SOF) ; protéine de surface de *S. pyogenes* douée d'une activité de lipoprotéinase (242, 307). L'opacification du sérum résulte du clivage enzymatique par SOF de l'apoprotéine A1 physiologiquement présente dans le sérum humain, avec agrégation et insolubilisation des lipoprotéines de haute densité (419). Ce typage se fait désormais par détection par PCR du gène *sof* mais il tend à être abandonné (26, 230) ; en effet, le gène *sof* est détecté dans les souches de *S. pyogenes* dont la protéine M appartient au type E et est absent de celles dont la protéine M appartient aux types A, B, C et D (Tableau I) (42). D'autre part les souches SOF positive arborent l'opéron *mrp*, *emm*, *enn* alors que la plupart des souches SOF négative possèdent le seul gène *emm* (93) (Tableau I).



**Tableau I. Corrélation entre le typage moléculaire des souches de *S. pyogenes* et le tropisme tissulaire.**

Type de protéine M	A	B	C	D	E
Déterminant génétique de la protéine M	<i>emm</i>	<i>Emm</i>	<i>emm</i>	<i>emm</i>	<i>mrp, emm, enn</i>
<i>sof</i>	absent	Absent	absent	absent	présent
Tropisme tissulaire	pharyngé	pharyngé	pharyngé	cutané	pharyngé et cutané

#### 1.3.1.4 Typage moléculaire

S'ajoutent également à ces techniques moléculaires, l'analyse des pulsotypes obtenus par Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) qui reste la technique largement utilisée en routine pour comparer les souches de *S. pyogenes* isolées au cours d'épidémie d'infections communautaires ou nosocomiales (303, 436). Le Multi Locus Sequence Typing (MLST) consistant à amplifier puis séquencer sept gènes de ménages semble peu discriminant chez *S. pyogenes* (140). Son utilité en pratique courante présente peu d'intérêt même si une corrélation entre génotypage *emm* et MLST a été établie. (45, 141). Le PFGE et le MLST étant peu discriminants pour différencier entre elles les souches de *S. pyogenes emm1* qui sont le plus souvent clonales, le séquençage du gène *sic* (streptococcal inhibitor of complement), codant une protéine inhibitrice du complément, a été proposé pour ces souches (5, 206, 318).

#### 1.3.2 Variabilité des génomes de *S. pyogenes*

Les progrès réalisés en biologie moléculaire et le développement des outils bioinformatiques ont largement contribué à la démocratisation du séquençage des génomes complets bactériens. A ce jour, 20 génomes de *S. pyogenes* sont disponibles dans les bases de données (17, 33, 34, 44, 152, 158, 178, 210, 312, 323, 336, 389, 443, 469). La plupart des souches séquencées sont associées à un contexte clinique ou un évènement épidémique particulier justifiant la caractérisation approfondie de ces souches. Ces 20 souches séquencées constituent un panel de 13 génotypes *emm* différents couvrant environ 65% des souches de *S. pyogenes* circulant en France. La taille du génome de *S. pyogenes* est comprise entre 1,75 et 1,94 mégabases incluant environ 2 000 gènes. La partie codante est estimée à environ 86,4% du génome. Elle est constituée à plus de 85% par des gènes conservés entre les souches, représentant le « core » génome de *S. pyogenes*. Ces gènes ont des séquences nucléotidiques identiques à au moins 98% entre les différents génomes. La comparaison des génomes de *S.*

*pyogenes*, a permis d'identifier à côté du core génome, des régions de différence localisées au sein d'éléments génétiques exogènes dont les prophages et les ICE (integrated conjugative element) (32). Les prophages constituent environ 10% du métagénome de *S. pyogenes* et contribuent largement à la diversité des souches de *S. pyogenes* (16). Ainsi une association entre la distribution des gènes de super-antigènes et les génotypes *emm* des souches de *S. pyogenes* a été établie par de nombreuses études (90, 278, 289, 301, 384, 423) suggérant que la protéine M influence l'entrée des prophages dans *S. pyogenes* dont ceux transportant les gènes de super-antigènes (90) (cf *infra* 2.6.2). Il est également possible que d'autres protéines de surface que la protéine M, ou des variations dans sa séquence conduisent à l'hétérogénéité observée dans certains génotypes *emm* (90).

La présence des ICE, dont la taille varie entre 5 et 63 kilobases, au sein du métagénome de *S. pyogenes*, contribue également à la diversité des souches de *S. pyogenes* par transfert latéral conjugatif de gènes. Notamment, les ICE sont plus fréquentes parmi les souches possédant le gène *sof* (32). La présence sur ces éléments génétiques exogènes de gènes de virulence et de gènes de résistance aux antibiotiques participe à la diversité des souches de *S. pyogenes* et constituent des marqueurs moléculaires épidémiologiques.

## 1.4. Epidémiologie des infections à *S. pyogenes*

Aux XIX<sup>ème</sup> et XX<sup>ème</sup> siècles les infections à *S. pyogenes* se manifestaient principalement par des surinfections de plaies de guerre et des fièvres puerpérales ; une diminution importante de leur incidence a été observée grâce aux progrès réalisés en matière d'hygiène et d'asepsie associés à l'avènement de l'antibiothérapie. Cependant, une résurgence des infections à *S. pyogenes* a été constatée dans de nombreux pays industrialisés au milieu des années 1980 (8, 236, 266, 304, 466, 493).

### 1.4.1 Facteurs de risques sociétaux d'infection à *S. pyogenes*

Parmi les infections à *S. pyogenes*, on distingue les infections invasives, qui sont les plus sévères, les infections non-invasives souvent bénignes et les séquelles post streptococciques de natures auto-immunes. Les infections à *S. pyogenes* touchent néanmoins toutes les catégories socioprofessionnelles dans une région donnée. Cependant, les études épidémiologiques ont montré que les séquelles post-streptococciques surviennent plus

volontiers dans les populations défavorisées vivant dans la promiscuité avec des conditions sanitaires insuffisantes (103, 388, 463). Cette promiscuité est également retrouvée dans les collectivités dont les crèches, les écoles, le corps militaire, les équipes de sport, les hôpitaux et les maisons de convalescence au sein desquels de véritables épidémies d'infections non-invasives comme invasives à *S. pyogenes* sont couramment rapportées (35, 77, 120, 127, 275, 300, 381, 442).

Aux conditions socio-économiques s'ajoutent également des facteurs endogènes de prédisposition dont certains sont intimement liés au mode de vie. Les principaux facteurs de risques endogènes au développement d'une infection invasive à *S. pyogenes* retrouvés dans la littérature sont regroupés dans le Tableau II.

**Tableau II Facteurs prédisposant à une infection invasive à *S. pyogenes*.** D'après (124, 145, 265, 278, 317, 357).

---

Age > 65 ans
Immunosuppression
Corticothérapie
Chimiothérapie
Pathologie chronique
Diabète
Hépathopathie
Insuffisance rénale
Cardiopathie
BPCO
Cancer
Alcoolisme
Usagé de drogue par injection
Pathologie cutanée
Varicelle
Brûlure
Plaie
Opération chirurgicale dans les 8 jours précédents
Accouchement dans les 4 semaines précédentes

---

#### ***1.4.2 Infections invasives à *S. pyogenes****

Les infections invasives à *S. pyogenes* sont définies par l'isolement de bactéries à partir d'un site anatomique normalement stérile ou bien par l'isolement de bactéries à partir d'un site non stérile mais en association avec des signes cliniques de syndrome de choc

toxique streptococcique (SCTS). Les manifestations cliniques des infections invasives à *S. pyogenes* sont très diverses et concernent de multiples organes. Les plus fréquentes sont les infections des tissus mous dont la forme la plus sévère est la dermo-hypodermite nécrosante (DHN), et les septicémies sans foyer (87, 265, 267, 356, 357, 451). Les autres formes cliniques invasives, moins fréquentes, sont représentées par des infections ostéo-articulaires, des endométrites, des pleuro-pneumopathies, des péritonites, des méningites et beaucoup plus rarement des endocardites (87, 265, 267, 356, 357, 451). Chacune de ces manifestations cliniques peut se compliquer d'un SCTS associé à une mortalité de 45% (Tableau III) (265, 457, 479). Le SCTS et la DHN constituent ainsi les manifestations cliniques les plus graves.

**Tableau III. Définition du syndrome de choc toxique streptococcique. D'après (479).**

**Syndrome de choc toxique streptococcique**

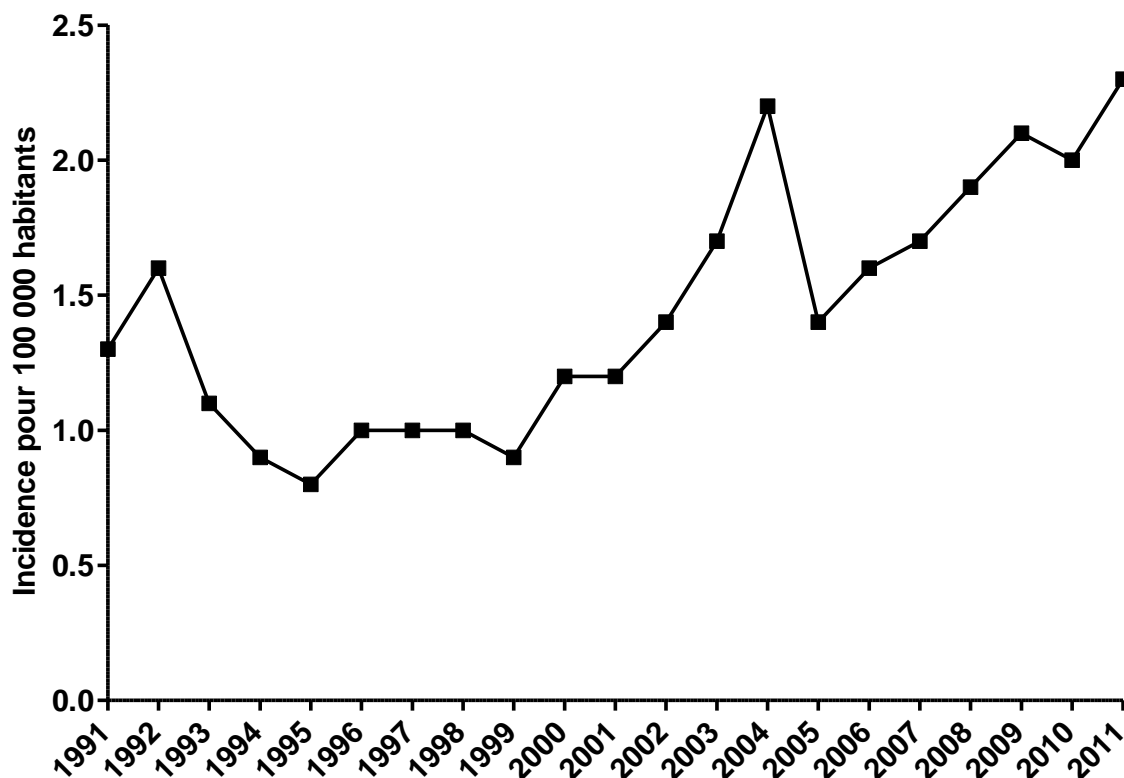
- 
- A. Isolement d'une souche de *S. pyogenes*
1. A partir d'un site anatomique stérile
  2. A partir d'un site anatomique non stérile
- B. Signes cliniques de gravité
1. Hypotension
  2. Anomalies cliniques et biologiques (dont au moins deux des éléments suivants) :
    - a) Insuffisance rénale (créatinine > 177 µmol/L)
    - b) Troubles de la coagulation (plaquettes < 100 10<sup>9</sup>/L ou CIVD)
    - c) Altération de la fonction hépatique (ALAT, ASAT ou bilirubine > 2N)
    - d) Syndrome de détresse respiratoire aiguë
    - e) Nécrose tissulaire extensive
    - f) Eruption érythémateuse
- 

Cas certain = A1 + B (1+2), Cas probable = A2 + B (1+2)

A l'échelle mondiale, les infections invasives à *S. pyogenes* sont estimées chaque année à 663 000 nouveaux cas et 163 000 décès (73). Malgré des méthodes de surveillance des infections à *S. pyogenes* variables selon les pays, les incidences sont comparables entre les pays européens et nord américains. Ainsi, aux Etats-Unis, l'incidence des infections invasives à *S. pyogenes* varie selon les études entre 3,5 et 5,2 cas pour 100 000 habitants (354, 357, 376, 522). Au Canada, cette incidence fluctue selon les provinces entre 1,5 et 4,3 pour 100 000 habitants (124, 274). Des incidences comparables de 2,5 à 3,1 cas pour 100 000 habitants ont été observées dans les pays européens suivants : Danemark, Finlande, Royaume Uni et Suède (265, 266). Par ailleurs, la mortalité associée à ces infections invasives à *S. pyogenes* est

estimée entre 12,5 et 19% selon les séries et s'élève à 45 % lorsqu'un SCTS vient compliquer le tableau clinique (124, 265, 354, 357, 376, 522).

En France, la surveillance des infections invasives à *S. pyogenes* est assurée conjointement par l'Institut National de Veille Sanitaire (InVS) et le Centre National de Référence des Streptocoques (CNR-Strep, [www.cnr-strep.fr](http://www.cnr-strep.fr)) (48, 278). La déclaration des infections invasives à *S. pyogenes* n'étant pas obligatoire, l'InVS s'appuie également sur le réseau national Epibac qui regroupe des laboratoires hospitaliers repartis sur l'ensemble du territoire. Chaque année le réseau Epibac transmet à l'InVS ses données concernant les bactériémies et méningites provoquées par six espèces bactériennes incluant *S. pyogenes*. En parallèle, le CNR-Strep recueille, centralise et expertise l'ensemble des souches de streptocoques, dont *S. pyogenes*, adressées par un réseau national de 232 laboratoires appartenant à 43 centres hospitaliers universitaires (CHU) (18%), 157 centres hospitaliers généraux (68%) et 32 laboratoires d'analyses privés (14%). L'espèce *Streptococcus pneumoniae* est étudiée par un CNR qui lui est dédié. Chaque souche de streptocoque est accompagnée d'un questionnaire de renseignements cliniques précisant le sexe, la date de naissance et le lieu de résidence du patient ainsi que la nature et la date du prélèvement. En France métropolitaine, selon les données Epibac, l'incidence des infections invasives à *S. pyogenes* a augmenté entre 1995 et 2004 passant de 0,8 à 2,2 cas pour 100 000 habitants (Figure 5). Il s'agit d'une incidence redressée pour la couverture incomplète du réseau Epibac et corrigée du fait d'une sous-notification des laboratoires participants. Les données Epibac les plus récentes concernent l'année 2011 au cours de laquelle cette incidence s'élevait à 2,3 cas pour 100 000 habitants.



**Figure 5. Incidence des infections invasives à *S. pyogenes* pour 100 000 habitants, 1991-2011, en France métropolitaine selon Epibac.**

Incidence redressée pour la couverture incomplète du réseau Epibac et corrigée du fait d'une sous-notification des laboratoires participants. D'après <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-prevention-vaccinale/Infections-invasives-d-origine-bacterienne-Reseau-EPIBAC/Bulletin-du-reseau-de-surveillance-des-infections-invasives-bacteriennes>.

Ces données sont confirmées par l'étude prospective réalisée en 2007 par l'InVS en association avec le CNR-Strep, au cours de laquelle l'incidence des infections invasives à *S. pyogenes* atteignait 3,1 cas pour 100 000 habitants en France métropolitaine (278). Ces infections invasives à *S. pyogenes* étaient associées à un taux de mortalité à 7 jours de 14% qui atteignait 43% en cas de SCTS.

Dans les pays émergents, l'incidence des infections invasives à *S. pyogenes* est supérieure à celle observée dans les pays industrialisés. Ainsi, une étude prospective réalisée en Nouvelle-Zélande entre 2005 et 2006 a évalué cette incidence à 8,1 pour 100 000 habitants. De plus, en fonction des ethnies et groupes d'âges elle atteignait 20,4 pour 100 000 habitants chez les Maoris et 33 pour 100 000 habitants chez les enfants âgés de moins d'un an toutes ethnies confondues (413). Dans cette étude, le taux de mortalité était de 10% mais il augmentait à 63% en cas de SCTS. Une incidence comparable a été observée sur la même

période aux îles Fidji où elle s'élevait à 9,9 cas pour 100 000 habitants, atteignant même 44,9 cas pour 100 000 habitants chez les enfants âgés de moins de 5 ans avec une mortalité associée de 32% (451). De façon encore plus dramatique, une incidence des septicémies à *S. pyogenes* de 63 pour 100 000 enfants âgés de moins de 2 ans a été observée au Kenya (39).

#### **1.4.3 Infections non invasives à *S. pyogenes***

Parmi les infections non invasives à *S. pyogenes*, l'incidence des pyodermites et des angines a été particulièrement étudiée, *S. pyogenes* étant la première cause d'angine bactérienne. L'incidence mondiale des angines à *S. pyogenes* a été évaluée à 14% chez les enfants d'âge scolaire chaque année (73) alors que chez les adultes l'incidence des angines à *S. pyogenes* est plus faible, variant entre 4 et 10% (54, 251). Cependant, selon les populations étudiées l'incidence des angines à *S. pyogenes* est variable se situant entre 3,9 et 7,2 % (134, 410), mais pouvant atteindre chaque année un enfant sur 10 à Melbourne (119) voire 0,95 épisode par enfant chaque année en Inde (338). Aux Etats-Unis, le coût global annuel des angines à *S. pyogenes* chez les enfants a été estimé entre 224 et 539 millions de dollars (380).

Les climats tropicaux et des conditions de vie défavorables font le lit des pyodermites à *S. pyogenes*. Ainsi, aux îles Fidji et en Australie, au sein des communautés aborigènes, 80% des enfants développent une pyodermite active à *S. pyogenes* significativement associée à des lésions de gale (105, 452). Dans les pays industrialisés, les pyodermites à *S. pyogenes* se manifestent plus ponctuellement même si des épidémies ont été rapportées au sein de populations ayant une importante promiscuité (70, 291).

#### **1.4.3 Séquelles post-streptococciques**

Les principales complications post-streptococciques sont le rhumatisme articulaire aigu (RAA) et la glomérulonéphrite aiguë (GNA) qui surviennent à distance d'une infection aiguë à *S. pyogenes*. La survenue de ces complications est saisonnière ; le RAA associé aux angines survenant à l'automne et en hiver alors que la GNA associée aux pyodermites survenant plutôt en été (56, 103). Les séquelles post-streptococciques ne viennent pas compliquer tous les cas d'infection aiguë à *S. pyogenes* car il existe d'une part une susceptibilité de l'hôte et d'autre part un potentiel intrinsèque à la souche de *S. pyogenes*. Ainsi certaines souches étant associées aux infections cutanées et d'autres aux angines, elles spécifient la survenue d'un type de séquelles post-streptococciques (9, 46, 502).

### 1.4.3.1 Le rhumatisme articulaire aigu

Le RAA se manifeste par une inflammation des articulations (arthrite), du cœur (cardite), du système nerveux central (chorée de Sydenham), de la peau (érythème marginé) et des nodules sous-cutanés, ses inflammations pouvant être uniques ou coexister. Les atteintes cardiaques constituent la première cause de cardiopathie pédiatrique dans les pays émergents où le RAA reste un problème de santé publique (463, 464). Le diagnostic de RAA repose sur les critères de Jones modifiés définissant des critères majeurs et des critères mineurs (Tableau IV) (444). La présence de deux critères majeurs ou d'un critère majeur associé à deux critères mineurs permet de poser le diagnostic de RAA. La présence de *S. pyogenes* au niveau du pharynx objectivée par culture ou bien un titre élevé d'anticorps anti SLO (ASLO) ou anti DNase B contribuent également au diagnostic de RAA.

**Tableau IV. Critères de Jones modifiés.** D'après (444).

**Critères majeurs**

Arthrite

Cardite

Chorée de Sydenham

Erythème marginé

Nodules sous-cutanés

**Critères mineurs**

Fièvre

Arthralgies

VS augmentée

CRP augmentée

Allongement de l'intervalle PR sur l'ECG

Dans les pays émergents, le RAA est endémique et reste l'une des principales causes de cardiopathie pédiatrique. Au niveau mondial, la prévalence est estimée à plus de 15,6 millions de cas avec 282 000 nouveaux cas et 233 000 décès chaque année (73). L'incidence annuelle du RAA est très variable allant de 0,1 pour 100 000 en Grèce à 826 pour 100 000 au Soudan chez les enfants d'âge scolaire (223). Les prévalences les plus importantes sont rencontrées en Polynésie et dans la population Maori de Nouvelle Zélande (366). A l'inverse dans les pays industrialisés, le RAA est devenu une maladie rare associée à une incidence annuelle moyenne de 0,5 pour 100 000 enfants d'âge scolaire. En France elle est estimée entre 0,08 et 0,15 pour 100 000 enfants de 4 à 15 ans (366).



#### 1.4.3.2 La glomérulonéphrite aiguë

La GNA survient principalement chez les enfants entre 2 et 14 ans et majoritairement chez les enfants de sexe masculin (103, 165). La GNA se manifeste par un fébricule, des œdèmes, une hypertension, une hématurie macroscopique, une oligurie, une protéinurie et une diminution du taux sérique du complément (103, 165). L'élévation des anticorps sériques anti *S. pyogenes* permet d'étayer le diagnostic étiologique de la GNA. En fonction de l'infection primitive à *S. pyogenes*, on observe des anticorps anti-SLO après une angine et des anticorps anti DNase B ou anti hyaluronidase après une pyodermite (165).

Comme le RAA, la GNA post-streptococcique est endémique dans certaines régions du globe ; plus de 470 000 nouveaux cas surviennent chaque année, conduisant à environ 5 000 décès dont 97% dans les pays émergents (450). Dans certaines ethnies australiennes et néo-zélandaises, l'incidence annuelle des GNA s'élève entre 50,5 et 239 pour 100 000 enfants (223). En Polynésie française l'incidence annuelle était de 18 cas pour 100 000 enfants âgés de moins de 15 ans en 2007, alors qu'en France métropolitaine elle était, entre 1986 et 1990, de 0,15 pour 100 000 habitants (28, 435).

#### **1.4.4 Colonisation asymptomatique**

*S. pyogenes* peut également coloniser le pharynx de façon asymptomatique, constituant un réservoir. Diverses études ont évalué le portage pharyngé de *S. pyogenes* chez les enfants entre 10 et 22% (3, 128, 403, 428). De façon plus anecdotique, le portage vaginal de *S. pyogenes* serait de 0,03% (313).

### **1.5. Traitement et prévention**

#### **1.5.1 Traitement curatif**

Les  $\beta$ -lactamines représentent la classe antibiotique de référence pour le traitement des infections à *S. pyogenes* qu'elles soient invasives ou non-invasives, aucune souche résistante *in vitro* n'ayant été décrite. *S. pyogenes* est également très sensible aux glycopeptides, à la rifampicine et à la gentamycine. Les principales classes antibiotiques utilisées en

thérapeutique pour lesquelles une résistance autre que naturelle ait été décrite sont les macrolides et apparentés et les fluoroquinolones.

#### 1.5.1.1 Traitement des angines à *S. pyogenes*

Le traitement de première intention de l'angine à *S. pyogenes* reste l'amoxicilline pendant 6 jours (86), l'usage des macrolides ou apparentés n'étant recommandé dans le traitement des angines qu'en cas d'allergie aux  $\beta$ -lactamines (431) (Tableau V). Cependant des échecs de traitement d'angines sont décrits ; variant selon les séries entre 4,5% et 35% (64, 166, 238, 263, 371, 382, 408, 475) et constituant ainsi un facteur de risque de RAA. Ces échecs sont attribués notamment à une mauvaise observance, à une réinfection dont deux cas très originaux médiés respectivement par un chien et une brosse à dent (65, 308), à une persistance intracellulaire (237, 302), aux  $\beta$ -lactamases produites par les bactéries de la flore résidente (63, 64, 408, 421) et à un déséquilibre de la flore résidente au profit de *S. pyogenes* (408, 409).

**Tableau V. Traitement antibiotique curatif des angines à *S. pyogenes*.** D'après <http://www.infectiologie.com/site/medias/Recos/2011-infections-respir-hautes-recommandations.pdf>.

Antibiotiques	Posologies	Durée
Traitement de 1 <sup>ère</sup> intention		
Pénicilline : Amoxicilline	Enfant > 30 mois : 50 mg/kg/j en 2 prises Adulte : 2 g/j en 2 prises	6 jours
En cas d'allergie à la pénicilline : Céphalosporines orales de 2 <sup>ème</sup> ou 3 <sup>ème</sup> génération		
Céfuroxime-axétil	Adulte : 500 mg/j en 2 prises	4 jours
Céfotiam	Adulte : 400 mg/j en 2 prises	5 jours
Cefpodoxime	Enfant : 8 mg/kg/j en 2 prises Adulte : 200 mg/j en 2 prises	5 jours
En cas de contre-indication à l'ensemble des $\beta$ -lactamines : Macrolides et apparentés (après antibiogramme)		
Azithromycine	Enfant : 20 mg/kg/j, en 1 prise Adulte : 500 mg/j en 1 prise	3 jours
Clarithromycine (standard)	Enfant : 15 mg/kg/j en 2 prises Adulte : 500 mg/j en 2 prises	5 jours
Clarithromycine (LP)	Adulte : 500 mg/j en 1 prise	5 jours
Josamycine	Enfant : 50 mg/kg/j en 2 prises Adulte : 2 g/j en 2 prises	5 jours

### 1.5.1.2 Traitement des infections invasives à *S. pyogenes*

Le traitement des infections invasives à *S. pyogenes* nécessite l'administration de pénicilline ; cependant, une efficacité moindre dans les infections les plus sévères dont la DHN et les myosites a été rapportée (4, 455, 456). Ces constatations cliniques ont d'ailleurs été confirmées *in vivo* dans un modèle murin de myosite (135, 458). Une des raisons avancée pour expliquer ces échecs est attribuée à la taille de l'inoculum bactérien à la fois *in vitro* et *in vivo* (460). En effet, une diminution de l'expression de certaines protéines liant la pénicilline (PLP), cibles des  $\beta$ -lactamines, a été observée *in vitro* sur des cultures de *S. pyogenes* en phase stationnaire de croissance (460). Ainsi, la perte de certaines PLP pendant la phase stationnaire de croissance pourrait être responsable de l'effet inoculum observé *in vivo* et expliquer les échecs de traitement des infections invasives sévères à *S. pyogenes*, décrits à la fois expérimentalement et en médecine humaine.

Par ailleurs, la clindamycine qui inhibe la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité ribosomale 50S, a montré une meilleure efficacité que la pénicilline dans un modèle murin de myosite à *S. pyogenes* (458). Cette efficacité de la clindamycine, constatée à la fois *in vitro* et *in vivo*, s'explique en partie par la diminution de synthèse des super-antigènes et de la protéine M sans influence de la phase de croissance (96, 167, 458). Ainsi le traitement des infections invasives sévères à *S. pyogenes* associe la pénicilline à la clindamycine.

### 1.5.1.3 Immunoglobulines parentérales

L'utilisation des immunoglobulines par voie intraveineuse (Ig IV) en complément du traitement conventionnel des SCTS à *S. pyogenes* reste controversée. Les immunoglobulines polyvalentes humaines à usage intraveineux sont dérivées du plasma issu de « pools » de dons de sang. Leur utilisation a été envisagée après avoir constaté leur niveau élevé en anticorps dirigés contre les super-antigènes (347, 349, 350). Par ailleurs, leur utilisation chez des patients en SCTS conduit à une importante réduction de la mortalité (18, 333, 454, 481). Cependant, dans un modèle expérimental murin de SCTS, les Ig IV n'apportent pas de bénéfice supplémentaire à l'association pénicilline et clindamycine (447). De plus, les études de cohortes montrent des résultats contradictoires ; un bénéfice des Ig IV associées au traitement conventionnel des SCTS a été souligné par une étude multicentrique randomisée en double aveugle européenne (122) ainsi que dans une étude canadienne (243) alors qu'une

étude multicentrique rétrospective américaine ne montre pas de bénéfice des Ig IV dans les SCTS pédiatriques (427).

### **1.5.2 Traitement préventif**

L'instauration d'un traitement prophylactique se discute notamment devant un cas d'infection invasive sévère à *S. pyogenes* ainsi que chez les patients aux antécédents de RAA.

#### 1.5.2.1 Prophylaxie

##### 1.5.2.1.1 Prophylaxie des infections invasives communautaires à *S. pyogenes*

Le conseil supérieur d'hygiène publique de France recommande devant un cas isolé d'infection invasive à *S. pyogenes* d'origine communautaire, la prescription d'une antibioprofylaxie par voie générale chez les sujets contacts à risque (Tableau VI). Les sujets contacts regroupent les personnes vivant au domicile du cas, les personnes ayant eu des contacts physiques intimes avec le cas et enfin les personnes ayant vécu certaines situations reproduisant des contacts de type familial (crèche, institutions de personnes âgées, activité sportive impliquant des contacts physiques prolongés). Ces contacts concernent une période qui s'étend des 7 jours précédents le début de la maladie jusqu'à la fin des 24 premières heures du traitement spécifique du cas. Enfin, la prescription d'une antibioprofylaxie à un sujet contact vivant sous le même toit que le cas implique la prescription d'une antibioprofylaxie à l'ensemble des sujets contact du foyer même en l'absence de facteur de risque.

**Tableau VI. Schémas d'antibioprophylaxie des infections invasives communautaires à *S. pyogenes*.** D'après <http://www.sante.gouv.fr/fichiers/bo/2006/06-02/a0020044.htm>.

Antibiotique	Posologie	Durée
Céphalosporines orales de 2 <sup>ème</sup> ou 3 <sup>ème</sup> génération		
Céfotiam-hexétil	Adulte : 400 mg/jour en 2 prises	8 à 10 jours
Cefpodoxime-proxétil	Adulte : 200 mg/jour en 2 prises Enfant : 8 mg/kg/jour en 2 prises	
Céfuroxime-axétil	Adulte : 500 mg/jour en 2 prises Enfant : 30 mg/kg/jour en 2 prises	
En cas de contre-indication aux céphalosporines : Macrolides et apparentés (après antibiogramme)		
Azithromycine <i>per os</i>	Adulte : 500 mg/jour Enfant : 20 mg/kg/jour en 1 prise	3 jours
Clindamycine <i>per os</i>	Adulte et enfant : 20 mg/kg/jour en 3 prises	10 jours
En cas de contre-indication aux céphalosporines et de souche résistante aux macrolides et apparentés		
Pénicilline V <i>per os</i>	Adulte : 2 à 4 Millions UI/jour en 2 à 3 prises Enfant : 50 000 à 100 000 UI/kg/jour en 2 à 3 prises	10 jours
Et		
Rifampicine <i>per os</i>	Adulte et enfant : 20 mg/kg/jour en 2 prises	4 derniers jours

#### 1.5.2.1.2 Prophylaxie secondaire du RAA

Une prophylaxie secondaire est recommandée par l'OMS pour les patients aux antécédents de RAA afin d'éviter toute rechute (Tableau VII) (515). La durée de la prophylaxie secondaire est variable selon le degré d'atteinte des valves cardiaques. Ainsi en cas de valvulopathie persistante, la prophylaxie secondaire est recommandée jusqu'à 10 ans après le dernier épisode de RAA ou bien jusqu'aux 40 ans du patient. En l'absence de valvulopathie persistante, la prophylaxie secondaire est recommandée jusqu'à 10 ans après le dernier épisode de RAA ou bien jusqu'aux 21 ans du patient (168).

**Tableau VII. Prophylaxie secondaire du RAA.** D'après (168, 515)

Antibiotique	Posologie	Voie d'administration
Pénicilline G	Enfant $\leq$ 27 kg : 600 000 U $>$ 27 kg : 1 200 000 U	IM
Pénicilline V	500 mg/jour en 2 prises	Orale
En cas d'allergie à la pénicilline		
Sulfadiazine	Enfant $\leq$ 27 kg : 0.5 g/jour en 1 prise $>$ 27 kg : 1 g/jour en 1 prise	Orale

### 1.5.2.2 Stratégies vaccinales

La protéine M ayant été reconnue très tôt comme un facteur de virulence majeur de *S. pyogenes*, induisant la production d'anticorps protecteurs, la recherche de vaccin s'est largement orientée dans cette direction. Historiquement, les premiers essais de vaccin ont consisté à injecter un extrait purifié de protéine M3 en sous-cutané à des fratries atteintes de RAA (306). Ces premiers essais ont abouti à la production d'anticorps chez les enfants vaccinés. Cependant, trois cas de RAA sont survenus parmi les vaccinés sans qu'un lien de cause à effet direct ait toutefois pu être établi (305). Fort de cette expérience, les essais suivants incluaient une administration de pénicilline dans les jours suivants l'infection par *S. pyogenes* (108, 160, 386). Par la suite, les études ont été réalisées avec des peptides dérivés de l'extrémité variable amino-terminale de la protéine M (22, 24, 110, 112, 114, 115, 191, 218, 254). Plusieurs valences différentes de protéine M ont été incluses dans ces vaccins (110, 191, 218, 254). Deux formulations à respectivement 6 et 26 valences ont atteint les essais cliniques de phase I favorablement (254, 311). Cependant l'épidémiologie de *S. pyogenes* étant variable d'une région à une autre, la formulation des 26 valences ne couvrait pas les principaux sérotypes de protéine M rencontrés de part le monde (453). Afin de s'affranchir de ce problème, des études sont réalisées chez la souris avec des peptides dérivés de la région C hautement conservée de la protéine M (20, 21, 41, 60, 62). L'association d'un peptide dérivé de la région C de la protéine M et d'un peptide dérivé de la protéine de surface PrtF1 a également été testée *in vivo* (364). Enfin, des études évaluent la capacité vaccinale de bactéries commensales dont *Lactococcus lactis* et *Streptococcus gordonii* modifiées génétiquement afin d'exprimer respectivement la protéine de liaison au collagène du pilus Cpa et un segment de la protéine M (59, 255, 396).

D'autres facteurs de virulence de *S. pyogenes* sont également ciblés par les stratégies vaccinales. En effet, une protéine chimérique non fonctionnelle résultant de la fusion d'une portion de SpeA à une portion de SpeB a un effet protecteur dans un modèle murin d'infection invasive (490). De plus, des lipoprotéines extracellulaires ainsi que des peptides de surface de *S. pyogenes* identifiés par des techniques bioinformatiques se sont révélés être immunogènes chez la souris (277, 309). L'étude des protéines de paroi sans ancrage d'une souche de *S. pyogenes* M1 a permis d'identifier deux cibles vaccinales potentielles (198). L'utilisation des génomes de *S. pyogenes* disponibles dans les banques de données et de sérums humains a permis d'identifier six antigènes (Spy0269, Spy0292, SpyCEP, Spy0872, Spy0895 et Spy1666) conférant une immunité protectrice dans un modèle murin de

colonisation nasale (161). De plus, par une approche originale combinant des techniques biochimiques, bioinformatiques et protéomiques appliquées à une souche de *S. pyogenes* M1, la protéase de surface SpyCEP a été identifiée comme protectrice dans un modèle murin (407). La combinaison de trois techniques à haut débit de protéomique, puces protéiques (immuno-protein array) et cytométrie de flux a été réalisée sur quatre souches de *S. pyogenes* afin d'identifier les protéines de surface et les protéines secrétées conservées entre elles (30). Au final, la combinaison des trois protéines SpyCEP, Spy0269 et Spy0167 s'est révélée protectrice dans un modèle murin de colonisation nasale (30).

### 1.5.3 Epidémiologie de la résistance de *S. pyogenes*

L'acquisition de résistance aux antibiotiques utilisés en thérapeutique par *S. pyogenes* concerne principalement les macrolides et apparentés et de façon moindre les fluoroquinolones.

#### 1.5.3.1 Résistance aux macrolides et apparentés de *S. pyogenes*

La résistance aux macrolides et apparentés pose un problème thérapeutique pour le traitement des infections non-invasives à *S. pyogenes* pour lequel ils constituent une alternative en cas d'allergie aux  $\beta$ -lactamines ainsi que pour le traitement des infections invasives sévères nécessitant l'association  $\beta$ -lactamines-clindamycine. Néanmoins cette résistance est très variable dans le temps selon les régions concernées.

Deux mécanismes de résistance aux macrolides et apparentés acquis par *S. pyogenes* ont été décrits. Le premier est lié au gène *mef* codant la synthèse d'une pompe d'efflux des molécules antibiotiques à l'extérieur de la bactérie, dont plusieurs allèles ont été décrits, le plus fréquent étant *mefA* (58, 84). Cette pompe d'efflux entraîne une résistance aux macrolides à 14 et 15 atomes de carbone (érythromycine et clarithromycine) et aux azalides (azithromycine) mais épargne les macrolides à 16 atomes de carbone (josamycine), les lincosamides (clindamycine) et les streptogramines A et B définissant ainsi un phénotype M (Figure 6A). Le deuxième mécanisme de résistance est lié aux gènes *ermA* et *ermB* codant une méthylase responsable de la méthylation de la cible des macrolides et apparentés ; l'adénine en position 2 058 de l'ARNr 23S de la sous-unité 50S des ribosomes (506). Le gène *ermA*, le plus souvent d'expression inductible, et le gène *ermB* d'expression très majoritairement constitutive confèrent respectivement les phénotypes MLS<sub>B</sub> inductible et

MLS<sub>B</sub> constitutif qui entraînent une résistance à l'ensemble des macrolides et apparentés (Figures 6B et 6C).



**Figure 6. Phénotypes de résistances de *S. pyogenes* aux macrolides et apparentés.**

Les antibiogrammes ont été réalisés selon les recommandations européennes de l'EUCAST, ERY ; disque d'érythromycine chargé à 15µg, CLI ; disque de clindamycine chargé à 2 µg. (A) phénotype M. (B) phénotype MLS<sub>B</sub> inducible. (C) phénotype MLS<sub>B</sub> constitutif.

La résistance à l'érythromycine de *S. pyogenes* semble diminuer depuis quelques années en France. Entre 2006 et 2010, la résistance à l'érythromycine des souches invasives de *S. pyogenes* isolées chez des adultes est passée de 10,9% à moins de 5% (384). Parmi ces souches, 84% arboraient un phénotype MLS<sub>B</sub> et 16% un phénotype M. Les trois génotypes les plus représentés étaient *emm11* et *emm28* pour les souches MLS<sub>B</sub> et *emm4* pour les souches M. Un taux de résistance à l'érythromycine équivalent a été retrouvé en Roumanie pour les souches invasives de *S. pyogenes* (290). Une tendance similaire a été observée en Italie, le taux de résistance à l'érythromycine des souches invasives de *S. pyogenes* diminuant de 26,5% à 18,9% entre 1994 et 2005, notamment grâce à la disparition du clone résistant *emm89* (99).

La diminution de la résistance à l'érythromycine observée pour les souches invasives de *S. pyogenes* a également été constatée pour les souches d'angine. En France, le taux de résistance à l'érythromycine observé au cours de quatre études pédiatriques successives réalisées sur des souches de *S. pyogenes* isolées d'angines au cours des périodes ; 1999, 2003, 2005-2006 et 2009-2011, était respectivement de 6%, 24%, 12% et 3% (51, 52, 109, 183). Le niveau très élevé de résistance à l'érythromycine en 2003 était attribué à la diffusion du gène *ermB* au sein d'un clone *emm28* responsable d'angines mais aussi d'infections du post-partum (319). Une diminution de la résistance à l'érythromycine des souches pédiatriques isolées d'angines a également été décrite en Allemagne ; le taux de résistance passant de 13,6% pour la période 1999-2003 à 2,6% pour la période 2005-2009 (147). Des taux de résistance à l'érythromycine similaires ont été décrits pour des souches d'angine à *S. pyogenes* isolées en Corée du sud, Roumanie et aux Etats Unis (177, 248, 290). Au Portugal, une diminution de la



résistance à l'érythromycine des souches d'angine à *S. pyogenes* a également été décrite passant de 28% en 2000 mais atteignant encore 11% en 2005 (433). Au contraire, des taux élevés de résistance à l'érythromycine sont observés en Chine atteignant 95% des souches pédiatriques d'angines (285).

Cette diminution de la résistance à l'érythromycine constatée en France pour les souches invasives et non-invasives de *S. pyogenes* s'explique en partie par la réduction de la consommation en antibiotiques et par la disparition du clone résistant *emm28* (109, 173, 412).

#### 1.5.3.2 Résistance aux fluoroquinolones de *S. pyogenes*

Le traitement de première intention des infections à *S. pyogenes* ne recommande pas l'usage des fluoroquinolones (FQ). Cependant, leur utilisation peut être discutée ponctuellement en cas d'allergie aux  $\beta$ -lactamines, de résistance à la clindamycine ou dans certaines infections ostéo-articulaires.

La diminution de sensibilité aux FQ de *S. pyogenes* est principalement médiée par l'apparition de mutations ponctuelles dans la région déterminant la résistance aux FQ (QRDR) des gènes *gyrA* et *gyrB* codant l'ADN gyrase et *parC* et *parE* codant la topoisomérase IV (296). Les mutations surviennent par étapes ; initialement dans la cible primaire *parC* conférant une résistance de bas niveau, puis dans la cible secondaire *gyrA* entraînant alors un niveau élevé de résistance (49).

Une diminution de sensibilité aux FQ de souches de *S. pyogenes* a été initialement observée en Belgique ; s'élevant respectivement à 6,2% et 21,6% entre 2007 et 2010 (492). Les souches concernées provenaient à la fois d'infections invasives (9,3%) et d'infections non-invasives (90,7%) survenues dans la moitié des cas chez des enfants. Cette augmentation de la résistance aux FQ a été attribuée à la diffusion d'un clone de *S. pyogenes emm6* (296, 492). Au Portugal 4,9% des souches pédiatriques de *S. pyogenes* isolées entre 1999 et 2006 présentaient une diminution de sensibilité aux FQ en relation notamment avec la diffusion du clone *emm6* également identifié en Espagne (328, 383). En France, 13,3% des souches invasives de *S. pyogenes* isolées chez des adultes entre 2008 et 2010 présentaient une diminution de sensibilité aux FQ ; deux tiers d'entre elles étant de génotype *emm6* (384). Cette diminution de sensibilité aux FQ observée dans ces trois pays européens semble être en relation avec la diffusion d'un clone résistant. Au contraire, la diminution de sensibilité aux FQ des souches de *S. pyogenes* isolées au Brésil est polyclonale, regroupant 7 génotypes *emm* différents et s'élevant à 6% (441).

## 2. Facteurs de virulence impliqués dans la physiopathologie des infections à *S. pyogenes*

La diversité génétique des souches de *S. pyogenes*, associée à la multiplicité des facteurs de virulence (Tableau VIII) et aux susceptibilités interindividuelles de l'hôte, conduit à diverses manifestations cliniques dont la physiopathologie est très complexe. Par ailleurs, une corrélation entre manifestation clinique et génotype *emm* peut dans deux exemples (SCTS et DHN) être identifiée car certains facteurs de virulence, portés par des éléments génétiques exogènes et impliqués dans ces pathologies, sont plus fréquemment associés à certains génotypes *emm*.

L'étude des facteurs de virulence de *S. pyogenes* a suivi les progrès de la biologie. L'approche désormais utilisée consiste à étudier la transcription d'un gène d'intérêt, identifié par comparaison des génomes de *S. pyogenes*, dans différentes conditions de croissance, de comparer la virulence *in vivo* de la souche sauvage et de la souche délétée du gène d'intérêt et d'analyser la réponse transcriptionnelle observée *in vivo* par des techniques de microarray ou de RNAseq.

Dans cette partie nous avons choisi de présenter les principaux facteurs de virulence de *S. pyogenes* en fonction de l'étape physiopathologique au cours de laquelle ils interviennent : adhésion cellulaire, colonisation, internalisation, échappement au système immunitaire et dissémination. L'ensemble des facteurs de virulence évoqués dans cette partie sont regroupés dans le Tableau VIII.

Tableau VIII. Principaux facteurs de virulence impliqués dans la pathogénie de *S. pyogenes*

Facteur de virulence	Déterminant génétique	Nature biochimique	Contribution à la pathogénie	Références
LTA	Multiples	Polymère de glycérophosphate	. Adhésion cellulaire . Réaction inflammatoire	(23, 194, 360, 445)
Protéine M	<i>emm</i>	Homodimère de chaînes polypeptidiques enroulées en hélice alpha ancrées au peptidoglycane	. Liaison variable selon le type de protéine M, à de nombreux ligands, dont la fibronectine, le plasminogène et le récepteur CD46 des kératinocytes . Adhésion cellulaire . Colonisation de l'oropharynx . Internalisation . Echappement au système immunitaire : inhibition de l'opsonisation, multiplication dans les PNN et macrophages . Altération de la perméabilité vasculaire	(13, 38, 40, 72, 74, 92, 94, 95, 101, 130, 187, 190, 200, 202, 213, 217, 232, 252, 362, 363, 377, 378, 439, 448, 500, 501, 514)
PrtF1/SfbI	<i>prfF1/sfbI</i>	Protéine liant la fibronectine	. Adhésion cellulaire . Persistance intracellulaire . Internalisation	(192, 325, 326, 341, 353, 372, 472)
PrtF2	<i>prtF2</i>	Protéine liant la fibronectine	. Adhésion cellulaire	(225, 260)
SOF/SfbII	<i>sof/sfbII</i>	Protéine liant la fibronectine	. Adhésion cellulaire . Internalisation	(258, 261, 359, 397, 482)
Fba	<i>fba*</i>	Protéine liant la fibronectine	. Adhésion cellulaire . Echappement au système immunitaire : inhibition de l'opsonisation	(374, 477)
Pilus	Locus FCT		. Adhésion cellulaire . Formation du biofilm	(2, 27, 246, 299, 329)
Scl1	<i>scl1</i>	Protéine liant le collagène	. Adhésion cellulaire . Formation du biofilm . Internalisation	(76, 80, 219, 365)
Sla	<i>sla</i>	Phospholipase A2	. Adhésion cellulaire	(437)

<b>Facteur de virulence</b>	<b>Déterminant génétique</b>	<b>Nature biochimique</b>	<b>Contribution à la pathogénie</b>	<b>Références</b>
SpeB	<i>speB</i> *	Cystéine protéinase	. Multiplication dans la salive . Echappement au système immunitaire : inhibition de l'opsonisation par clivage des IgG, dégradation des peptides antimicrobiens de l'immunité innée, clivage des IgA . Diffusion tissulaire : dégrade la matrice extracellulaire . Réaction inflammatoire	(36, 69, 88, 89, 138, 143, 201, 239, 241, 264, 353, 414, 422, 430, 474, 478, 505, 516)
Sic	<i>sic</i> *	Protéine extracellulaire inhibitrice du complément	. Multiplication dans la salive . Colonisation du nasopharynx . Echappement au système immunitaire : inhibition de l'opsonisation, dégradation des peptides antimicrobiens de l'immunité innée, inhibition de la phagocytose	(137, 150, 151, 207, 292, 430)
Capsule	Opéron <i>has</i> *	Polymère d'acide hyaluronique	. Colonisation nasopharyngée . Protection contre l'internalisation . Liaison au récepteur CD44 des kératinocytes . Invasion tissulaire . Echappement au système immunitaire : résistance à la phagocytose des PNN	(13, 106, 107, 116, 220, 224, 244, 332, 424, 425, 508-510)
ScpA*	<i>scpA</i> *	Endopeptidase de surface	. Echappement au système immunitaire : inhibition du recrutement des PNN	(85, 226, 227, 512)
SpyCEP	<i>spyCEP</i> *	Protéase de surface	. Echappement au système immunitaire : dégrade IL-8 impliquée dans le recrutement des PNN, résistance à la phagocytose des PNN et aux NET	(136, 204, 521)
Sse	<i>sse</i> *	Estérase	. Echappement au système immunitaire : inhibition du recrutement des PNN	(283, 284)
EndoS	<i>ndoS</i>	Endoglycosidase	. Echappement au système immunitaire : clive les IgG	(88, 89)

Facteur de virulence	Déterminant génétique	Nature biochimique	Contribution à la pathogénie	Références
IdeS/Mac	<i>mac*</i>	Cystéine protéase	. Echappement au système immunitaire : clive les IgG, liaison au récepteur CD11b des PNN entravant la phagocytose	(276, 496, 507)
SLO*	<i>slo*</i>	Streptolysine O	. Echappement au système immunitaire : lyse des PNN . Diffusion tissulaire . Réaction inflammatoire	(67, 189, 344, 432, 483)
SLS	Opéron <i>sag*</i>	Streptolysine S	. Echappement au système immunitaire : lyse des PNN	(123, 322)
Sda1*	<i>sdal</i>	Streptodornase ou DNase	. Echappement au système : résistance à la phagocytose des PNN et aux NET	(68, 468, 489)
PAM	<i>pam</i>	Protéine de surface liant le plasminogène	. Diffusion tissulaire	(37)
Prp		Protéine de surface liant le plasminogène	. Diffusion tissulaire	(417)
GAPDH	<i>plr</i>	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	. Diffusion tissulaire	(373)
SEN	<i>eno</i>	$\alpha$ -éolase	. Diffusion tissulaire	(61)
Ska	<i>ska*</i>	Streptokinase	. Diffusion tissulaire : dégrade le plasminogène en plasmine	(121, 387, 400, 471)
Hly	<i>hyla</i>	Hyaluronidase	Diffusion tissulaire	(449)
SpeA, SpeC, SpeG, SpeH, SpeI, SpeJ, SpeK, SpeL, SpeM, Ssa et SmeZ	<i>speA*</i> , <i>speC</i> , <i>speG</i> , <i>speH</i> , <i>speI</i> , <i>speJ*</i> , <i>speK</i> , <i>speL</i> , <i>speM</i> , <i>ssa</i> , <i>smeZ</i>	Super-antigènes	. Stimulation du système immunitaire, réaction inflammatoire	(348, 352, 391-393, 446, 491, 518)

\*Régulation de l'expression des gènes codant ces facteurs par le système CovR/CovS (voir chapitre 3).

## 2.1. Adhésion cellulaire

L'étape initiale indispensable est constituée par « la rencontre » de *S. pyogenes* avec son hôte, suivie de son adhésion aux cellules épithéliales puis de son établissement plus ou moins prolongé au sein des flores résidentes de la peau ou de la muqueuse pharyngée voire vaginale. *S. pyogenes* doit ainsi survivre à la concurrence constituée par la population des flores normales et éviter les nombreuses forces électrostatiques et mécaniques qui tendent à le déloger (103). A ce titre, l'acide lipotéichoïque (LTA), macromolécule amphiphile ancrée dans la membrane cytoplasmique par un glycolipide relié à un polymère de résidus glycérophosphates s'étendant dans la paroi (343), joue un rôle essentiel chez *S. pyogenes*. L'exposition du glycolipide à la surface bactérienne, résultant de l'attraction électrostatique du polymère de résidus glycérophosphates avec des acides aminés chargés positivement présents dans des protéines de paroi, permet à *S. pyogenes* d'interagir avec les acides gras présents à la surface des cellules épithéliales (360). Par ces interactions hydrophobes, le LTA constitue donc une adhésine de « première étape », conduisant *S. pyogenes* à un contact étroit avec les cellules hôtes et permettant ainsi à d'autres adhésines d'établir des liaisons de haute affinité (23, 194, 360).

Parmi celles-ci, la protéine M de surface joue un rôle important dans l'adhésion de *S. pyogenes* notamment par sa capacité à fixer plusieurs types de ligands (439). Ceci suggère qu'en fonction du type de protéine M, l'adhésion à différents types cellulaires va être variable. Une corrélation a ainsi été observée entre les différents types de protéine M et le tropisme tissulaire des souches de *S. pyogenes* (Tableau I). Les types A, B et C sont majoritairement associés à des infections pharyngées alors que le type D est plutôt associé à des infections cutanées et le type E regroupe à la fois des infections pharyngées et cutanées (43, 45, 46, 440). Par ailleurs, l'adhésion de *S. pyogenes in vitro* à la lignée de cellules épithéliales laryngées humaines Hep-2 (94, 95, 190, 501) ainsi qu'à des kératinocytes primaires humains (363) est médiée par la protéine M. Le taux d'adhésion de souches de *S. pyogenes* exprimant des protéines M différentes est variable en fonction du génotype *emm* de chaque souche (190). Ce résultat a été confirmé par la construction de souches isogéniques exprimant des protéines M différentes ; l'adhésion à des cellules épithéliales laryngées humaines Hep-2 et la lignée de kératinocytes humains HaCaT est variable selon les souches (40). Enfin, il a été montré que la protéine M6 se fixe par ses régions répétées C1 et C2 au récepteur membranaire CD46 de kératinocytes humains primaires (362, 378) alors que les protéines M6 et M24 se fixent aux

cellules épithéliales laryngées humaines Hep-2 par leur extrémité variable amino-terminale (92, 501).

Les protéines liant la fibronectine présentent à la surface de *S. pyogenes* ont également un rôle important dans l'étape d'adhésion aux cellules épithéliales de la peau et du pharynx. Il s'agit de la protéine F1 (PrtF1), également dénommée SfbI (streptococcal fibronectin binding protein I) (192, 472), la protéine F2 (PrtF2) (225), SOF/SfbII (258, 261) et la protéine Fba (fibronectin-binding protein) (477). Le gène codant PrtF1/SfbI est retrouvé chez environ 50 à 90% des isolats cliniques de *S. pyogenes* (172, 261, 339) et lorsqu'elle est exprimée, PrtF1 facilite l'adhésion aux cellules épithéliales respiratoires de hamster (192). Le gène codant PrtF2 est, lui, retrouvé chez environ 36 à 80% des isolats cliniques de *S. pyogenes* (172, 257). PrtF2 est essentielle pour l'adhésion d'une souche de *S. pyogenes* M49 aux cellules épithéliales laryngées Hep-2 (260), des conclusions similaires ayant été obtenues avec la protéine Fba et une souche de *S. pyogenes* M1 (477). Par ailleurs, à côté de sa capacité à opacifier le sérum, SOF possède un domaine de liaison à la fibronectine (258, 397) impliqué dans l'adhésion de *S. pyogenes* aux cellules épithéliales laryngées Hep-2 (359). Des structures de type pilus sont également impliquées dans l'adhésion de *S. pyogenes* M1 à la lignée de cellules épithéliales laryngées humaines Detroit-562 ainsi qu'à des kératinocytes primaires et à un épithélium amygdalien (2, 299, 329). Enfin, la protéine de surface Sc11 (streptococcal collagen-like protein 1) (293, 398) participe à l'adhésion de *S. pyogenes* aux cellules épithéliales laryngées Hep-2 (80).

L'étape d'adhésion de *S. pyogenes* aux cellules hôtes implique donc différents éléments présents à sa surface, auxquels s'ajoute la phospholipase A(2) dénommée Sla dont le déterminant génétique a été identifié sur un prophage lors du séquençage de la souche de référence M3 (34, 334). Par un mécanisme qui reste encore inconnu, Sla est nécessaire à l'adhésion d'une souche de *S. pyogenes* M3 aux cellules épithéliales laryngées humaines Detroit-562 (437).

L'expression de ces adhésines est régulée en réponse aux conditions environnementales et de croissance (169) ; la synthèse de la protéine F1 est augmentée dans un environnement riche en O<sub>2</sub> alors que celle de la protéine M est supérieure en présence d'une pression partielle élevée en CO<sub>2</sub> (71). De plus, les gènes impliqués dans la synthèse du pilus sont transcrits différemment en fonction du pH (298). Ainsi, l'éventail des adhésines exprimées par *S. pyogenes* dépendra de son patrimoine génétique et de son environnement ; de ces éléments il en résultera une certaine spécificité tissulaire.

## 2.2. Colonisation

Après avoir adhéré aux cellules épithéliales cutanées ou pharyngées, *S. pyogenes* doit survivre aux conditions locales pour se maintenir de façon plus ou moins prolongée et aboutir à l'étape de colonisation. En plus de son rôle d'adhésine, la protéine M permet l'agrégation des *S. pyogenes* entre eux favorisant ainsi la formation de microcolonies sur un épithélium amygdalien (72). Par ailleurs, dans un modèle animal de colonisation de la cavité oropharyngée du babouin, la présence de la protéine M chez des souches de *S. pyogenes* M1 et M3 augmente la durée de colonisation comparativement à des mutants isogéniques (13). Des résultats comparables ont été obtenus dans un modèle animal de colonisation de la cavité oropharyngée du rat avec une souche de *S. pyogenes* M6 (213).

A côté de la protéine M, la capsule de *S. pyogenes* semble jouer un rôle important dans l'étape de colonisation. Elle est constituée par un polymère de haut poids moléculaire d'acide hyaluronique identique à l'acide hyaluronique humain (418), constitué d'unités répétées de N-acétylglucosamine et d'acide glucuronique relié par des liaisons  $\beta$ 1,4 (465). Ces gènes de synthèse *hasA*, *hasB* et *hasC* sont regroupés dans un même opéron (98, 131). *hasA* code une hyaluronate synthase, *hasB* code une UDP-glucose-déshydrogénase et *hasC* une UDP-glucose pyrophosphorylase (97, 125, 132, 133). Cependant, seuls *hasA* et *hasB* sont nécessaires pour la synthèse de la capsule chez *S. pyogenes*, suggérant qu'une autre source d'UDP-glucose est disponible pour la production de la capsule (12). Phénotypiquement, la présence d'une capsule épaisse se traduit par un aspect muqueux des colonies. La construction d'une souche de *S. pyogenes* M3 délétée de *hasA* a permis de souligner l'importance de la capsule pour la colonisation de la cavité oropharyngée du babouin, la durée de colonisation étant significativement inférieure pour la souche mutée comparativement à la souche sauvage (13). Des résultats similaires ont été obtenus avec une souche acapsulée de *S. pyogenes* M50 et une souche de *S. pyogenes* M24 dans un modèle murin de colonisation de la cavité nasopharyngée (220, 508).

Par ailleurs, les pili et la protéine de surface Sc11 de *S. pyogenes* sont impliqués dans la formation du biofilm dont on peut supposer qu'il trouve tout son intérêt au cours de cette étape de colonisation (27, 246, 299, 365). Enfin deux protéines semblent indispensables à la multiplication dans la salive d'une souche de *S. pyogenes* M1 au niveau pharyngé (430) : la cystéine protéinase SpeB (streptococcal pyrogenic exotoxin B) codée par le gène chromosomique *speB*, sécrétée sous forme d'une pro-enzyme de 40 kDa puis convertie en une



forme mature de 28 kDa par clivage autocatalytique (138, 195), et la protéine inhibitrice du complément Sic (5). Le rôle de Sic dans l'étape de colonisation a été confirmée *in vivo* dans un modèle animal murin de colonisation de la cavité nasopharyngée (292).

### 2.3. Internalisation

L'internalisation de *S. pyogenes* fait intervenir de multiples facteurs de virulence et concerne différents types cellulaires (190, 273, 326, 369). Ainsi la capacité d'internalisation de 96 souches cliniques de *S. pyogenes* (21 prélèvements cutanés, 35 prélèvements pharyngés et 40 hémocultures) par les cellules épithéliales laryngées Hep-2 varie en fonction de la nature du prélèvement, 77,5% des souches d'hémoculture affichant un taux d'invasion inférieur à 0,01% *versus* 1 à 10% pour 60% des souches cutanées et 50% des souches pharyngées (324). De plus, le taux d'internalisation de *S. pyogenes* par les cellules épithéliales laryngées Hep-2 est variable en fonction du génotype *emm* de chaque souche (190). La protéine M1 (101, 130) et la protéine de surface SfbI (326, 372), préalablement liées à la fibronectine, sont indispensables à l'internalisation de *S. pyogenes*. De plus, SOF et la protéine de surface ScI1 sont respectivement impliqués dans l'internalisation d'une souche de *S. pyogenes* M49 et d'une souche M41 par les cellules épithéliales laryngées Hep-2 (76, 219, 482).

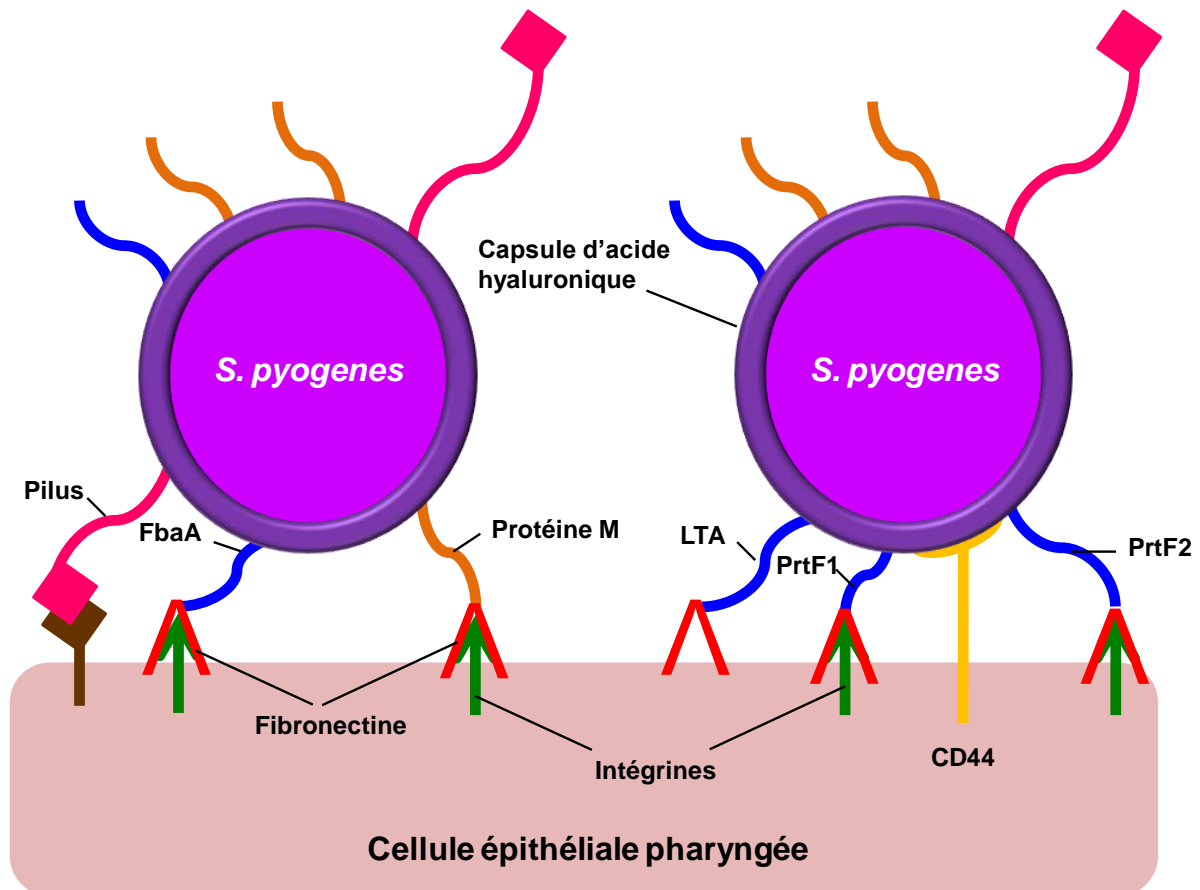
L'internalisation de *S. pyogenes* au niveau des récepteurs à l'intégrine et du récepteur CD46 présents à la surface des cellules épithéliales est médiée par la fibronectine et entraîne des réarrangements du cytosquelette (101, 130, 372, 402) par différentes voies de signalisation cellulaire (395, 498, 499). Les récepteurs à l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  et  $\alpha 5\beta 1$  ont été respectivement identifiés comme récepteurs de ScI1 (76, 219) et SfbI (101, 102). L'interaction, médiée par la fibronectine, de *S. pyogenes* avec des intégrines entraîne une production de la cytokine TGF $\beta$ 1 par les cellules Hep-2 ce qui augmente l'expression à la surface cellulaire de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et de la fibronectine favorisant ainsi la fixation de *S. pyogenes* à sa surface (498). Par ailleurs, deux voies distinctes d'internalisation de *S. pyogenes* par les cellules épithéliales laryngées Hep-2 ont été décrites (325). La première implique l'interaction de SfbI avec son récepteur  $\alpha 5\beta 1$  médiée par la fibronectine, qui entraîne la formation de larges membranes d'invagination à l'interface cellule-bactérie sans recrutement apparent d'actine. Les bactéries se retrouvent alors dans une vacuole de phagosome (8% seulement sous formes libres dans le cytoplasme 4 heures après l'infection), la majorité des bactéries atteignant le cytoplasme cellulaire 24 heures après l'infection. Au

contraire la deuxième voie implique l'interaction des bactéries, par une fraction protéique qui reste inconnue, avec un récepteur cellulaire différent de ceux décrits, ce qui provoque d'importants réarrangements du cytosquelette sous la zone d'interaction cellule-bactérie. Il s'en suit un recrutement et une élongation des microvillosités adjacentes qui fusionnent en entourant les bactéries qui se retrouvent rapidement dans le cytoplasme (38% et 82% à 4 et 8 heures après l'infection). Les bactéries atteignant le cytoplasme par les deux voies d'internalisation différentes avaient conservé leur capacité de multiplication.

Certaines protéines de surface de *S. pyogenes* favorisent donc l'étape d'internalisation contrairement à la capsule qui s'y oppose. La présence de la capsule chez une souche de *S. pyogenes* M3 empêche l'internalisation par les cellules épithéliales laryngées Hep-2 (224, 244). Un résultat identique a été obtenu avec 24 souches cliniques de *S. pyogenes* sur des kératinocytes humains (425). Par ailleurs, le récepteur CD44 présent à la surface des cellules épithéliales a été identifié comme récepteur de la capsule d'une souche de *S. pyogenes* M3 (106, 424). La fixation de *S. pyogenes* par sa capsule au récepteur CD44 induit des réarrangements du cytosquelette de kératinocytes primaires humains, conduisant à une modification des jonctions intercellulaires, permettant ainsi à *S. pyogenes* d'atteindre des tissus plus profonds sans nécessité d'une étape d'internalisation (107).

L'internalisation de *S. pyogenes* est un phénomène complexe impliquant, entre autre, divers éléments de surface, mais dont le mécanisme exact et le rôle dans le processus physiopathologiques restent inconnus. L'étude des souches de *S. pyogenes* isolées chez des porteurs pharyngés asymptomatiques a démontré la présence du gène *prtF1* dans 90% des souches, suggérant un rôle de PrtF1 dans la persistance intracellulaire de *S. pyogenes* (341). De plus, la présence de *S. pyogenes* dans des biopsies d'amygdale chez des porteurs asymptomatiques (370) suggère que ce phénomène d'internalisation permet à *S. pyogenes* de se constituer un sanctuaire afin d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte ainsi qu'aux antibiotiques. Ainsi, les souches de *S. pyogenes* qui échappent aux traitements antibiotiques ont des capacités d'internalisation significativement plus élevées que les souches éradiquées par des antibiotiques (426). Cette hypothèse expliquerait les échecs d'éradication de *S. pyogenes* de la gorge de sujets infectés ou porteurs asymptomatiques chroniques (341, 361).

Les principales interactions entre *S. pyogenes* et les cellules épithéliales pharyngées sont représentées dans la Figure 7.



**Figure 7. Adhésion de *S. pyogenes* à une cellule épithéliale pharyngée.**

Interaction d'attributs présents à la surface de *S. pyogenes* : protéine M (orange), protéines liant la fibronectine FbaA, PrtF1, PrtF2 et acide lipotéichoïque (LTA) en bleu, le pilus (rose), la capsule (violet) et certains récepteurs d'une cellule épithéliale pharyngée médiée par la fibronectine (rouge). D'après (368).

## 2.4. Echappement au système immunitaire inné

*S. pyogenes* a à sa disposition plusieurs facteurs de virulence protéiques et physique agissant sur divers constituants des défenses immunitaires innées de l'hôte dont les chémokines, des peptides antimicrobiens, le système du complément et des cellules phagocytaires.

### 2.4.1 Inhibition du recrutement des polynucléaires neutrophiles (PNN)

*S. pyogenes* présentent deux protéines de surface qui vont altérer le recrutement des PNN au site infectieux par deux mécanismes distincts.

L'endopeptidase ScpA (streptococcal-C5a peptidase), présente à la surface de *S. pyogenes*, inactive l'anaphylotoxine C5a un puissant agent chimiotactique des PNN, en éliminant spécifiquement les six derniers acides aminés de son extrémité C-terminale (355). L'anaphylotoxine C5a ne peut donc plus interagir avec ses récepteurs présents à la surface des PNN inhibant ainsi le recrutement d'autres PNN par chimiotactisme au site infectieux (85, 512). Ces données ont été confirmées *in vivo* dans deux modèles animaux murins d'infection sous-cutanée et de la cavité nasopharyngée. L'inactivation par insertion du gène *scpA*, codant ScpA, favorise la clairance de ces souches de *S. pyogenes* du site infectieux comparativement aux souches sauvages (226, 227). Cependant, ces mutations dans *scpA* n'avaient pas d'incidence sur la virulence globale des souches de *S. pyogenes* dans un modèle murin d'infection sous-cutanée (227).

*S. pyogenes* présente également à sa surface SpyCEP (*S. pyogenes* cell envelope protease également dénommée ScpC ou PrtS), protéase de 1 645 acides aminés ancrée à la paroi par un domaine carboxy-terminal LPXTG. SpyCEP dégrade la chémokine humaine chimio-attractante IL-8 impliquée dans le recrutement et l'activation des PNN au site infectieux (136, 204). Par ailleurs SpyCEP favorise la résistance à la phagocytose et à la lyse médiée par les pièges neutrophiles extracellulaires (NET) et altère la migration endothéliale des PNN humains (521).

Plus récemment, l'estérase Sse (secreted streptococcal esterase) a été incriminée dans la virulence de *S. pyogenes*. En effet, Sse est sécrétée par *S. pyogenes in vitro* et une séroconversion avec des anticorps spécifiques de Sse survient chez les patients atteints d'angine (284, 461). Par ailleurs, à la fois l'immunisation active et l'immunisation passive de souris avec Sse a permis d'obtenir un effet protecteur dans un modèle d'infection cutanée invasive (284), notamment, car Sse hydrolyse le facteur d'activation plaquettaire impliqué dans le recrutement des PNN au site infectieux (283).

#### **2.4.2 Barrières physiques inhibant la phagocytose**

La capsule de *S. pyogenes* constitue une véritable barrière mécanique pour la bactérie. Une souche de *S. pyogenes* M18 acapsulée par insertion d'un transposon dans *hasA*, est sensible à la phagocytose dans un milieu contenant 10% de sérum humain et ne peut plus se multiplier en sang total humain comparativement à la souche sauvage (509, 510). Ces résultats ont été confirmés plusieurs fois par la suite (116, 332).

### 2.4.3 Altération de l'opsonisation

La phagocytose par les PNN est médiée par l'opsonisation préalable des bactéries par des anticorps ou par le complément sérique. *S. pyogenes* développe de multiples stratégies pour altérer son opsonisation. La protéine M est impliquée dans l'échappement à la phagocytose de *S. pyogenes* notamment suite à la liaison avec différents constituants du complément. Ainsi, *S. pyogenes* se lie au facteur H régulateur de la voie alterne du complément par la sous-unité répétée C de la protéine M (217) ainsi qu'au facteur H-like 1 (FHL-1) par la région hypervariable de la protéine M5 entravant ainsi le fonctionnement du complément (232). Cette conclusion est cependant controversée (252, 377) car bien que *S. pyogenes* se lie au facteur H par la protéine M, cela ne semble pas favoriser sa résistance à la phagocytose *in vivo* (187). Par ailleurs, *S. pyogenes* en se liant au régulateur C4BP (C4b binding protein) de la voie classique du complément par la région hypervariable de la protéine M22 favorise sa résistance *in vitro* à la phagocytose (38). Chez les souches de *S. pyogenes* ne liant pas le C4BP, il a été observé une liaison du fibrinogène au niveau de la sous-unité B de la protéine M bloquant la phagocytose médiée par la voie classique du complément (74, 514). Cette résistance à la phagocytose de *S. pyogenes* médiée par la liaison de fibrinogène à la protéine M a été aussi constatée avec la protéine MRP (M related protein) très proche structurellement de la protéine M (93, 385). De façon similaire, la liaison du facteur H avec la protéine liant la fibronectine Fba contribue à la résistance de *S. pyogenes* à la phagocytose (374). De plus, l'accumulation de collagène sur les molécules de fibronectine liées à la surface de *S. pyogenes* constitue une matrice au sein de laquelle s'agrègent les bactéries (129). Ces agrégats masquent les épitopes opsonisants, bloquant ainsi la phagocytose de *S. pyogenes* (129).

La protéine Sic sécrétée par les souches de *S. pyogenes* M1 inhibe, *in vitro*, la lyse cellulaire induite par le complément (5) en se fixant aux sous-unités C6 et C7 et empêchant ainsi leur incorporation au complexe d'attaque membranaire conduisant à la lyse bactérienne (150, 151). En plus de son interaction avec le système du complément, Sic inhibe plusieurs éléments impliqués dans la défense immunitaire pharyngée dont le lysozyme, les  $\alpha$ -et  $\beta$ -défensines, l'inhibiteur de protéinase leucocytaire sécrétoire, la monokine induite par l'IFN- $\gamma$ /CXCL9 et le peptide antimicrobien LL-37, diminuant ainsi localement l'activité anti-bactérienne de l'immunité innée (137, 150). Par ailleurs, Sic interagit également *in vitro*, avec des protéines du cytosquelette dont l'eitrine, inhibant ainsi la phagocytose par les PNN (207). L'analyse moléculaire du gène *sic* codant la protéine Sic, chez un grand nombre de souches

de *S. pyogenes* M1, a mis en évidence son polymorphisme très important associé à la rapidité d'apparition des différents variants (208, 462). Cette propriété constitue un outil épidémiologique pour le typage intra spécifique des souches de *S. pyogenes* M1 (206, 318). Enfin *crs* (closely related to sic), un homologue du gène *sic*, a été identifié chez des souches de *S. pyogenes* M57 dans une autre région du chromosome (53). Dans le chromosome de souches de *S. pyogenes* M12 et M55 le gène *sic* est remplacé par le gène *drs* (distantely related to sic), codant une protéine dont la similarité de séquence est limitée avec Sic (193). Le rôle biologique de ces protéines chez les souches de *S. pyogenes* M12, M55 et M57 reste inconnu.

L'endoglycosidase EndoS (Endoglycosidase) secrétée *in vitro* par *S. pyogenes* hydrolyse les glycanes liés aux chaînes lourdes des IgG humaines bloquant ainsi leur liaison aux récepteurs Fc (89). De plus *S. pyogenes* produit IdeS (Immunoglobulin G-degrading enzyme), également dénommée par une autre équipe Mac, par homologie avec l'intégrine  $\beta 2$  humaine Mac-1, une cystéine protéinase qui, *in vitro*, clive les IgG opsonisantes humaines au niveau de leur région charnière (276, 496, 507). Cette altération des IgG entrave l'opsonisation et la phagocytose par les PNN de *S. pyogenes* ainsi que l'activation du complément (88, 496, 507). IdeS/Mac se fixe *in vitro* au récepteur de la partie constante Fc des IgG, le CD16 présent à la surface des PNN humains bloquant ainsi la phagocytose et la production des espèces actives de l'oxygène par les PNN (276).

Enfin, la cystéine protéase SpeB dégrade *in vitro* les sous-unités C3 et C3b du complément impliquées dans le phénomène d'opsonisation des bactéries (264, 478) ainsi que les IgG humaines impliquées dans l'activation du complément (89, 143). SpeB a également la capacité de cliver les IgG liées à un antigène bloquant ainsi le processus d'opsonisation (143). SpeB hydrolyse également *in vitro* mais dans une moindre mesure les IgA, IgM, IgD, et IgE (88) et le peptide antimicrobien LL-37 (422), cette propriété ayant également été observée *in vivo* dans des biopsies humaines d'infections des tissus mous (229). De plus SpeB clive *in vitro* la S-adénylhomocystéine hydrolase (AdoHcyase) humaine responsable de la réaction de transméthylation nécessaire à l'activation des lymphocytes B (517). L'inactivation de cette enzyme conduit à l'accumulation intracellulaire de ses substrats, S-adénylhomocystéine et S-adénylméthionine dont la transméthylation est inhibée aboutissant à une immunosuppression (517).

#### 2.4.4 Lyse des PNN

*S. pyogenes* peut également favoriser la lyse des phagocytes, de l'extérieur, afin d'échapper à la phagocytose grâce à deux streptolysines qui vont former des pores transmembranaires favorisant ainsi leur destruction. *S. pyogenes* produit une hémolysine sensible à l'oxygène la streptolysine O (SLO) qui se fixe sur les résidus cholestérol présents dans les membranes plasmiques de l'hôte (7, 484). SLO en détruisant *in vitro* les PNN humains protège *S. pyogenes* de la phagocytose (432). Notamment, SLO favorise *in vitro* la libération de cytochrome C mitochondriale dans le cytoplasme des PNN conduisant à l'activation de la voie des caspases. Il en résulte un engagement des PNN vers l'apoptose permettant à *S. pyogenes* d'échapper à la phagocytose (483).

La streptolysine S (SLS) est une hémolysine tolérante à l'oxygène responsable de la zone d'hémolyse complète  $\beta$  caractéristique des colonies de *S. pyogenes* sur gélose au sang (199). SLS, en formant des pores transmembranaires dans les érythrocytes, modifie leur équilibre osmotique conduisant à la lyse érythrocytaire (75). SLS permet *in vitro* d'échapper à la phagocytose des PNN humains (123). Dans un modèle animal murin, *S. pyogenes* échappe au système immunitaire en favorisant, grâce à SLS, l'apoptose des PNN médiée par la voie des caspases (322).

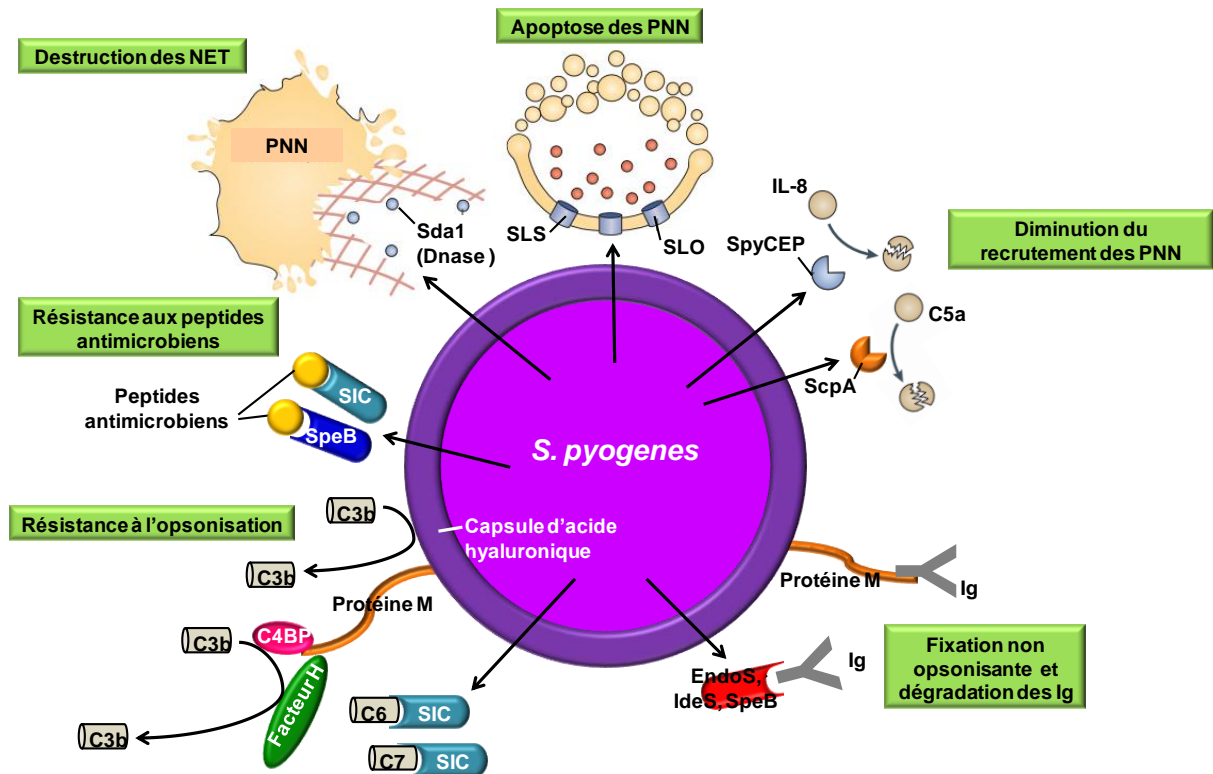
#### 2.4.5 Survie dans les PNN

Le séquençage de la souche de référence M1 a permis d'identifier 3 gènes codant des Dnases ; le gène chromosomique *spd* et deux gènes localisés dans des prophages *spd3* et *sdaD2* (468), ce dernier ayant aussi été identifié dans une souche de *S. pyogenes* M12 (469). L'inactivation isogénique simultanée de ces trois gènes a entraîné une plus grande sensibilité à la phagocytose et à la bactéricidie par des PNN humains et une capacité de dégradation de l'ADN exogène diminuée comparativement à la souche sauvage (468). De plus la construction d'un mutant délété de *sda1* a montré le rôle *in vitro* de la Dnase Sda1 dans la capacité de *S. pyogenes* d'échapper à la lyse par les PNN humains médiée par les NET (68). La Dnase Sda1 est aussi impliquée dans la capacité de *S. pyogenes* à résister à la phagocytose par des macrophages dérivés de moelle osseuse de souris ainsi que dans leur aptitude à se multiplier dans ces mêmes macrophages (489). *S. pyogenes* possède de nombreuses Dnases dénommées également facteurs mitogènes ou streptodornases. La recherche d'anticorps anti-streptodornase B contribue au diagnostic sérologique des infections post-streptococciques.

L'analyse de biopsies tissulaires humaines a permis de mettre en évidence la survie de *S. pyogenes* dans les macrophages (480). Cette survie de *S. pyogenes* dans des macrophages humains est dépendante de la protéine M1 qui inhibe la fusion vacuole phagocytaire – lysosome, constituant ainsi une niche au sein de laquelle *S. pyogenes* peut survivre mais aussi se multiplier (200). De plus la présence de la protéine M1 semble également indispensable à la survie et à la multiplication de *S. pyogenes* dans des PNN humains (448). Un résultat similaire a également été observé *in vivo* dans un modèle murin d'infection cutanée, la présence de *S. pyogenes* dans les PNN étant associée à une virulence accrue dans ce modèle (314, 316). Les macrophages et les PNN constituent ainsi un sanctuaire pour *S. pyogenes* au même titre que certaines cellules non phagocytaires mentionnées ci-dessus.

La subversion de l'hôte par *S. pyogenes* nécessite donc l'action combinée de plusieurs facteurs de virulence ciblant différents intervenants du système immunitaire inné (Figure 8).





**Figure 8. Echappement au système immunitaire inné par *S. pyogenes*.**

Le recrutement des PNN est réduit par les peptidases SpyCEP et ScpA qui dégradent respectivement l'IL-8 et l'anaphylotoxine C5. La protéine M fixe le domaine constant Fc des Ig de façon non opsonisante. Les Ig sont dégradées par la cystéine protéinase SpeB, l'endoglycosidase EndoS et la cystéine protéase IdeS. La liaison de la protéine M avec le facteur H et C4BP régulateurs respectifs de la voie alterne et de la voie classique du complément limite l'opsonisation. La protéine Sic inhibe le complément en se fixant aux sous-unités C6 et C7. La résistance aux peptides antimicrobiens cationiques est assurée par SpeB et la protéine Sic. La Dnase Sda1 permet d'échapper à la lyse par les PNN médiée par les NET. La formation de pores par les streptolysine O et S (SLO/SLS) dans la membrane des PNN provoque leur lyse par apoptose. D'après(87, 345).

## 2.5. Transition infection locale – infection invasive

Le passage d'une infection locale circonscrite à une infection disséminée par *S. pyogenes* est pour partie liée à la régulation des différents facteurs de virulence évoqués ci-dessus en fonction des conditions de température, pH, CO<sub>2</sub>... que la bactérie rencontrera au cours du processus infectieux. Cet aspect fait l'objet du chapitre 3.

## 2.6. Dissémination

La dissémination de *S. pyogenes* est favorisée par la destruction tissulaire médiée par les différentes enzymes extracellulaires produites par *S. pyogenes*, associée à une réaction inflammatoire exacerbée par les super-antigènes de *S. pyogenes*.

L'activité protéasique de SpeB est incontournable pour la dissémination de *S. pyogenes* d'une part en favorisant les dommages tissulaires et d'autre part en clivant les liaisons responsables de l'internalisation de *S. pyogenes*. En effet, l'activité protéasique de SpeB s'applique également sur les propres protéines de surface de *S. pyogenes* et l'ajout de SpeB exogène au milieu de culture permet la libération de fragments biologiquement actifs, dont la protéine M et l'endopeptidase ScpA, dans le milieu de culture (36, 138). De plus, la protéine liant la fibronectine Fba intervenant dans l'étape d'adhésion de *S. pyogenes* aux cellules hôtes est également clivée de la surface bactérienne par SpeB (374, 505). Par ailleurs, une autre protéine de surface liant la fibronectine, PrtF1 est dégradée par SpeB, dont la forme liée à la fibronectine, entraînant ainsi une diminution de l'internalisation (353). Ceci suggère que l'activité protéasique de SpeB influence certaines étapes du processus infectieux de *S. pyogenes*, en particulier l'adhésion/internalisation et la dissémination tissulaire.

### 2.6.1 Dommages tissulaires

Les dommages tissulaires générés par *S. pyogenes* associent la dissolution du caillot de fibrine produit localement en réaction à l'infection, la destruction de matrices extra cellulaires et des modifications de la perméabilité vasculaire.

Les constituants de la matrice extracellulaire la fibronectine et la vitronectine, sont clivées *in vitro* par SpeB (241) qui, par ailleurs, active *in vitro* une métalloprotéase de la matrice endothéliale humaine, MMP-2, dont les substrats sont les protéines de matrice extracellulaire et plus particulièrement le collagène de type IV (69). Ces données ont été confirmées *in vivo* dans un modèle murin d'infection invasive pulmonaire ; SpeB active les métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 contribuant aux lésions tissulaires et à la dissémination de *S. pyogenes* via la libération des marqueurs de l'apoptose TNF- $\alpha$  et FasL (474). De plus, *S. pyogenes* active *in vitro*, par un mécanisme inconnu, la MMP-13 dans des chondrocytes humains favorisant la destruction osseuse associée aux arthrites septiques (414).

*S. pyogenes* a également la capacité de lier le plasminogène humain par l'intermédiaire de quatre de ses protéines de surface : la PAM (plasminogen-binding group A streptococcal

M protein) (37), la Prp (PAM related protein) (417), la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (373) et l' $\alpha$ -énolase SEN (streptococcal enolase) (61) ainsi que par l'intermédiaire du fibrinogène lié à la protéine M (500). Une fois lié à la surface de *S. pyogenes*, le plasminogène est activé par la streptokinase en plasmine (400) qui peut lyser les caillots de fibrine, le tissu conjonctif et la matrice extracellulaire (121, 387). Le complexe trimoléculaire combinant le plasminogène, la streptokinase et le fibrinogène est associé à la diffusion tissulaire de *S. pyogenes*, démontrant sa capacité à utiliser le plasminogène humain comme facteur de virulence (471). De plus, SpeB clive le récepteur à l'urokinase présent à la surface des monocytes et libère un fragment dont l'activité enzymatique activatrice du plasminogène est conservée, contribuant ainsi à la dégradation tissulaire (516).

Par ailleurs, la hyaluronidase Hly dont les substrats sont l'acide hyaluronique capsulaire ainsi que l'acide hyaluronique tissulaire humain (418) contribue à la virulence de *S. pyogenes* dans un modèle animal d'infection cutanée invasive en permettant la diffusion de macromolécule de dextran de haut poids moléculaire (449).

Enfin, une hypothèse pour expliquer la destruction tissulaire rapide associée à une nécrose qui caractérise la DHN repose sur la formation de complexe plaquettes-PNN médiée par SLO qui obstrueraient le flux sanguin dans les muscles squelettiques aboutissant à une hypoxie locale puis à la nécrose (67).

### **2.6.2 Réaction inflammatoire**

Différents facteurs de virulence de *S. pyogenes* contribuent à induire une réponse inflammatoire chez l'hôte. Cependant, dans certaines présentations cliniques, celle-ci est exacerbée par des exotoxines de *S. pyogenes* et notamment en cas de syndrome de choc toxique streptococcique (SCTS).

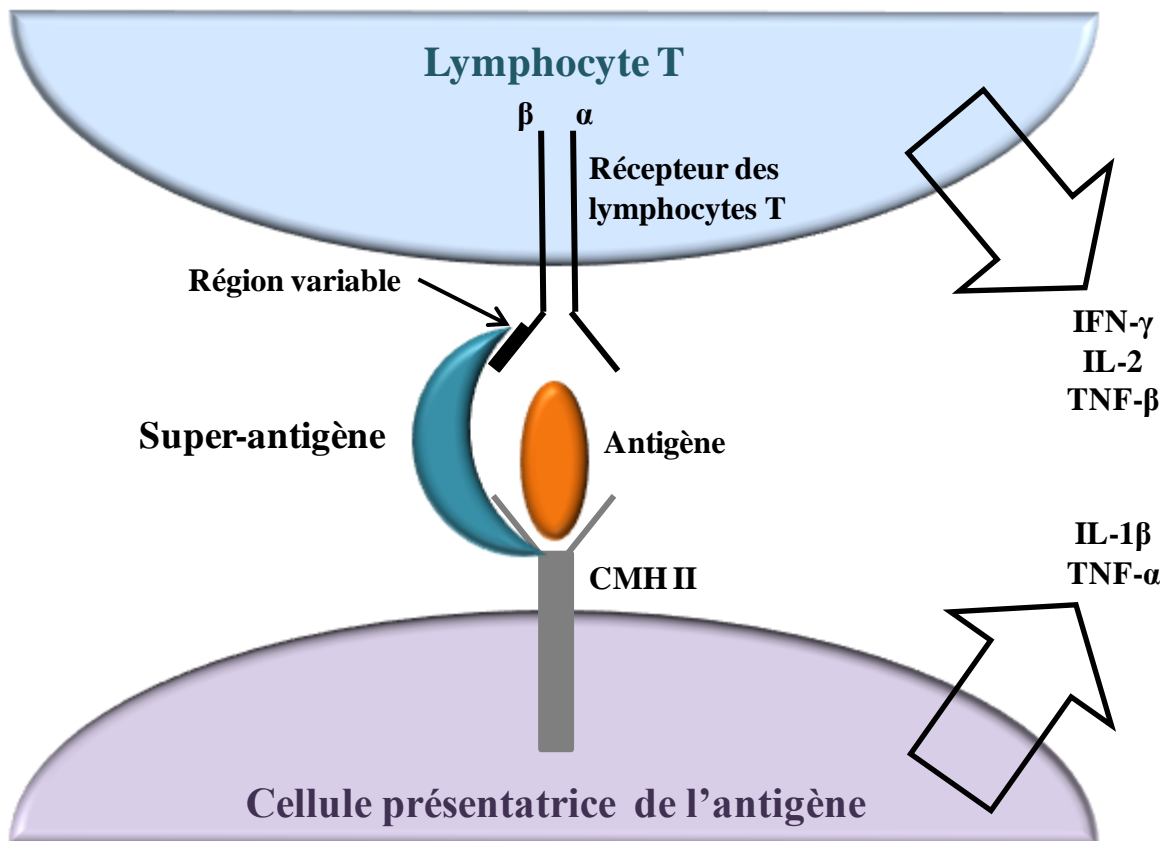
Ainsi SpeB induit une réaction inflammatoire chez l'hôte en activant, par clivage, le précurseur de la cytokine inflammatoire IL1 $\beta$  (239). De plus, SLO, le LTA et le peptidoglycane peuvent également favoriser la production de cytokines IL1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  par les monocytes et les PNN (189, 344, 445).

La perméabilité vasculaire est elle aussi altérée par *S. pyogenes* par l'intermédiaire de SpeB qui active directement le kininogène pro-inflammatoire humain en contournant la voie classique physiologique et favorisant ainsi l'hypotension consécutive à la perméabilité vasculaire (201). De plus, en clivant la protéine M de la surface de *S. pyogenes*, SpeB favorise la formation de complexes protéine M - fibrinogène plasmatique qui vont activer les PNN en

se fixant sur leurs récepteurs membranaires à l'intégrine  $\beta 2$ . Les PNN ainsi activés vont libérer un médiateur pro-inflammatoire, la protéine liant l'héparine induisant une fuite vasculaire (202). Les complexes protéine M - fibrinogène plasmatique peuvent également se fixer sur les plaquettes qui, en présence d'IgG anti protéine M, vont être activées, générant ainsi un thrombus riche en plaquette qui obstrue la microcirculation (429).

La survenue d'un SCTS est pour partie liée à la sécrétion de super-antigènes qui vont stimuler anarchiquement le système immunitaire de l'hôte conduisant à une réaction inflammatoire paroxystique (513). *S. pyogenes* possède 11 gènes distincts codant les super-antigènes suivants : SpeA (streptococcal pyrogenic exotoxin A), SpeC, SpeG, SpeH, SpeI, SpeJ, SpeK, SpeL, SpeM, Ssa (streptococcal superantigen) et SmeZ (streptococcal mitogenic exotoxin Z) (34, 66, 175, 234, 327, 392, 394). Les gènes *speG*, *speJ* et *smeZ* appartiennent au métagénome de *S. pyogenes* alors que *speA*, *speC*, *speH*, *speI*, *speK*, *speL*, *speM* et *ssa* sont localisés sur des prophages (336). La distribution des gènes de super-antigènes est variable selon les souches de *S. pyogenes*, les gènes du core génome *speG* et *smeZ* étant par définition retrouvés dans toutes les souches (90, 301, 394) alors que la prévalence de *speJ* varie selon les études entre 51% et 100% (90, 394, 423, 495). *speA*, *speC*, *ssa*, et *smeZ* existent sous différentes formes alléliques pour lesquelles les activités super-antigéniques sont variables (240, 247, 301, 342, 393, 399)

La résolution des structures de SpeA, SpeC, SpeH et SmeZ-2 a mis en évidence leur similarité. Les super-antigènes sont des exotoxines d'environ 25 kDa caractérisées par la présence d'un site de liaison au lymphocyte T et d'un site de liaison au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) présent à la surface des cellules présentatrices de l'antigène (10, 15, 375, 411). La fixation simultanée des super-antigènes au CMH II et à la sous-unité variable V $\beta$  du récepteur des lymphocytes T ou TCR (T-cell receptor), en font de puissants stimulateurs du système immunitaire (Figure 9).



**Figure 9. Interaction d'un super-antigène de *S. pyogenes* avec le CMH II d'une cellule présentatrice de l'antigène et le récepteur des lymphocytes T.**

Onze super-antigènes ont été décrits chez *S. pyogenes* : SpeA, SpeC, SpeG, SpeH, SpeI, SpeJ, SpeK, SpeL, SpeM, Ssa et SmeZ. D'après (286).

Cette interaction va entraîner la stimulation polyclonale des lymphocytes T exprimant la sous-unité spécifique V $\beta$ . Il en résulte une augmentation de la sécrétion par les lymphocytes T des cytokines IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  ainsi que des médiateurs des lymphocytes T IL-2 et INF- $\gamma$  (348, 352, 446). Par ailleurs, la fixation des super-antigènes sur les molécules CMH II au niveau de la zone non spécifique située en dehors de la zone de fixation du peptide, va activer de façon concomitante la production de des cytokines IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  par les cellules présentatrices de l'antigène. Il en résulte une production excessive de cytokines qui contribuent à activer le système du complément, les facteurs de la coagulation et de la fibrinolyse aboutissant à une hypotension associée à une défaillance d'un ou plusieurs organes caractéristiques d'un SCTS (348, 352, 446). Une corrélation directe entre l'intensité de la réponse inflammatoire et la survenue d'un SCTS a été constatée (348). Les différents super-antigènes se distinguent par leur capacité spécifique de liaison à la sous-unité V $\beta$  du TCR et au CMH II entraînant une réponse des lymphocytes T d'intensité variable (391, 446). Ainsi SmeZ, et notamment l'allèle SmeZ-2, est le super-antigène le plus puissant *in vitro* et *in vivo*

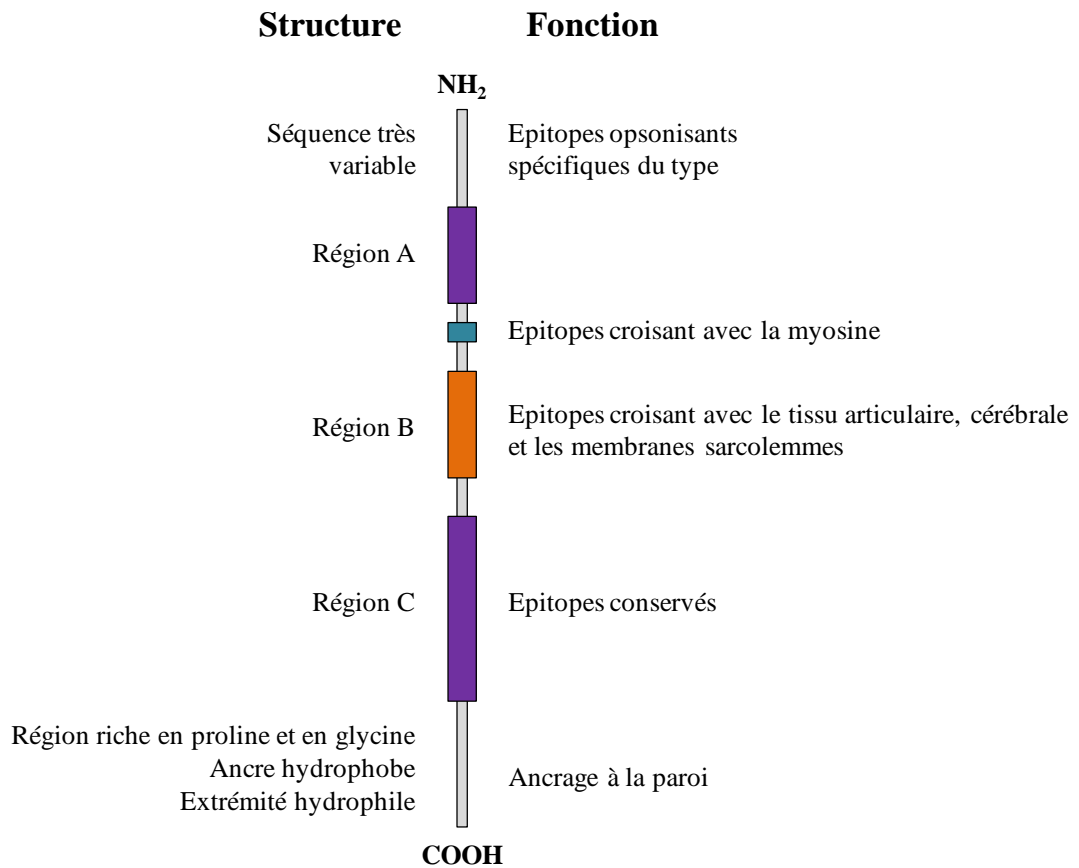
dans un modèle de SCTS (391-393, 491, 518). Par ailleurs, l'activité protéasique variable exercée par SpeB sur les différents super-antigènes contribue à moduler la réaction inflammatoire (235, 346).

Historiquement, SpeA et SpeC étaient identifiés comme les toxines de la scarlatine en raison de leur association avec la scarlatine (504). Ainsi, il existe une association entre SpeA et la survenue d'un SCTS (34, 124, 196, 459, 473), les génotypes *emm1* et *emm3* couramment associés à SpeA, étant les plus fréquents parmi les cas de SCTS (289, 354, 384, 455, 519).

## **2.7. Séquelles post-streptococciques**

### ***2.7.1 Rhumatisme articulaire aigu***

Le développement du RAA se fait généralement après une période de latence variant de une à cinq semaines suivant la survenue d'un épisode d'angine à *S. pyogenes* (103, 463, 464). Cependant, la physiopathologie du RAA est complexe et les raisons de sa survenue restent inconnues. De nombreuses études épidémiologiques ont souligné le caractère muqueux, lié à la présence d'une épaisse capsule, des souches de *S. pyogenes* associées au RAA et leur restriction aux sérotypes M1, M3, M5, M6, M18, M19 et M24 (231, 463, 464). Selon l'hypothèse la plus courante, le RAA est une maladie auto-immune qui résulte de réactions croisées entre certains composants de *S. pyogenes* et les tissus hôtes médiées par des auto-anticorps et les lymphocytes T (104, 463, 464). Ainsi, dans les souches de *S. pyogenes* associées au RAA, la protéine M5 de surface présente différents épitopes pouvant croiser avec les différents tissus de l'hôte (Figure 10) (111, 463, 464). La résolution de la structure de la protéine M1 constitue un argument supplémentaire en faveur de cette hypothèse (310).



**Figure 10. Représentation schématique des épitopes croisant avec la myosine, les tissus articulaire et cérébral et les membranes sarcolemmes au sein des différentes régions répétées de la protéine M5. D'après (463).**

### 2.7.2 Glomérulonéphrite aigüe

Le développement de la GNA se fait généralement après une période de latence variant respectivement de une à deux semaines, ou trois à six semaines suivant la survenue préalable d'un épisode d'angine ou d'une pyodermite à *S. pyogenes* (103, 165, 463, 464). La physiopathologie de la GNA est complexe, elle implique des réactions croisées entre certains composants glomérulaires et des antigènes de *S. pyogenes* dits néphritogènes, résultant de la formation de complexes immuns et d'auto-anticorps. L'identification des différents antigènes néphritogènes de *S. pyogenes* impliqués dans la GNA, reste cependant controversée. La protéine M est une candidate potentielle car une association entre le sérotype des souches néphritogènes de *S. pyogenes* et leur origine anatomique a été observée. Ainsi les sérotypes M1, M2, M4, M12, M18 et M25 sont plutôt associés à une angine primitive et les sérotypes M49, M55, M57 et M60 à une pyodermite (103). De plus, une réaction croisée entre des

anticorps monoclonaux dirigés contre le glomérule et les protéines M6 et M12 a été observée (174). Enfin, des anticorps anti protéine M12 élués par le glomérule ont été observés dans un modèle animal de GNA induite par une souche de *S. pyogenes* M12 (281). Deux études indépendantes de biopsies rénales recueillies au cours de GNA, ont permis de mettre en évidence la présence de SpeB par immunofluorescence dans deux tiers des cas, associée à une élévation significative du titre des anticorps sériques anti SpeB chez ces patients (19, 100).

## 2.8. Facteurs d'hôte

Du point de vue de l'hôte, le système immunitaire va intervenir afin de circonscrire et enrayer l'infection par *S. pyogenes*. Le résultat dépendra d'une prise en charge thérapeutique adéquate mais aussi des facteurs environnementaux, de comorbidité et des prédispositions génétiques.

La protection contre *S. pyogenes* est médiée entre autre par des anticorps opsonisants dirigés spécifiquement contre un épitope de la région amino-terminale de la protéine M conférant une immunité acquise à long terme (233, 269, 270). Les autres régions de la protéine M sont également immunogènes mais les anticorps correspondants ne sont pas opsonisants. Ainsi tous les sérums humains contiennent des anticorps anti *S. pyogenes* dirigés contre la région C hautement conservée de la protéine M (212). Cependant le taux sérum d'anticorps anti *S. pyogenes* est plus faible chez les adultes comparativement aux enfants (103) probablement dû aux nombreuses infections à *S. pyogenes* contractées pendant l'enfance et donc au renforcement de leur réaction immunitaire.

Ainsi la protection humorale peut se décomposer en deux étapes. En rentrant en contact avec les muqueuses de l'hôte, l'adhésion de *S. pyogenes* peut être bloquée par des IgA non opsonisantes spécifiques de la région C hautement conservée de la protéine M. Les *S. pyogenes* qui pénètrent dans les tissus sont eux opsonisés par des anticorps spécifiques de la région amino-terminale de la protéine M et, après action du complément, sont phagocytés et détruits par les phagocytes (159, 245). En dehors de la protéine M, d'autres composants de la surface de *S. pyogenes* ont été décrits comme inducteurs d'anticorps opsonisants dont l'endopeptidase ScpA (113, 226, 416). Enfin, des anticorps protecteurs neutralisant la toxicité de SpeA, SpeB et SpeC ont également été décrits (214, 349, 350). Plus récemment, le rôle des récepteurs de type TLR 9 (Toll-like receptor) appartenant à la famille des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires et intervenant dans l'immunité innée, a été démontré *in*



*vivo*. Dans un modèle murin d'infection sous-cutanée nécrosante TLR 9 contribue à l'élimination de *S. pyogenes* notamment en favorisant la production des espèces actives de l'oxygène par les macrophages (520).

L'immunité cellulaire participe également à la protection contre *S. pyogenes* en renforçant la réponse des anticorps ciblant la protéine M notamment (405, 406).

Les prédispositions génétiques semblent aussi avoir une place dans la survenue d'une infection invasive à *S. pyogenes* et dans son évolution. En effet, il existe une corrélation directe entre l'intensité de la réaction inflammatoire de l'hôte et la sévérité de l'infection à *S. pyogenes* ; ainsi, les patients développant une forte réaction inflammatoire en réponse aux super-antigènes sont plus enclins à développer un SCTS que ceux produisant un plus faible niveau de cytokines (348, 352). Par ailleurs, certains haplotypes du HLA de classe II confèrent une protection contre les formes sévères d'infections invasives à *S. pyogenes* alors que d'autres sont plutôt de mauvais pronostic (253, 351). Cette différence résulterait de capacité de liaison variable de certains haplotypes du HLA de classe II pour les super-antigènes de *S. pyogenes* (286, 287). En plus du polymorphisme du HLA de classe II, le polymorphisme des séquences microsatellites du TNF semble également impliqué, certains haplotypes conférant une protection (253).

Une corrélation entre certains haplotypes du HLA de classe II et la survenue de séquelles post-streptococciques a également été retrouvée (182, 330, 335).

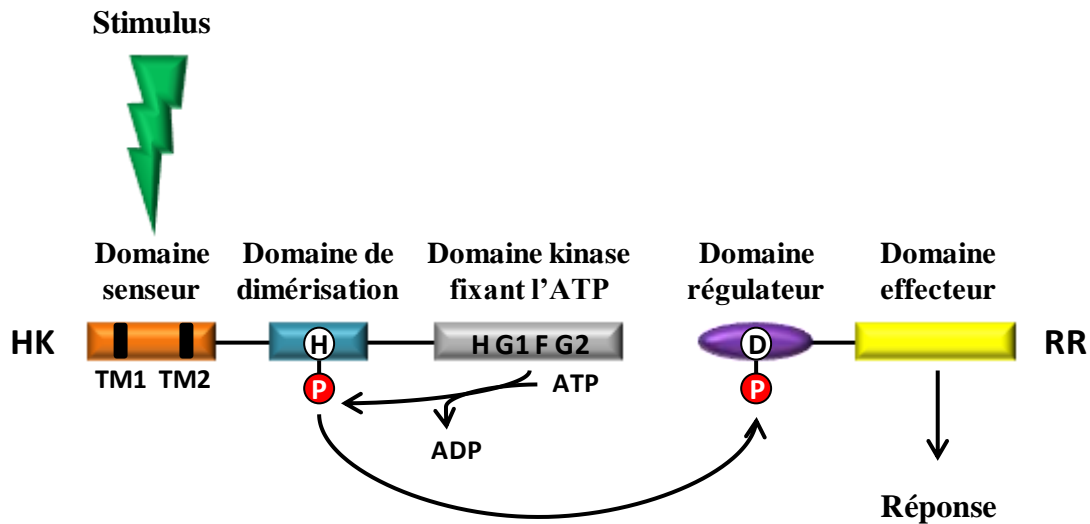
### 3. Adaptation de *S. pyogenes* à son environnement, conséquences sur sa virulence

La diversité des manifestations cliniques de *S. pyogenes* est en partie liée à ses nombreux facteurs de virulence. Ceux-ci sont également nécessaires à l'adaptation de *S. pyogenes* aux différents environnements physiologiques rencontrés au cours du processus infectieux et notamment lors du passage colonisation - invasion. Pour ce faire, *S. pyogenes* a à sa disposition 3 régulateurs transcriptionnels directs dont *mga* (multiple gene activator of GAS) impliqué dans la régulation d'environ 10% du génome incluant les gènes codant la protéine M et la C5a peptidase (pour revue (215)). Par ailleurs, *S. pyogenes* possède 13 systèmes de régulation transcriptionnelle à deux composants (two component system, TCS) lui permettant de « sentir » son environnement et de réguler l'expression de nombreux gènes en réponse aux conditions environnementales et de stress rencontrées (259).

#### 3.1. Le système CovR/CovS

Classiquement un TCS est constitué d'un capteur membranaire de l'environnement avec une fonction histidine kinase (HK) et d'un régulateur cytoplasmique (RR). En réponse à un stimulus le capteur s'autophosphoryle au niveau d'un résidu histidine puis transmet le signal par transfert du groupement phosphate sur un résidu aspartate du régulateur cytoplasmique. Le régulateur phosphorylé se fixe sur les régions promotrices de gènes cibles activant ou réprimant leur transcription en réponse au signal détecté par le capteur ( Figure 11) (511). La transduction du signal détectée par le capteur implique donc les trois réactions de phosphorylation/ déphosphorylation suivantes :





**Figure 11. Représentation schématique d'un TCS classique.**

Le TCS est constitué d'un capteur transmembranaire HK et d'un régulateur cytoplasmique RR. HK est constitué d'un domaine senseur incluant 2 domaines transmembranaires TM1 et TM2, une région conservée contenant les boîtes de fixation à l'ATP H, G1, F et G2 et un domaine histidine kinase catalysant son autophosphorylation sur un résidu histidine (H). Le groupement phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartate (D) situé dans le domaine de régulation du domaine cytoplasmique RR. D'après (511).

Parmi les TCS de *S. pyogenes*, le système CovR/CovS (control of virulence), présent chez toutes les souches, est le plus largement étudié et suscite le plus d'intérêt. En effet, les divers transcriptomes montrent la grande plasticité des gènes régulés par le système CovR/CovS suggérant son rôle majeur dans la virulence de *S. pyogenes*.

De nombreuses équipes se sont attachées à caractériser le système CovR/CovS en recherchant les gènes dont il régule la transcription, les signaux de l'environnement détectés et plus globalement son impact sur la virulence de *S. pyogenes*. Les travaux réalisés utilisant des souches de *S. pyogenes* de génotypes *emm* différents, des modèles animaux non comparables et étudiant soit CovR soit CovS, les résultats obtenus sont sujets à controverse.

### 3.1.1 Le régulon

Initialement, le système CovR/CovS de *S. pyogenes* a été décrit chez des souches dont le phénotype muqueux suggérait une surproduction de l'acide hyaluronique capsulaire associée à une virulence accrue. Dans le but de rechercher un régulateur de l'expression de la capsule, une banque de mutants a été construite par mutation transpositionnelle à partir d'une souche de *S. pyogenes* M3 (279). L'étude des souches muqueuses a permis de mettre en

évidence l'insertion du transposon dans le promoteur d'un opéron contenant 2 ORFs dont le séquençage a montré leur similitude avec les TCS. Ces ORFs ont été initialement dénommées *csrS* et *csrR* pour capsule synthesis regulator sensor component/regulator component. La construction secondaire d'un mutant dans *csrR* a montré une augmentation de transcription de l'opéron *has* responsable de la synthèse de la capsule, suggérant le rôle répresseur de CsrR observé sur la synthèse de la capsule *in vitro*. Ainsi ces travaux ont montré que CsrR, en régulant négativement l'expression de la capsule, influençait la virulence d'une souche de *S. pyogenes* M3.

Par la suite, l'utilisation d'une souche de *S. pyogenes* M6 a permis à Scott et coll. d'obtenir la caractérisation biochimique la plus aboutie *in vitro*, du système CovR/CovS. Le transcriptome de cette souche a montré que le système CovR/CovS régule de façon directe ou non, 15% des gènes de *S. pyogenes* principalement en réprimant leur transcription (117). Parmi ces gènes, CovR réprime de façon directe *in vitro*, la transcription des gènes de virulence *hasA*, *ska*, *sagA* et *sda* codant respectivement la hyaluronate synthase, la streptokinase, la SLS et une DNase, au cours des phases exponentielle et stationnaire de croissance (148). De plus, CovR réprime de façon directe *in vitro* sa propre transcription et celle du gène *rivR* codant un régulateur transcriptionnel type RofA (148, 404). Enfin, il a été montré que la transcription de l'opéron *cov*, réprimée par CovR, pouvait être activée par RocA (regulator of cov) dont le gène *rocA* semble inféodé à l'espèce *S. pyogenes* (57).

Le transcriptome de souches cliniques de *S. pyogenes* M1 a confirmé que le système CovR/CovS régule environ 15% du génome de *S. pyogenes* dont *speA*, *ska*, *sic*, *speJ*, *spyA*, *fba*, *scpA*, *sdaD2*, *hasA*, *hasB*, *hasC*, *mac*, *slo*, *nga*, *spy0115*, *spyCEP*, *sclA*, *grab*, *rgg*, *sagA*, *sagB*, *sagC*, *speB* et *spd* (470). De plus, la répression de *ska*, *sda*, *hasA*, *sagA*, *speB*, et l'opéron *cov* est dépendante de la phosphorylation de CovR (197, 320).

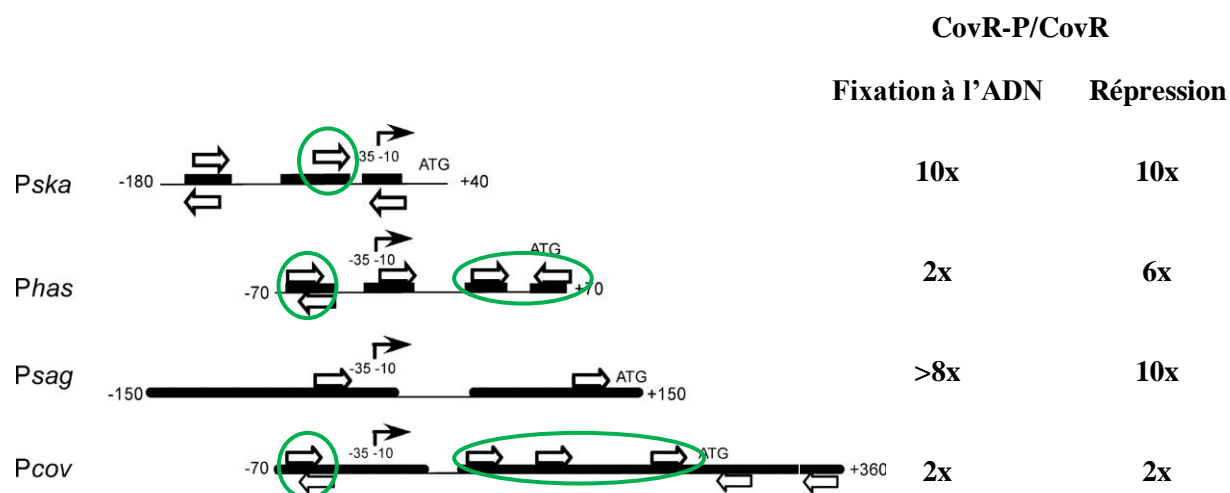
### 3.1.2 Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action du système CovR/CovS comporte encore de nombreuses incertitudes ; la phosphorylation de CovR par CovS n'ayant par exemple, jamais été démontrée *in vitro*. Cependant, l'utilisation d'acétyle phosphate a permis d'étudier les interactions de CovR avec l'ADN et d'identifier le promoteur putatif de certains gènes régulés par le système CovR/CovS.

Ainsi, dans une souche M6, CovR sous forme phosphorylée (CovR-P) a une plus grande affinité pour les promoteurs des gènes *hasA*, *ska*, *sagA* et de l'opéron *cov* que la forme

non phosphorylée, leur répression s'effectuant avec des niveaux variables (Figure 12) (83, 149, 163, 185, 186). Par ailleurs, le ratio CovR-P/CovR est diminué dans une souche délétée de *covS*; cependant, il reste du CovR-P, suggérant que la phosphorylation de CovR peut également être réalisée par une voie différente de CovS (82). Cette hypothèse a été confirmée par la construction d'une souche délétée de *covS* dans laquelle la répression de la transcription de *hasA* par CovR est cependant maintenue (118). La phosphorylation de CovR entraîne sa dimérisation, permet la formation de liaisons stables avec l'ADN au niveau des promoteurs de *sagA*, *hasA*, *sda*, *ska*, *speB* et de l'opéron *cov* dans une région riche en AT, et renforce sa capacité à réprimer, ce qui suggère que le dimère CovR-P constitue la forme la plus active sur l'ADN (185, 186, 320). Cependant l'introduction d'une mutation au site de phosphorylation de CovR (acide aspartique en position 53) ne modifie pas *in vitro* sa fixation à l'ADN évoquant un mécanisme plus complexe (185).

Des régions consensus ATTARA ont été identifiées en amont et en aval des promoteurs des gènes *ska*, *hasA*, *sagA* et de l'opéron *cov* incluant respectivement 4, 5, 2 et 7 copies, pour lesquelles l'affinité de CovR et CovR-P est variable (Figure 12) (83, 149, 163, 185, 186). Ainsi, quatre régions consensus sur les cinq identifiées sont importantes pour la répression *in vitro* du promoteur de *hasA*, la présence des deux thymines consécutives dans chacune d'entre elles étant par ailleurs nécessaire à la fixation de CovR (149). De la même façon, la présence des deux thymines consécutives est nécessaire à la fixation de CovR sur cinq des sept régions consensus identifiées dans l'opéron *cov* (186). La fixation de CovR étant conservée sur deux des régions consensus malgré la substitution des deux thymines consécutives, suggère une coopération des régions consensus pour la répression du promoteur de l'opéron *cov* (186). Une coopération des deux régions consensus situées de part et d'autre du promoteur de *sgaA* a également été démontrée pour la répression par CovR du promoteur de *sagA* (163). La répression du promoteur de *ska* par CovR est très différente, ne nécessitant la fixation de CovR qu'à une seule région consensus située en amont du promoteur (83).



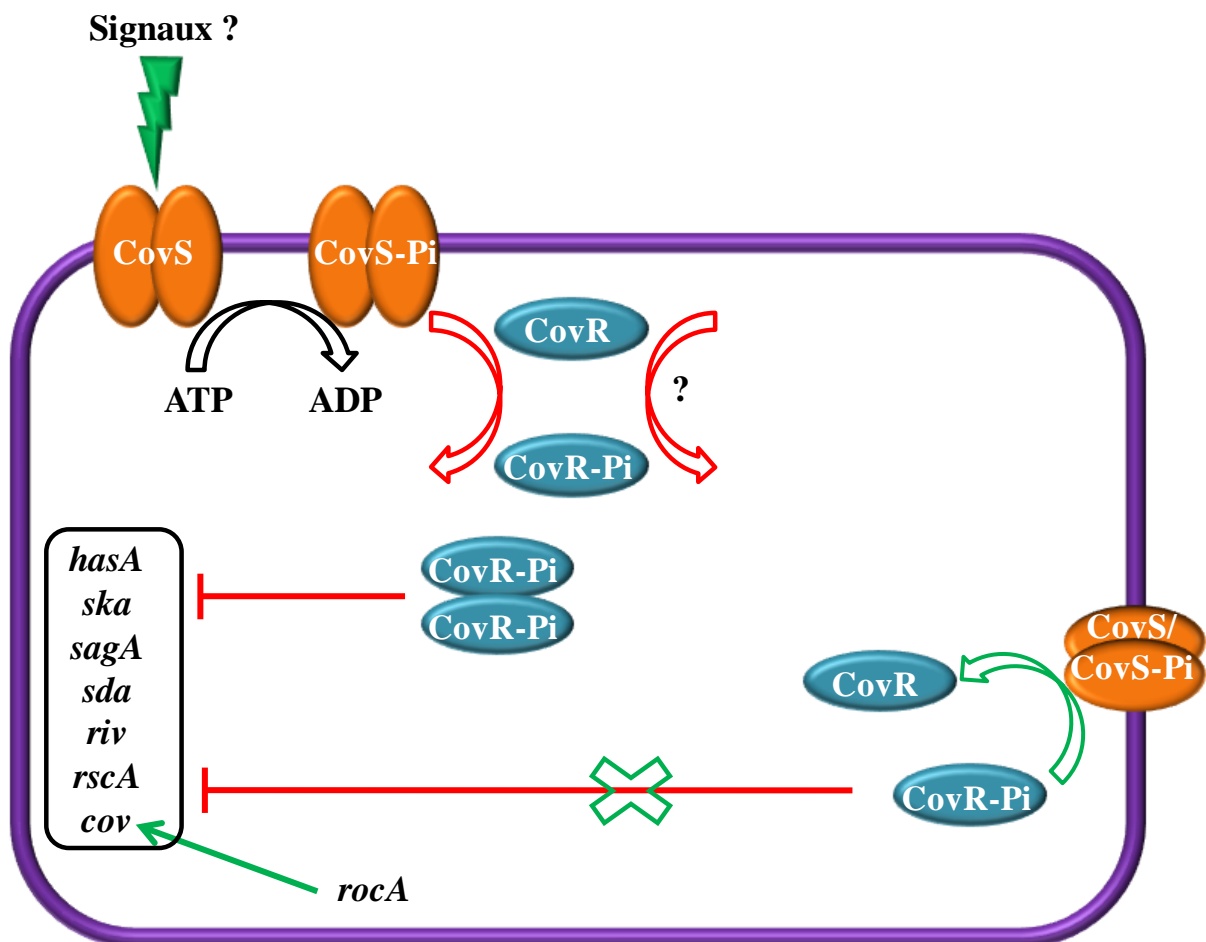
**Figure 12. Sites de fixation de CovR sur les régions promotrices de *ska*, *has*, *sagA* et *cov* et conséquences sur la transcription.**

Représentation schématique des régions promotrices de *ska*, *has*, *sagA* et *cov*. Les régions consensus sont représentées par des flèches blanches. Le point de départ de la transcription est matérialisé par une flèche noire. Les régions consensus indispensables *in vitro* à la transcription sont entourées. Sont indiquées les augmentations de fixation à l'ADN et de répressions consécutives à la phosphorylation de CovR. D'après (82, 83, 149, 163, 186).

Ainsi le mécanisme d'action hypothétique du système CovR/CovS le plus courant suggère que CovS phosphoryle CovR puis celui-ci se dimérise et se fixe au niveau des régions consensus des promoteurs de gènes afin de réprimer leur transcription (Figure 13). Cependant, le rôle exercé par CovS sur CovR ne semble pas uniforme et les conséquences se manifestent de façon différente selon les gènes. Ainsi l'étude de la transcription de *speA*, *speB*, *spd3*, *spy430*, *grab* et *rivR* chez des mutants *covR*, *covS* et *covRS* a permis de distinguer deux groupes de gènes. Un premier groupe constitué de *speA*, *spy430* et *rivR* pour lesquels la répression exercée par CovR est renforcée en présence de CovS. Le deuxième groupe constitué de *speB*, *spd3* et *grab* pour lesquels CovS semble s'opposer à la répression exercée par CovR (487). Un effet opposé de CovS sur la répression exercée par CovR a également été évoqué en étudiant l'influence de l'environnement sur le système CovR/CovS. En effet, une souche délétée de *covS* ne pousse pas à pH6, ni à 40°C ni dans un milieu hyperosmolaire. Dans ces trois conditions; les seules colonies obtenues après culture d'une souche délétée de *covS* possèdent toutes, en plus de leur délétion attendue dans *covS*, une mutation dans *covR* (118). De plus, dans la souche sauvage après culture à 40°C, le promoteur de *has* est dérèprimé confirmant l'aspect muqueux des colonies. Ces observations ont donc permis d'élaborer l'hypothèse qu'en conditions de stress, CovS inactive CovR qui ne peut donc plus

inhiber la transcription de certains gènes (118). Ainsi à 37°C CovR réprime *rscA* (regulated by stress and Cov) codant la protéine RscA (ABC transporteur) alors que son expression est augmentée à 40°C (117). Des résultats similaires ont été obtenus après avoir soumis la souche délétée de *covS* à un chélateur férique (162). Ceci suggère que CovS peut capter différents types de stress et que CovR réprime des gènes impliqués dans le métabolisme du fer, confirmant qu'en plus des gènes impliqués dans la virulence de *S. pyogenes*, le système CovR/CovS régule des gènes impliqués dans l'adaptation à l'environnement. Notamment, CovR augmente de façon indirecte, la transcription du gène *dppA*, codant un dipeptide perméase potentiellement impliquée dans la détoxification de *S. pyogenes* (117, 184). De plus, l'expression de *hasB*, *ska* et *sagBCD* est diminuée en présence de fortes concentrations de MgCl<sub>2</sub> extracellulaire pour une souche de *S. pyogenes* M3, alors qu'elle est inchangée chez le mutant délété de *covS* (180). Ceci suggère que le MgCl<sub>2</sub> extracellulaire est détecté par CovS et que la répression exercée par CovR est renforcée en présence de MgCl<sub>2</sub>. La réalisation d'un transcriptome en présence de MgCl<sub>2</sub> à la concentration finale de 15 mM a montré que l'expression de 73 gènes était modifiée en présence de MgCl<sub>2</sub> chez une souche de *S. pyogenes* M3 contrairement à son mutant délété de *covS* dont l'expression d'un seul gène était modifiée en présence de MgCl<sub>2</sub> (179). Ceci suggère que CovS et l'un des principaux capteurs du MgCl<sub>2</sub> à la concentration extracellulaire de 15 mM. La réalisation d'un autre transcriptome en présence de MgCl<sub>2</sub> à la concentration finale de 1 mM et en utilisant une souche délétée de *covR*, a montré que l'expression de 139 gènes était différente chez la souche sauvage et la souche mutante. Ainsi la comparaison des deux transcriptomes montre que l'expression de 30 gènes est régulée par le système CovR/CovS en réponse à une forte concentration de MgCl<sub>2</sub>. L'analyse détaillée des gènes dont la transcription varie dans ces différentes conditions et différents fonds génétiques suggère que CovS est le principal mais non l'unique détecteur de MgCl<sub>2</sub> extracellulaire, que CovR régule l'expression de certains gènes indépendamment de CovS et, enfin, que l'expression de certains gènes en réponse à une forte concentration de MgCl<sub>2</sub> détectée par CovS est médiée par un autre régulateur transcriptionnel que CovR. L'utilisation de cette même souche de *S. pyogenes* M3 et de son mutant délété de *covS* a permis de montrer que le peptide anti-microbien LL-37, à la concentration sub-inhibitrice de 100 nM, favorise l'expression de *hasB*, *prrF*, *IdeS* et *spy0170* chez la souche sauvage alors qu'elle est très diminuée voire abolie chez le mutant délété de *covS* (181). Ce résultat a été obtenu de façon comparable avec une souche de *S. pyogenes* M1 et son mutant délété de *covS*. De plus, l'augmentation d'expression des gènes codant la synthèse capsulaire en présence de LL-37 est antagonisée par l'addition de MgCl<sub>2</sub> de façon dose dépendante chez la souche

sauvage, suggérant que le LL-37 est détecté par CovS et que CovR ne réprime plus l'expression de ces gènes de virulence en présence de LL-37. L'hypothèse d'un antagonisme entre le  $MgCl_2$  et le LL-37 pour l'expression de gènes régulés par le système CovR/CovS a été confirmée pour 10 gènes d'une souche de *S. pyogenes* M1, l'expression de *speA*, *sda1*, *ska*, *slo*, *nga* et *spy0136* étant favorisée par LL-37 et réprimée par le  $MgCl_2$  contrairement à *metB*, *spy1414*, *grab* et *speB* dont l'expression est favorisée par le  $MgCl_2$  et réprimée par LL-37 (485).



**Figure 13. Représentation schématique du système CovR/CovS.**

Les phosphorylations de CovS et de CovR sont représentées par des flèches noires et rouges. La déphosphorylation de CovR est représentée par une flèche verte vide. Le « ? » représente la phosphorylation de CovR par l'acétyl phosphate voire d'autres voies inconnues. Les barres rouges représentent la répression exercée par CovR sous forme phosphorylée. L'activation du promoteur de l'opéron *covRS* est représentée par une flèche verte. D'après (57, 82, 83, 117, 118, 148, 149, 162, 163, 184-186, 404).

La structure de CovS a été caractérisée en étudiant les interactions entre LL-37 et le système CovR/CovS (Figure 14). La présence d'un résidu aspartate en position 148 et 152



associés à un résidu glutamate en position 151 semble indispensable à l'interaction avec LL-37 avec le domaine extracellulaire de CovS. Enfin, l'étude de la résistance à la phagocytose *in vitro* de la souche sauvage M1, de son mutant délété de *covS* et d'un triple mutant des résidus précédents en présence de LL-37, suggère que le LL-37 provoque l'autophosphorylation de CovS qui à son tour phosphoryle CovR. Ainsi en présence de faible concentration de LL-37, le système CovR/CovS permettrait l'expression de gènes de virulence afin de combattre le système immunitaire inné. La construction de mutants délétés de *slo*, *has* ou les deux à partir d'une souche de *S. pyogenes* M1 délétée de *covR* a confirmé que le LL-37 stimule l'expression de *slo* et *hasB* via le système CovR/CovS favorisant ainsi la résistance à la phagocytose *in vitro* par les PNN et les macrophages (288).



**Figure 14. Représentation schématique de CovS.**

CovS est constituée de 2 domaines transmembranaires (M), un domaine extracellulaire (ECM), un domaine HAMP impliqué dans les changements conformationnels, un domaine histidine kinase (HK) et un domaine ATPase (HATPase). D'après (485).

### 3.1.3 Mutation dans le système CovR/CovS *in vivo*

De façon très élégante, Sumbly et coll. ont démontré le rôle du système CovR/CovS dans la virulence de souches de *S. pyogenes* isolées en médecine humaine (470). Les transcriptomes de 9 souches cliniques de *S. pyogenes* M1 dont 3 souches muqueuses isolées au cours d'infections invasives et 6 souches non muqueuses d'angines ont été comparés. Les résultats des 12 transcriptomes se répartissaient en deux groupes superposables aux manifestations cliniques et montraient environ 10% de différences entre les deux groupes. Une variation de transcription au moins supérieure à deux était observée pour 89 gènes dont 24 gènes de virulence confirmés ou putatifs ; 17 gènes étant surexprimés dans les souches invasives et 7 dans les souches d'angines suggérant une association entre le type de manifestation clinique et la fonction codée par ces gènes. Pour tester cette hypothèse, une souche représentative de chacun des deux groupes a été injectée par voie sous-cutanée à des souris sacrifiées 5 jours après. La culture des rates permettait d'obtenir des colonies muqueuses quelque soit la souche infectante utilisée. La culture des lésions cutanées prélevées chez les souris infectées par la souche invasive donnait des colonies muqueuses contrairement

au mélange de colonies muqueuses et non-muqueuses obtenu après culture des lésions cutanées prélevées chez les souris infectées par la souche d'angine. Les résultats du transcriptome réalisé sur 6 souches obtenues après passage dans l'animal de la souche humaine invasive et de 18 souches obtenues après passage dans l'animal de la souche humaine d'angine sont comparables aux résultats du premier transcriptome qui incluait 9 souches humaines invasives et 6 souches d'angine. Ceci suggère qu'une transition souche non-invasive/invasive est survenue dans l'animal. Pour tester cette hypothèse, les génomes complets des deux souches humaines injectées aux souris ont été séquencés ainsi que ceux d'une souche obtenue après passage dans l'animal de la souche humaine invasive et une souche muqueuse obtenue après passage dans l'animal de la souche d'angine. La comparaison de ces quatre génomes a montré que la souche humaine invasive et sa dérivée obtenue dans l'animal avait des génomes identiques. Les génomes de la souche d'angine et de sa dérivée muqueuse obtenue après passage dans l'animal ne présentaient qu'une seule différence : une insertion de 7 paires de bases dans le gène *covS* après passage dans l'animal. Par ailleurs, les deux souches humaines présentaient 20 différences dont la délétion d'une base dans le gène *covS* de la souche invasive associée à 7 substitutions synonymes d'un seul nucléotide dans 6 gènes chromosomiques et un phage.

Les hypothèses déduites des analyses transcriptomiques ont été confirmées par l'étude de la synthèse, par western blot, des protéines SpeA, SpeB, SLO, Mac et Spd3 dont les transcriptomes avaient suggéré une régulation par le système CovR/CovS. Ainsi la souche invasive mutée dans *covS* surexprimait SpeA, SLO, Mac et Spd3 contrairement à la souche sauvage d'angine qui surexprimait SpeB. De plus, la complémentation *en trans* de la souche invasive par un plasmide codant CovS donnait un profil de western blot identique à celui de la souche d'angine pour SpeA, SpeB, SLO, Mac et Spd3.

D'autre part, l'avantage conféré par la mutation dans *covS* a été testée *in vitro* ; la résistance à la phagocytose des PNN étant supérieure pour la souche humaine invasive mutée dans *covS* que pour la souche sauvage non invasive. La virulence des deux souches humaines a également été testée *in vivo* dans un modèle murin d'infection invasive et dans un modèle d'infection des tissus mous. La souche humaine invasive mutée dans *covS* était également la plus virulente chez la souris, dans un modèle d'infection invasive, comparativement à la souche sauvage d'angine. Au contraire, la souche d'angine provoquait des lésions cutanées plus étendues chez la souris en comparaison de la souche humaine invasive.

Cette étude très complète confirme le rôle majeur du système CovR/CovS dans la virulence de *S. pyogenes* ainsi que sa complexité. En effet, alors que Scott et coll. suggéraient

la présence indispensable de CovS en situation de stress, cette étude montre que *in vivo* la virulence de *S. pyogenes* est accrue en présence de mutation dans *covS*. L'identification de mutations spontanées dans le système CovR/CovS après passage dans l'animal décrite dans cette étude mais aussi par d'autres, suggère néanmoins le rôle central de ce système dans la virulence de *S. pyogenes* (139).

L'hypothèse d'un avantage attribué à une mutation dans le système CovR/CovS pour l'établissement de la virulence de *S. pyogenes*, est corroborée par l'étude d'une autre souche M1 (211). La construction puis l'étude du mutant délété de *covS* a montré une capacité de liaison à la fibronectine et à former du biofilm réduite, une diminution d'adhésion *in vitro* à des kératinocytes et à des cellules laryngées ainsi qu'une capacité à coloniser un modèle murin cutané réduite, tout en conservant la surexpression de sa capsule. Par ailleurs, un cas clinique rapportant l'isolement d'une souche de *S. pyogenes* M81 responsable d'angine et 13 jours plus tard l'isolement par hémoculture chez le même patient de la même souche à l'exception d'une insertion de 11 nucléotides dans *covS* confirme cette hypothèse (164). De plus, le transcriptome d'une souche de *S. pyogenes* M1 utilisée dans un modèle animal d'angine variait tout au long des 86 jours de l'étude ; la transcription du système CovR/CovS étant maximale pendant la phase aiguë de l'infection (494). Cependant, la construction de mutants délétés de *covS* à partir de souches de *S. pyogenes* M2, M6, M18 et M49 a mis en évidence des phénotypes différents soulignant la complexité du système CovR/CovS et la variabilité des souches de *S. pyogenes* (467). Ainsi pour l'ensemble des mutants délétés de *covS* une surexpression de la capsule était observée ainsi qu'une diminution d'adhésion *in vitro* à des kératinocytes. Cependant, la capacité de formation du biofilm et la survie en sang total humain variaient en fonction des souches. Ainsi tous les mutants, à l'exception de celui de la souche M6, formaient moins de biofilm comparativement à la souche sauvage et la survie en sang total était réduite pour tous les mutants sauf la souche M49.

La perte de l'intégrité du système CovR/CovS par des mutations, semble donc importante dans l'établissement de l'invasion par *S. pyogenes* ; en revanche, elle ne lui confère aucun avantage particulier au cours des premières étapes de colonisation de l'hôte. Ainsi, la multiplication *in vitro* dans de la salive humaine a été observée pour une souche d'angine par Sumbly et coll. et non avec la souche mutante délétée de *covS* (487). De plus, la colonisation nasopharyngée d'un modèle murin est inefficace avec des souches de *S. pyogenes* M2 et M75 mutées dans *covR/S* contrairement à leur souche sauvage (6).

Le fonctionnement du système CovR/CovS est complexe ; CovS renforçant ou diminuant la répression exercée par CovR sur l'expression de certains gènes en réponse aux stimuli environnementaux. De plus, récemment il a été démontré que le régulateur transcriptionnel RivR dont l'expression est réprimée par CovR, renforçait la répression exercée par CovR sur l'expression de *hasA* et *grab* (486). Enfin, la régulation du système CovR/CovS est en partie liée à CovR qui réprime la transcription de l'opéron *cov* mais aussi à RocA et Rgg (regulatory gene glucosyltransferase) qui semblent, eux, favoriser la transcription de l'opéron *cov* (57, 79). Néanmoins, le rôle du système CovR/CovS semble fondamental dans le processus infectieux de *S. pyogenes* ; de l'étape de colonisation qui est favorisée par son intégrité, à l'étape d'invasion au cours de laquelle la survenue de mutation dans *covR/S* est associée à une virulence accrue. Sa nécessité pour la colonisation explique en partie pourquoi les souches de *S. pyogenes* mutées dans *covR/S* ne sont pas émergentes malgré l'avantage conféré sur le caractère invasif de ces souches.

### **3.2. Rôle du « quorum sensing » dans la virulence de *S. pyogenes***

*S. pyogenes* a la capacité de moduler l'expression de ses gènes en réponse aux signaux de l'environnement par le système CovR/CovS mais aussi en fonction de la densité de population bactérienne par des systèmes de quorum sensing (QS).

Le système de QS consiste à produire des petits peptides de signalisation ou phéromones qui sont activement secrétées en dehors de la bactérie. Les phéromones s'accumulent dans le milieu extracellulaire et à partir d'une certaine concentration seuil vont être détectées à la surface de la bactérie par l'interaction avec une kinase ou, après réimportation, dans le cytoplasme par l'interaction directe avec une protéine de régulation cytoplasmique. Ainsi le QS permet la coordination des réponses à travers une population bactérienne (321, 503).

La construction d'une banque de mutants par mutation transpositionnelle à partir d'une souche de *S. pyogenes* M14 isolée au cours d'une DHN a permis d'identifier un tel système (205). Le criblage de la banque de mutants chez la souris a mis en évidence l'absence d'un mutant dans la rate suggérant l'insertion du transposon dans un gène de virulence. Le séquençage de ce mutant a permis de mettre en évidence qu'elle était au sein d'un locus dénommé *sil* (streptococcal invasive locus) partageant une forte similarité de séquence avec le

QS impliqué dans la compétence de *S. pneumoniae*. L'utilisation d'un modèle murin d'infection des tissus mous a permis de tester cette hypothèse et de confirmer que le locus *sil* est impliqué dans la diffusion de *S. pyogenes* dans les tissus profonds (205). Ce locus *sil* est constitué de 6 ORFs ; *silA/silB* et *silD/silE* codant respectivement un TCS, SilB étant le senseur et SilA le régulateur, et un ABC transporteur. Enfin *silC* et *silCR* se chevauchent, étant codé chacun par un brin d'ADN, et sont situés entre les deux couples précédents. *silCR* code un peptide de 41 acides aminés, qui, après clivage, donne la phéromone SilCR de 17 acides aminés. *silC* code une protéine dont la fonction reste inconnue mais qui semble impliquée dans la virulence de *S. pyogenes* (205). SilD/SilE clivent puis exportent le pré-peptide de signalisation immature SilCR dans le milieu extracellulaire. Après avoir atteint une certaine concentration seuil, la phéromone mature SilCR se lie au senseur SilB du TCS et SilA à son tour active la transcription de l'opéron *silE/D/CR* (autorégulation) et réprime celle de *silC* (142). Par ailleurs, SilCR est impliqué dans la régulation négative de l'expression du gène codant la protéase SpyCEP compromettant ainsi le recrutement et l'activation des PNN au site infectieux (203, 204). De plus, la co-injection par voie sous-cutanée du peptide mature SilCR et de *S. pyogenes* permet un fort recrutement des PNN et empêche la diffusion de *S. pyogenes* contrairement à l'injection par voie sous-cutanée de *S. pyogenes* seul (203). Le séquençage du locus *sil* de la souche de *S. pyogenes* M14 isolée au cours d'une DHN a permis de mettre en évidence une mutation ponctuelle dans le codon d'initiation de *silCR* (ATA à la place de ATG) le rendant inactif (29, 205).

La survenue d'une mutation au sein du locus *sil* semble importante dans cette souche de *S. pyogenes* M14. Toutefois différentes études épidémiologiques ont montré que la prévalence du locus *sil* s'élevait respectivement à 12% dans des souches non-invasives au Japon, 13% dans une collection de souches invasives et non-invasives en Chine et 16% dans des souches invasives pédiatriques en France (47, 50, 228). Par ailleurs, des mutations ont été décrites dans le gène *silD*, diminuant ainsi la prévalence d'un locus *sil* actif chez *S. pyogenes* (47, 50, 228). En revanche, ce locus a été détecté dans les 12 souches de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* testées, il était actif dans 63% d'entre elles (203). Ces deux espèces échangeant du matériel génétique, le locus *sil* pourrait avoir un rôle plus important dans cette deuxième espèce.

## **Contexte et objectifs des travaux**

---

## Contexte et objectifs des travaux

Notre laboratoire est centre national de référence des streptocoques depuis 2006. Dans le cadre des missions de surveillance qui nous sont imparties, nous centralisons et expertisons toutes les souches qui nous sont adressées, celles-ci étant accompagnées d'un formulaire de renseignements cliniques. Nous disposons donc d'une vaste collection clinico-biologique de souches de *S. pyogenes* que nous avons mise à profit afin d'approfondir les connaissances relatives à l'épidémiologie moléculaire des facteurs de virulence de *S. pyogenes* et d'identifier le ou les déterminants génétiques responsables de la transition colonisation – infections. Dans un premier temps, nous avons donc décrit les marqueurs moléculaires codant des facteurs de virulence ou leur régulateur, présents dans un grand nombre de souches invasives de *S. pyogenes*. Par la suite nous nous sommes attachés à établir une corrélation entre le polymorphisme génétique de ces marqueurs moléculaires et le caractère invasif de nombreuses souches responsables d'infections invasives, non invasives ou de colonisation. De plus, nous avons recherché un lien éventuel entre ces marqueurs moléculaires et la réponse immunitaire innée induite par différentes souches de *S. pyogenes*. Enfin, l'analyse de cas groupés, donc de souches isogéniques, nous a conduit à étudier un des circuits de régulation qui, en modulant la virulence de *S. pyogenes*, est responsable des différences de manifestations cliniques observées au sein de ces cas.

## **Résultats expérimentaux**

---



## **1. Epidémiologie des infections invasives à *S. pyogenes* de l'adulte survenues en France entre 2006 et 2010 : article I, annexe I**

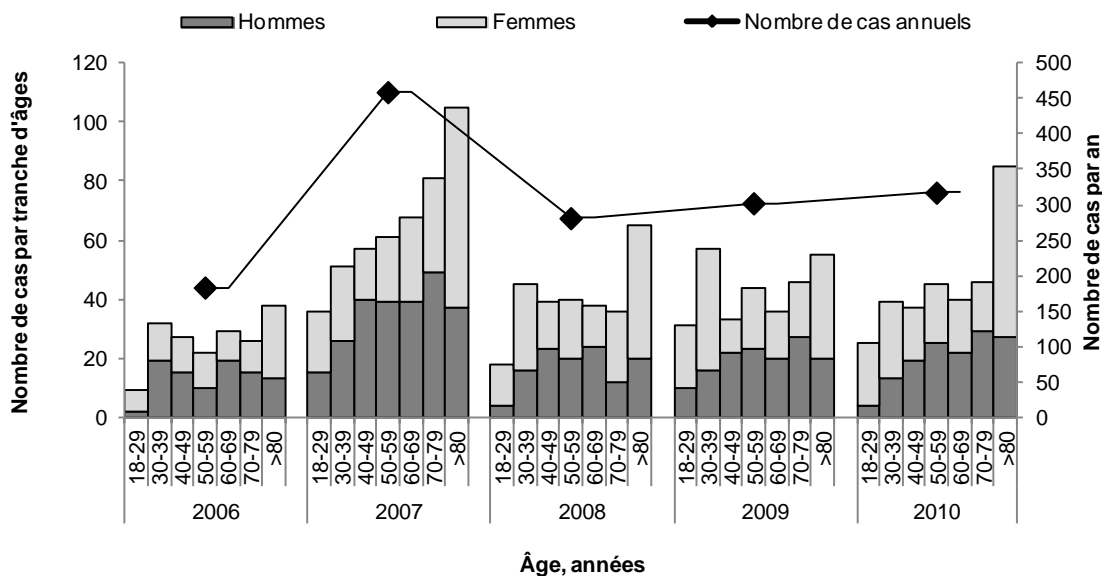
**Publication n°1 : Invasive group A streptococcal infections in adults, France (2006-2010)**

Céline Plainvert, Alexandra Doloy, Julien Loubinoux, Agnès Lepoutre, Gislène Collobert, Gérard Touak, Patrick Trieu-Cuot, Anne Bouvet, Claire Poyart  
Clinical Microbiology and Infection (2012), 18(7) : 702-10

Afin d'étudier l'épidémiologie française des infections invasives à *S. pyogenes*, nous avons sélectionné au sein de la collection du CNR-Strep toutes les souches invasives de *S. pyogenes* isolées entre 2006 et 2010 chez des patients âgés d'au moins 18 ans. Pour chacune des souches nous avons déterminé le génotype *emm*, les gènes de super-antigène et la sensibilité aux antibiotiques (25, 78, 488). Par ailleurs, nous avons analysé les questionnaires de renseignements cliniques, qui accompagnent chaque souche, incluant le sexe, la date de naissance et le lieu de résidence du patient ainsi que la nature et la date du prélèvement.

### **1.1. Caractéristiques démographiques**

Nous avons sélectionné 1 542 souches invasives de *S. pyogenes* isolées entre janvier 2006 et décembre 2010 et adressées par 232 laboratoires répartis sur l'ensemble du territoire (Figure 15). La surreprésentation du nombre des cas en 2007 est en rapport avec l'enquête nationale réalisée conjointement avec l'InVS (278). L'âge médian des patients était de 60,3 ans et 52,4% des cas concernaient des femmes.



**Figure 15. Caractéristiques démographiques des souches invasives de *S. pyogenes* isolées chez l'adulte entre 2006 et 2010.**

Distribution des souches invasives adultes de *S. pyogenes* selon le genre, l'âge et l'année d'isolement.

## 1.2. Caractéristiques cliniques

Parmi les 1 542 infections invasives à *S. pyogenes*, 1 206 (78,2%) cas étaient des septicémies documentées. Les infections de la peau et des tissus mous étaient les plus fréquentes (n=674, 43,7%), incluant 337 cas de DHN (Tableau IX). Les SCTS (n=340, 22%) étaient respectivement 3 et 1,9 fois plus fréquents en cas de DHN ou d'infections pleuro-pulmonaires ( $P < 0,001$ ) qu'au cours des autres manifestations cliniques et concernaient surtout des malades entre 50 et 69 ans ( $P < 0,001$ ). Le taux de mortalité hospitalière, disponible pour 231 cas, était de 15%, s'élevant à 18,1% en cas de DHN et à 44,9% en cas de SCTS.

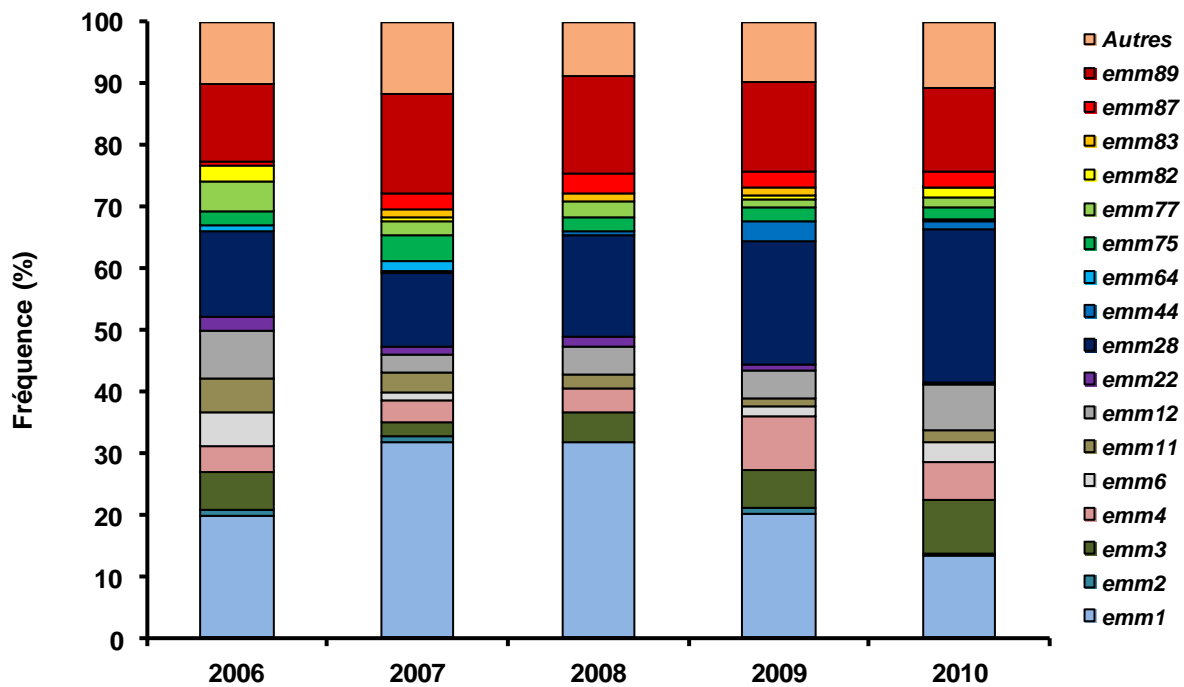




### 1.3. Corrélation génotype *emm* et manifestations cliniques

Un panel de 83 génotypes *emm* différents a été identifié au cours de notre étude, dont les plus fréquents *emm1* (24%), *emm28* (17%) et *emm89* (15%) représentaient à eux trois presque 60% de l'ensemble des souches. La distribution des génotypes *emm* était variable selon les années (Figure 16). Une augmentation significative du nombre de souches *emm28* a été observée dès 2006 (14%) pour atteindre 25% en 2010 ( $P<0,01$ ). Ainsi les souches *emm1*, qui représentaient environ 32 % des souches invasives de *S. pyogenes* en 2007 et en 2008, ne représentaient plus que 15% en 2010 ( $P<0,001$ ).

Nous avons constaté une association entre génotypes *emm* et manifestations cliniques ; les souches *emm1* étaient les plus nombreuses parmi les cas de DHN ( $P<0,001$ ) et d'infections pleuro-pulmonaires ( $P<0,001$ ) alors que les souches *emm28* étaient majoritaires au cours des érysipèles ( $P<0,001$ ) des arthrites septiques ( $P<0,01$ ) et des infections gynéco-obstétricales ( $P<0,001$ ) (Tableau X).



**Figure 16. Fréquence des principaux génotypes *emm* responsables d'infections invasives adultes entre 2006 et 2010**

Sont représentés les 17 génotypes *emm* pour lesquels  $\geq 10$  souches ont été isolées. « Autres » regroupe les souches de génotype *emm* plus rare ( $\leq 9$  souches) : *emm5*, *emm8*, *emm9*, *emm18*, *emm25*, *emm27G*, *emm29*, *emm32*, *emm33*, *emm42*, *emm43*, *emm46*, *emm49*, *emm50*, *emm53*, *emm56*, *emm58*, *emm59*, *emm60*, *emm61*, *emm63*, *emm65*, *emm68*, *emm69*, *emm71*, *emm73*, *emm74*, *emm76*, *emm78*, *emm79*, *emm81*, *emm85*, *emm88*, *emm90*, *emm92*, *emm93*, *emm94*, *emm101*, *emm102*, *emm104*, *emm106*, *emm108*, *emm109*, *emm110*, *emm112*, *emm113*, *emm116*, *emm118*, *emm122*, *emm124*, *st211*, *st221*, *st587*, *st809*, *st854*, *st1389*, *st2037*, *st2147*, *st2460*, *st2861UK*, *st2904*, *st3757*, *stD432*, *stG1750*, *stNS1033*, *stXH1*.

**Tableau X. Corrélation entre les manifestations cliniques et les 17 géotypes *emm* les plus fréquents**

	Nombre de souches (%)																
	Géotypes <i>emm</i>																
Manifestations cliniques	<i>emm1</i>	<i>emm2</i>	<i>emm3</i>	<i>emm4</i>	<i>emm6</i>	<i>emm11</i>	<i>emm12</i>	<i>emm22</i>	<i>emm28</i>	<i>emm44</i>	<i>emm64</i>	<i>emm75</i>	<i>emm77</i>	<i>emm82</i>	<i>emm83</i>	<i>emm87</i>	<i>emm89</i>
<b>SCTS (n=340) 22%</b>	129 (37,9)	2 (0,6)	35 (10,3)	20 (5,9)	10 (2,9)	5 (1,5)	11 (3,2)	0 (0)	34 (10)	2 (0,6)	2 (0,6)	7 (2,1)	6 (1,8)	1 (0,3)	1 (0,3)	6 (1,8)	35 (10)
<b>Infections de la peau et des tissus mous, (n=674) 43,7%</b>																	
Dermo-hypodermité nécroisante (n=337)	108 (32)	2 (0,6)	21 (6,2)	17 (5)	6 (1,8)	4 (1,2)	15 (4,5)	2 (0,6)	42 (12,5)	6 (1,8)	4 (1,2)	12 (3,6)	6 (1,8)	4 (1,2)	4 (1,2)	7 (2,1)	40 (11,9)
Erysipèle (n=150)	26 (17,3)	0 (0)	4 (2,7)	8 (5,3)	4 (2,7)	3 (2)	11 (7,3)	0 (0)	38 (25,3)	3 (2)	1 (0,7)	7 (4,7)	1 (0,7)	1 (0,7)	1 (0,7)	2 (1,3)	30 (20)
Cellulite (n=24)	1 (4,2)	0 (0)	3 (12,5)	1 (4,2)	0 (0)	0 (0)	2 (8,3)	1 (4,2)	1 (4,2)	0 (0)	0 (0)	1 (4,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4,2)	6 (25)
Autres (n=163)	24 (14,7)	3 (1,8)	10 (6,1)	8 (4,9)	3 (1,8)	4 (2,5)	8 (4,9)	1 (0,6)	27 (16,6)	1 (0,6)	2 (1,2)	5 (3,1)	8 (4,9)	3 (1,8)	3 (1,8)	7 (4,3)	24 (14,7)
<b>Septicémie sans foyer n=391 (25,4%)</b>	89 (22,8)	1 (0,3)	21 (5,4)	23 (5,9)	7 (1,8)	14 (3,6)	21 (5,4)	8 (2)	58 (14,8)	4 (1)	3 (0,8)	7 (1,8)	8 (2)	4 (1)	5 (1,3)	11 (2,8)	63 (16,1)
<b>Infections gynéco-obstétricales (n=138) 8,9%</b>																	
Endométrite (n=87)	9 (10,3)	2 (2,3)	2 (2,3)	7 (8)	3 (3,4)	2 (2,3)	2 (2,3)	0 (0)	30 (34,5)	0 (0)	0 (0)	4 (4,6)	4 (4,6)	1 (1,1)	0 (0)	1 (1,1)	17 (19,5)
Péritonite pelvienne (n=29)	10 (34,5)	0 (0)	0 (0)	2 (6,9)	1 (3,4)	1 (3,4)	0 (0)	0 (0)	11 (37,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3,4)	1 (3,4)
Chorioamniotite (n=6)	5 (83,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Autres (n=16)	3 (18,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6,3)	1 (6,3)	0 (0)	1 (6,3)	5 (31,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (12,5)
<b>Infections pleuro-pulmonaires (n=136) 8,8%</b>																	
Pneumonie (n=98)	38 (38,8)	1 (1)	7 (7,1)	7 (7,1)	3 (3,1)	2 (2)	8 (8,2)	1 (1)	10 (10,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)	0 (0)	2 (2)	8 (8,2)
Pleurésie (n=16)	5 (31,3)	0 (0)	3 (18,8)	0 (0)	0 (0)	1 (6,3)	0 (0)	0 (0)	2 (12,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (12,5)	2 (12,5)
Autres (n=22)	10 (45,4)	0 (0)	3 (13,6)	1 (4,5)	0 (0)	0 (0)	2 (9,1)	1 (4,5)	2 (9,1)	0 (0)	0 (0)	1 (4,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (9,1)
<b>Infections ostéo-articulaires (n=107) 6,9%</b>																	
Arthrite septique (n=70)	9 (12,9)	1 (1,4)	1 (1,4)	3 (4,3)	0 (0)	3 (4,3)	3 (4,3)	2 (2,9)	17 (24,3)	1 (1,4)	1 (1,4)	2 (2,9)	3 (4,3)	0 (0)	1 (1,4)	1 (1,4)	13 (18,6)
Bursite (n=16)	2 (12,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6,3)	0 (0)	0 (0)	3 (18,8)	1 (6,3)	0 (0)	1 (6,3)	0 (0)	0 (0)	1 (6,3)	0 (0)	3 (18,8)
Ostéomyélite (n=12)	0 (0)	1 (8,3)	0 (0)	0 (0)	1 (8,3)	0 (0)	1 (8,3)	0 (0)	1 (8,3)	0 (0)	0 (0)	1 (8,3)	1 (8,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (16,7)
Infection sur prothèse (n=7)	1 (14,3)	0 (0)	0 (0)	2 (28,6)	0 (0)	1 (14,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Autres (n=2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Infections abdominales (n=38) 2,5%</b>	7 (18,4)	0 (0)	0 (0)	1 (2,6)	1 (2,6)	1 (2,6)	2 (5,3)	1 (2,6)	10 (26,3)	0 (0)	0 (0)	1 (2,6)	1 (2,6)	1 (2,6)	1 (2,6)	0 (0)	5 (13,2)
<b>Infections du système nerveux central (n=22) 1,4%</b>																	
Méningite (n=20)	9 (45)	1 (5)	2 (10)	0 (0)	1 (5)	1 (5)	0 (0)	0 (0)	3 (15)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5)
Abcès cérébral (n=2)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Nombre de souches (%)

Génotypes *emm*

	<i>emm1</i>	<i>emm2</i>	<i>emm3</i>	<i>emm4</i>	<i>emm6</i>	<i>emm11</i>	<i>emm12</i>	<i>emm22</i>	<i>emm28</i>	<i>emm44</i>	<i>emm64</i>	<i>emm75</i>	<i>emm77</i>	<i>emm82</i>	<i>emm83</i>	<i>emm87</i>	<i>emm89</i>
<b>Manifestations cliniques</b>																	
<b>Infections des voies aériennes supérieures</b>																	
<b>(n=16) 1%</b>																	
Epi-glotte (n=3)	1 (3.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (66.7)
Sinusite (n=1)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Autres (n=12)	4 (33.3)	0 (0)	1 (8.3)	2 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (25)
<b>Autres (n=20) 1.3%</b>																	
Endocardite (n=9)	2 (22.2)	0	1 (11.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22.2)	2 (22.2)
Pyélonéphrite (n=6)	1 (16.7)	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	3 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Infection sur cathéter veineux central (n=5)	1 (20)	0	1 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)c	2 (40)



## 1.4. Association des profils toxiques avec les génotypes *emm*

*speB* appartenant au core génome de *S. pyogenes* et codant la cystéine protéase, a été détecté, comme attendu, chez toutes les souches. De plus, une corrélation entre la présence des gènes de super-antigènes et certains génotypes *emm* a été observée ; *speA* était présent majoritairement dans les souches de génotype *emm1* et *emm3* ( $P < 0,001$ ) alors qu'il était absent des souches de génotype *emm2*, *emm4*, *emm12*, *emm44*, *emm64*, *emm75* et *emm83*. De même, *ssa* a été détecté dans plus de 70% des souches de génotype *emm3*, *emm4*, *emm22* et *emm87* ( $P < 0,001$ ) Au contraire, *speC* a été retrouvé parmi 15 des 17 génotypes *emm* les plus fréquents. Les différentes combinaisons des gènes codant les super-antigènes sont présentées dans la Figure 17.

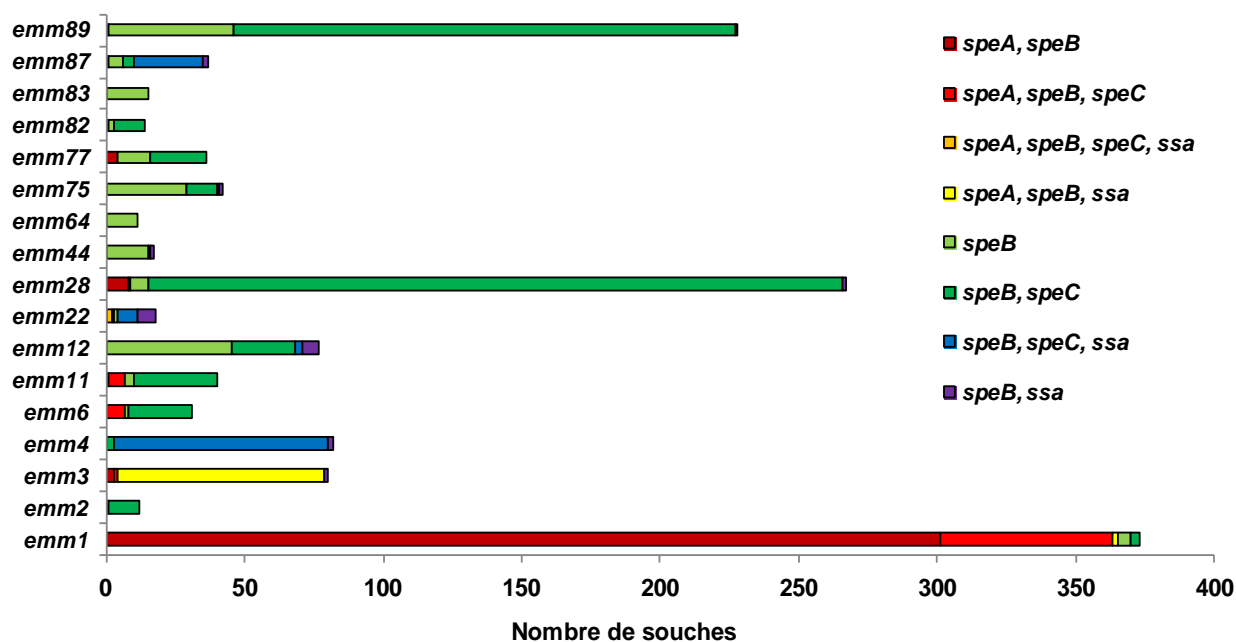


Figure 17. Caractérisation moléculaire des combinaisons de gènes de super-antigènes en fonction du génotype *emm*

## 1.5. Sensibilité aux antibiotiques

Toutes les souches étaient sensibles aux  $\beta$ -lactamines, à la vancomycine, et présentaient un bas niveau de résistance à la gentamicine. Le taux global de résistance à l'érythromycine était de 6,5% (Tableau XI), les deux génotypes *emm* les plus fréquents étant

*emm11* et *emm28* ( $P<0,001$ ). Une diminution de 50% de la résistance à l'érythromycine a été observée au cours de ces 5 années passant de 10,9% en 2006 à 5% en 2010 ( $P<0,02$ ). La distribution des phénotypes de résistances était la suivante :  $MLS_B$  constitutif (71%),  $MLS_B$  inductible (13%) et M (16%). De plus une association entre les gènes de résistances et certains génotypes *emm a* été constatée ; *erm(B)* avec les génotypes *emm11* et *emm28* ( $P<0,001$  et  $P<0,02$  respectivement) et *mef(A)* avec le génotype *emm4* ( $P<0,001$ ).

Le taux global de résistance à la tétracycline s'élevait à 13% (Tableau XI) ; impliquant principalement les génotypes *emm11*, *emm44*, *emm77* et *emm83* ( $P<0,001$ ). Soixante dix huit pourcents des souches résistantes à la tétracycline étaient porteuses de *tet(M)*.

Nous avons dressé au cours de cette étude, l'épidémiologie française des souches de *S. pyogenes* responsables d'infections invasives chez des adultes entre 2006 et 2010. Ces résultats sont comparables à ceux des pays européens et nord américains (265, 289, 357). Les génotypes les plus fréquents étaient *emm1* et *emm28* respectivement associés avec les DHN et les infections gynéco-obstétricales. Nous avons établi une corrélation entre génotype *emm* et gène de super-antigène, *speA* étant significativement associé avec les génotypes *emm1* et *emm3*. Toutes les souches restaient sensibles aux  $\beta$ -lactamines et une diminution de 10,9% à 5% de la résistance à l'érythromycine a été constatée.

**Tableau XI. Résistance aux macrolides et apparentés et à la tétracycline en fonction du génotype *erm***  
 Résistance aux macrolides Résistance à la tétracycline

Génotype	Phénotype				Caractérisation génétique				Phénotype		Caractérisation génétique												
	Total (%)	Erythromycine (%)	Clindamycine (%)	<i>erm</i> (A) (%)	<i>erm</i> (B) (%)	<i>meI</i> (A) (%)	Tétracycline (%)	<i>tet</i> (M) (%)	<i>tet</i> (O) (%)	<i>tet</i> (L) (%)	<i>tet</i> (M)+ <i>tet</i> (L) (%)	<i>tet</i> (M)+ <i>tet</i> (K) (%)											
<i>ermI</i>	373 (24,2)	1 (0,3)	1 (0,3)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)											
<i>erm4</i>	82 (5,3)	6 (7,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	1 (1,2)	1 (0,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)											
<i>erm11</i>	40 (2,6)	22 (55)	21 (52,5)	0 (0)	21 (95)	1 (5)	24 (60)	21 (10,5)	(10,5)	1 (0,5)	1 (0,5)	1 (0,5)											
<i>erm12</i>	77 (5)	5 (6,5)	1 (1,3)	1 (20)	0 (0)	4 (80)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)											
<i>erm22</i>	18 (1,2)	3 (16,7)	3 (16,7)	0 (0)	3 (100)	0 (0)	9 (50)	9 (4,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)											
<i>erm28</i>	267 (17,3)	42 (15,7)	42 (15,7)	0 (0)	42 (100)	0 (0)	1 (0,4)	1 (0,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)											
<i>erm44</i>	17 (1,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	15 (88,2)	13 (6,5)	0 (0)	0 (0)	2 (1)	0 (0)											
<i>erm6-4</i>	11 (0,7)	1 (9,1)	1 (9,1)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	9 (81,8)	9 (4,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)											
<i>erm75</i>	42 (2,7)	3 (7,1)	1 (2,4)	1 (33)	0 (0)	2 (66)	3 (7,1)	1 (0,5)	1 (0,5)	0 (0)	1 (0,5)	0 (0)											
<i>erm77</i>	36 (2,3)	2 (5,6)	2 (5,6)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	27 (75)	6 (3)	21 (10,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)											
<i>erm82</i>	14 (0,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (35,7)	5 (2,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)											
<i>erm83</i>	15 (1,0)	2 (13,3)	2 (13,3)	0 (0)	2 (2)	0 (0)	12 (80)	12 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)											
<i>erm89</i>	228 (14,8)	2 (0,9)	2 (0,9)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	1 (0,4)	0 (0)	1 (0,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)											
<i>Autres</i>	162 (10,5)	11 (6,8)	8 (4,9)	2 (2)	6 (6)	3 (3)	94 (58)	79 (39,5)	0 (0)	1 (0,5)	14 (7)	0 (0)											
<b>Total</b>	<b>1542</b>	<b>100</b>	<b>(6,5)</b>	<b>84</b>	<b>(5,4)</b>	<b>8</b>	<b>(8)</b>	<b>76</b>	<b>(76)</b>	<b>16</b>	<b>(16)</b>	<b>201</b>	<b>(13)</b>	<b>157</b>	<b>(78,1)</b>	<b>23</b>	<b>(11,4)</b>	<b>2</b>	<b>(1)</b>	<b>18</b>	<b>(9)</b>	<b>1</b>	<b>(0,5)</b>

## **2. La réponse immunitaire innée induite par *S. pyogenes* est variable selon les souches cliniques mais reste corrélée au génotype *emm* : article II, annexe II**

**Publication n°2 : The innate immune response elicited by Group A *Streptococcus* highly variable among clinical strains and correlated to the *emm* type**

Márcia Dinis, Céline Plainvert, Pavel Kovarik, Vanessa Lagal, Isabelle Tardieux, Agnès Fouet, Claire Poyart

*Résultats non publiés, article en cours de soumission*

La précédente étude nous a permis de mettre en évidence une corrélation entre certains génotypes *emm* des souches de *S. pyogenes* et leurs manifestations cliniques, liées au tropisme tissulaire, ainsi qu'une association entre les différents génotypes *emm* et les gènes de super-antigènes. D'autres études ont montré l'existence d'un lien entre le caractère invasif des souches de *S. pyogenes* et la présence de certains gènes de super-antigènes (282). Ces derniers sont impliqués dans la stimulation anarchique du système immunitaire de l'hôte conduisant à une réaction inflammatoire exacerbée (348, 352, 446). De plus, alors que les macrophages et les PNN constituent la première ligne de défense immunitaire innée contre la plupart des bactéries pathogènes, leur rôle au cours des étapes précoces de l'infection par *S. pyogenes* reste variable selon les génotypes *emm* (171, 200, 480).

L'étude portait sur un lien éventuel entre (i) le génotype *emm*, les gènes de super-antigènes et le caractère invasif des souches de *S. pyogenes* ainsi qu'entre (ii) le génotype *emm* et la modulation de la réponse des macrophages induite par les différentes souches de *S. pyogenes*.

### **2.1. Sélection d'une collection de souches cliniques de *S. pyogenes* et caractérisation moléculaire**

Au total nous avons sélectionné 60 souches cliniques non redondantes de *S. pyogenes* isolées sur l'ensemble du territoire au sein de la collection du CNR-Strep (Tableau XII). Parmi ces 60 souches, 36 provenaient d'infections invasives (Inv, 59%) associées ou non avec

un SCTS et 24 souches provenaient d'infections non invasives ou de colonisation asymptomatique (NInv, 41%). La souche EC étudiée dans un autre laboratoire a été incluse dans cette collection, constituant notre souche de référence.

La sélection des 60 souches a été réalisée selon leur génotype *emm* afin d'obtenir une collection représentative de l'épidémiologie française ; *emm1* (n=15; 25%), *emm3* (n=11; 18,3%), *emm4* (n=9; 15%), *emm28* (n=13; 21,7%) et *emm89* (n=12; 20%) (Tableau XII). Chaque génotype *emm* comportait à la fois des souches invasives et des souches non invasives ou de colonisation asymptomatique. La détection par PCR des gènes de super-antigènes a retrouvé l'association observée entre les différents génotypes *emm* et les gènes de super-antigènes. En revanche, au contraire de ce que d'autres auteurs ont décrit, nous n'avons pu établir aucune corrélation entre la présence des gènes de super-antigène, ou les génotypes *emm*, et le caractère invasif, non invasive ou de colonisation des souches de *S. pyogenes*.

*Les travaux suivants visant à caractériser les réponses immunitaire et inflammatoire induites par S. pyogenes chez les macrophages ont été réalisés par Márcia Dinis dans le cadre d'un contrat post-doctoral.*

Tableau XII. Caractérisation moléculaire des 60 souches de *S. pyogenes*

Numéro de souches	<i>emm</i> type	Nom de souche <sup>a</sup>	Manifestation clinique	Gènes de toxines
EC700 <sup>b</sup>	<i>emm1</i>	M1 Inv1	Plaie surinfectée	<i>speB, speC, speJ</i>
20030096	<i>emm1</i>	M1 Inv2	DHN+SCTS	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20030192	<i>emm1</i>	M1 Inv3	DHN+SCTS	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20040420	<i>emm1</i>	M1 Inv4	SCTS	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20040427	<i>emm1</i>	M1 Inv5	DHN	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20040562	<i>emm1</i>	M1 Inv6	DHN+SCTS	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20050062	<i>emm1</i>	M1 Inv7	DHN+SCTS	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20070592	<i>emm1</i>	M1 Inv8	DHN+SCTS	<i>speA1-3, speB, speC, speJ</i>
20070779	<i>emm1</i>	M1 Inv9	DHN+SCTS	<i>speA1-3, speB, speC, speJ</i>
20070902	<i>emm1</i>	M1 Inv10	Bactériémie +SCTS	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20040036	<i>emm1</i>	M1 NInv1	Portage pharyngé	<i>speA5, speB, speJ</i>
20050138	<i>emm1</i>	M1 NInv2	Portage pharyngé	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20050374	<i>emm1</i>	M1 NInv3	Portage pharyngé	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20070445	<i>emm1</i>	M1 NInv4	Colonisation vaginale	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20080126	<i>emm1</i>	M1 NInv5	Portage pharyngé	<i>speA1-3, speB, speC, speJ</i>
20080415	<i>emm1</i>	M1 NInv6	Portage pharyngé	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20030233	<i>emm3</i>	M3 Inv1	DHN+SCTS	<i>speA1-3, speB, ssa</i>
20040357	<i>emm3</i>	M3 Inv2	DHN+SCTS	<i>speA4, speB, ssa</i>
20040439	<i>emm3</i>	M3 Inv3	Arthrite septique+SCTS	<i>speA1-3, speB, ssa</i>
20050264	<i>emm3</i>	M3 Inv4	Bactériémie+SCTS	<i>speA1-3, speB, ssa</i>
20060065	<i>emm3</i>	M3 Inv5	Arthrite septique+SCTS	<i>speA1-3, speB, ssa</i>
20070945	<i>emm3</i>	M3 Inv6	DHN+SCTS	<i>speA1-3, speB, ssa</i>
20080115	<i>emm3</i>	M3 Inv7	Pleuro-pneumopathie+SCTS	<i>speA1-3, speB, ssa</i>
20040252	<i>emm3</i>	M3 NInv1	Scarlatine	<i>speA1-3, speB, ssa</i>
20040261	<i>emm3</i>	M3 NInv2	Portage nasal	<i>speA4, speB, ssa</i>
20040325	<i>emm3</i>	M3 NInv3	Scarlatine	<i>speA4, speB, ssa</i>
20050045	<i>emm3</i>	M3 NInv4	Colonisation	<i>speA1-3, speB, ssa</i>
20030145	<i>emm4</i>	M4 Inv1	DHN+SCTS	<i>speB, speC, ssa</i>
20050105	<i>emm4</i>	M4 Inv2	DHN+SCTS	<i>speB, speC, ssa</i>
20060307	<i>emm4</i>	M4 Inv3	Bactériémie+SCTS	<i>speB, ssa</i>
20070799	<i>emm4</i>	M4 Inv4	DHN+SCTS	<i>speB, speC, ssa</i>
20080507	<i>emm4</i>	M4 Inv5	Arthrite septique	<i>speB, speC, ssa</i>
20040260	<i>emm4</i>	M4 NInv1	Portage pharyngé	<i>speB, ssa</i>
20050050	<i>emm4</i>	M4 NInv2	Portage pharyngé	<i>speB, ssa</i>
20050478	<i>emm4</i>	M4 NInv3	Portage pharyngé	<i>speB, speC, ssa</i>
20070934	<i>emm4</i>	M4 NInv4	Portage pharyngé	<i>speB, speC, ssa</i>
20060057	<i>emm28</i>	M28 Inv1	Arthrite septique+SCTS	<i>speB, speC</i>
20060831	<i>emm28</i>	M28 Inv2	DHN+SCTS	<i>speB, speC</i>
20070586	<i>emm28</i>	M28 Inv3	Bactériémie	<i>speB, speC</i>
20070662	<i>emm28</i>	M28 Inv4	Bactériémie	<i>speB, speC, speJ</i>
20070748	<i>emm28</i>	M28 Inv5	Pleuro-pneumopathie	<i>speB, speC, speJ</i>
20070963	<i>emm28</i>	M28 Inv6	DHN+SCTS	<i>speB, speC, speJ</i>
20071009	<i>emm28</i>	M28 Inv7	DHN+SCTS	<i>speB, speC, speJ</i>
20080319	<i>emm28</i>	M28 Inv8	DHN+SCTS	<i>speB, speC</i>
20040035	<i>emm28</i>	M28 NInv1	Angine	<i>speB, speC</i>
20040037	<i>emm28</i>	M28 NInv2	Conjonctivite	<i>speB, speC</i>
20060811	<i>emm28</i>	M28 NInv3	Colonisation vaginale	<i>speB, speC</i>

Numéro de souches	<i>emm</i> type	Nom de souche <sup>a</sup>	Manifestation clinique	Gènes de toxines
20080184	<i>emm28</i>	M28 NInv4	Portage pharyngé	<i>speB, speC, speJ</i>
20080408	<i>emm28</i>	M28 NInv5	Portage pharyngé	<i>speB, speC, speJ</i>
20030451	<i>emm89</i>	M89 Inv1	DHN+SCTS	<i>speB, speC</i>
20050003	<i>emm89</i>	M89 Inv2	DHN+Endocardite	<i>speB</i>
20060051	<i>emm89</i>	M89 Inv3	DHN	<i>speB, speC</i>
20070057	<i>emm89</i>	M89 Inv4	DHN+SCTS	<i>speB, speC</i>
20070249	<i>emm89</i>	M89 Inv5	DHN+SCTS	<i>speB</i>
20070884	<i>emm89</i>	M89 Inv6	DHN+SCTS	<i>speB, speC</i>
20070937	<i>emm89</i>	M89 NInv1	Portage pharyngé	<i>speB, speC</i>
20080105	<i>emm89</i>	M89 NInv2	Surinfection cutanée	<i>speB</i>
20080199	<i>emm89</i>	M89 NInv3	Surinfection cutanée	<i>speB, speC</i>
20080274	<i>emm89</i>	M89 NInv4	Portage pharyngé	<i>speB, speC</i>
20080311	<i>emm89</i>	M89 NInv5	Portage pharyngé	<i>speB, speC</i>
20080412	<i>emm89</i>	M89 NInv6	Portage pharyngé	<i>speB, speC</i>

<sup>a</sup> Invasive (Inv); Non invasive (NInv)

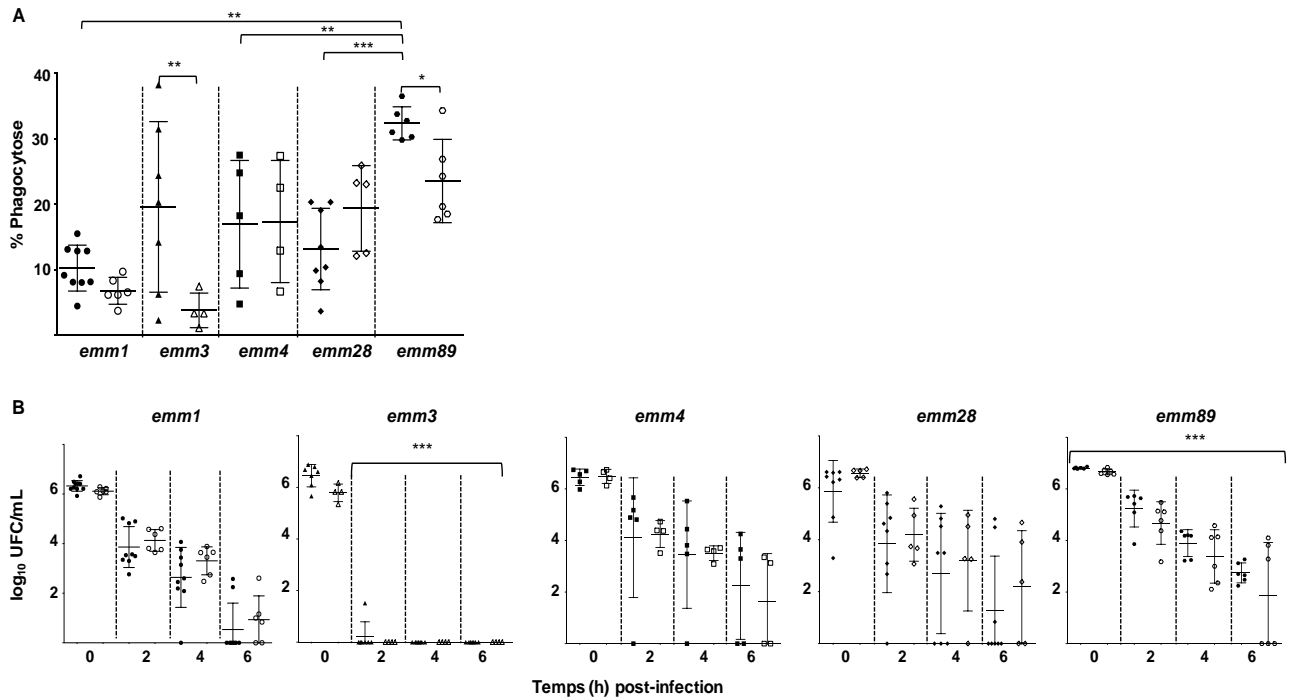
<sup>b</sup> Souche utilisée comme référence obtenue avec E. Charpentier

## 2.2. La phagocytose et la survie dans les macrophages sont variables selon le génotype *emm* et le caractère invasif des souches de *S. pyogenes*

Des macrophages dérivés de moëlle osseuse murine (bone marrow derived macrophages) ont été utilisés afin de déterminer la phagocytose des souches de *S. pyogenes*. Le pourcentage de phagocytose était extrêmement variable selon les génotypes *emm* et au sein des génotypes *emm* en fonction du caractère invasif des souches (Figure 18A). En moyenne, les souches *emm1* et *emm3* étaient moins phagocytées que les autres alors que les souches *emm89* étaient plus phagocytées. En revanche, alors qu'il y a peu de différence en fonction du caractère invasif des souches des *emm 1*, *emm4* et *emm28*, les souches invasives *emm3* et *emm89* sont plus phagocytées que les souches non-invasives de même génotype ( $P<0,01$  et  $P<0,05$  respectivement).

La survie dans les BMDMs était également variable en fonction des génotypes *emm* ; les souches de génotype *emm3* disparaissaient dès 2 heures post-infection ( $P<0,005$ ), contrairement aux souches de génotype *emm89* qui présentaient une survie prolongée ( $P<0,005$ ) (Figure 18B). En revanche, au cours de cette étude aucune corrélation entre le caractère invasif ou non invasif des souches et la capacité à survivre dans les BMDMs n'a été établie.





**Figure 18. Phagocytose et survie dans les macrophages des souches cliniques de *S. pyogenes*.**

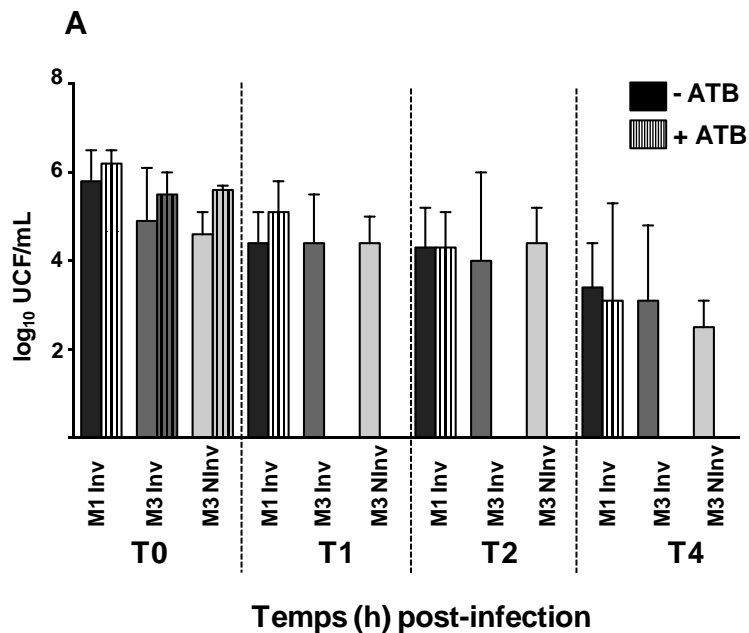
Les BMDMs ont été infectés à la concentration de 100 bactéries par cellule. (A) Pourcentage de phagocytose des souches invasives (symboles noirs) et des souches non invasives (symboles blancs) de *S. pyogenes* selon le génotype *emm*. Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre de bactéries récupérées après un traitement antibiotique de 30 minutes par rapport à l'inoculum initial. Ces résultats représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type de trois expériences indépendantes. Analyse statistique selon le test de Mann-Withney (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,005$ ). (B) Survie dans les BMDMs, représentant le nombre de bactéries récupérées après 2, 4 et 6 heures d'infection exprimé en  $\log_{10}$ . A T0, le nombre de bactéries intracellulaires correspond à la phagocytose. Ces résultats représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type de trois expériences indépendantes. Analyse statistique selon le test de Mann-Withney (\*\*\*  $P < 0,005$ ).

### 2.3. Les souches de génotype *emm3* induisent l'apoptose des macrophages

Aux vues des résultats de survie dans les BMDMs des souches *emm3*, nous avons voulu déterminer si les souches *emm3* étaient plus sensibles à la destruction par les BMDMs ou si au contraire, les souches *emm3* étaient plus toxiques pour les BMDMs et par conséquent détruites par les antibiotiques extracellulaires.

Dans un test de survie dans les BMDMs en présence et en absence d'antibiotiques dans le milieu extracellulaire après le temps de lavage, les souches *emm3* étaient détruites par les

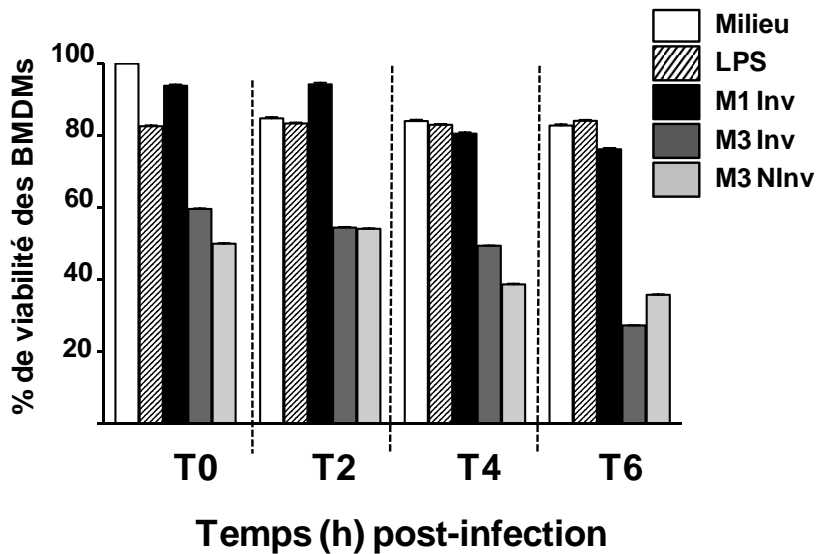
antibiotiques et non par les BMDMs contrairement aux souches *emm1* qui étaient à l'abri des antibiotiques dans les BMDMs (Figure 19).



**Figure 19. Les souches des *S. pyogenes emm3* compromettent les BMDMs.**

Les BMDMs ont été infectés comme précédemment. Après lavage, le milieu a été remplacé par un milieu supplémenté en antibiotiques (ATB) (uni) ou bien par du milieu simple (rayure). La souche *emm1* invasive est en noir, la souche invasive *emm3* en gris foncé et la souche *emm3* non invasive en gris clair. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écart-type de trois expériences indépendantes.

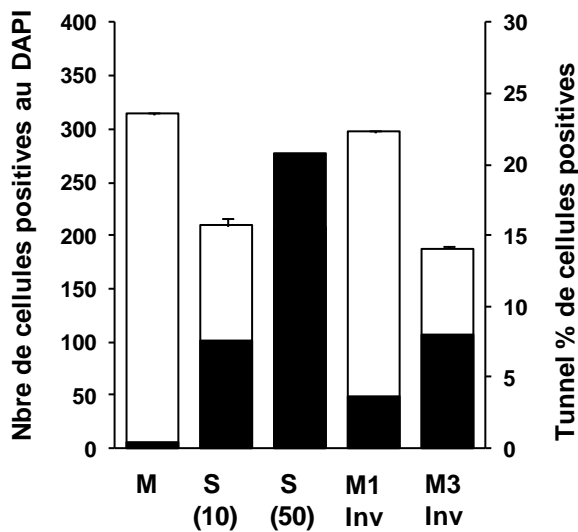
La destruction des bactéries *emm3* par les antibiotiques ajoutés dans le milieu suggérait qu'elles compromettaient la viabilité des BMDMs. Un test utilisant un colorant vital a indiqué que les souches *emm3* altéraient la viabilité des BMDMs, ceci favorisant leur propre destruction par les antibiotiques (Figure 20).



**Figure 20. La viabilité des BMDMs est affectée par les souches de *S. pyogenes emm3*.**

Les BMDMs ont été infectés à la concentration de 100 bactéries pour une cellule pendant 30 minutes à 37°C. Après lavage, les BMDMs ont été incubés avec du milieu supplémenté en antibiotiques. A chaque point, le colorant vital rouge neutre a été ajouté au milieu. Après une incubation de 2 heures à 37°C, les plaques ont été lavées et le colorant révélé avec une solution acide d'éthanol. L'intensité de la coloration a été mesurée à 540 nm. Après avoir soustrait la valeur moyenne des puits sans BMDMs à chaque puit contenant des BMDMs, le pourcentage de BMDMs viables a été calculé par rapport aux valeurs obtenues avec les puits non infectés. Les résultats représentent la valeur moyenne + l'écart-type de deux puits prélevés à différents temps et correspondent à une expérience représentative de trois expériences indépendantes.

Enfin l'utilisation de staurosporine comme inducteur de l'apoptose suggérait que contrairement aux souches de *S. pyogenes emm1*, les souches *emm3* induisaient l'apoptose rapide des BMDMs et permettaient ainsi leur destruction par les antibiotiques (Figure 21).



**Figure 21. Les souches de *S. pyogenes emm3* induisent l'apoptose des BMDMs.**

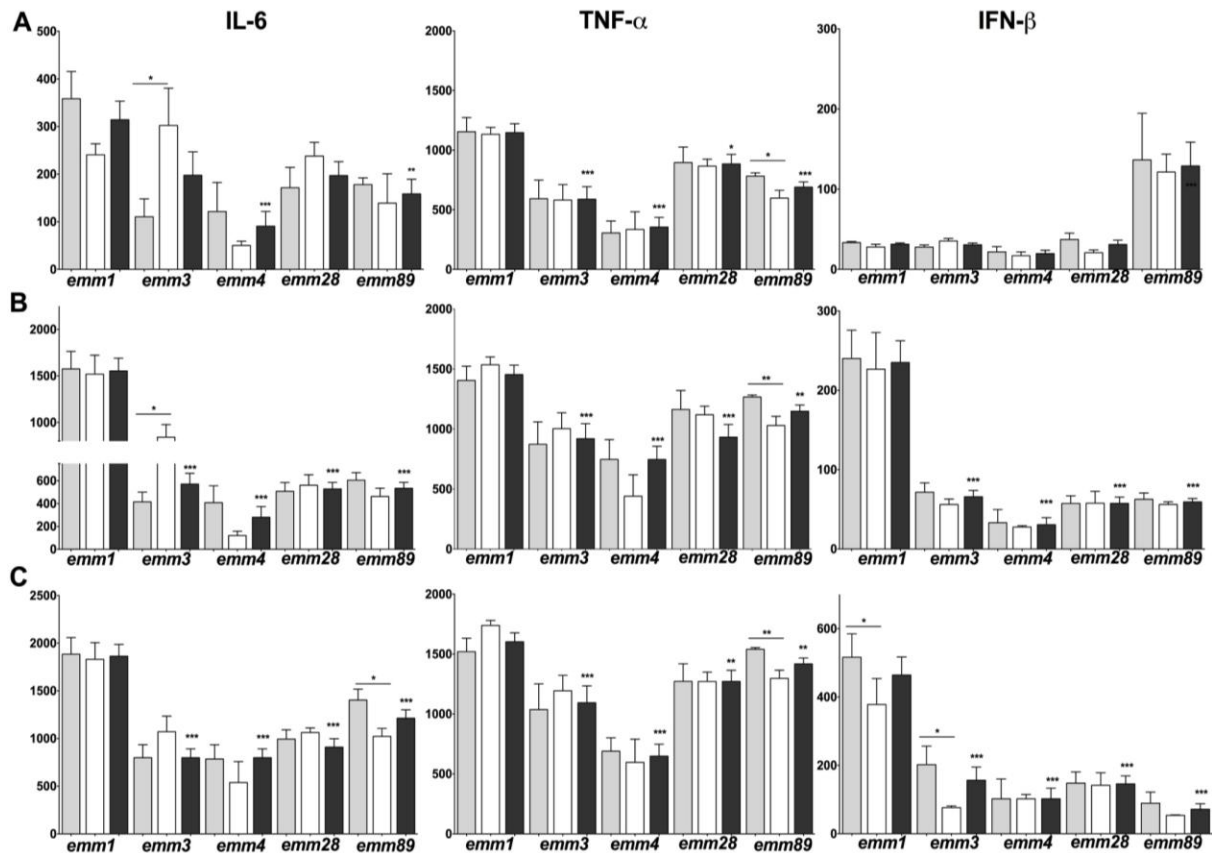
Les BMDMs ont été soit infectés comme précédemment, soit traités avec 10 (S10) ou 50 (S50)  $\mu\text{M}$  de staurosporine (contrôle positif) ou non traité (M, contrôle négatif) pendant 2 heures. Ensuite, les BMDMs ont été fixés et l'apoptose a été déterminée par le système Fluorométrique TUNEL (barres noires, axe des ordonnées de droite). Le nombre total de BMDMs a été déterminé par coloration des nucléoles au DAPI (barres blanches, axes des ordonnées de gauche).

#### 2.4. La sécrétion des médiateurs immunitaires est dépendante du génotype *emm*

Dans cette étude, une production des médiateurs pro-inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$  et anti-inflammatoire IFN- $\beta$  par les BMDMs a été observée pour toutes les souches infectantes de *S. pyogenes* quelque soit le génotype *emm* (Figure 22). Cependant, le niveau de production de IL-6 et TNF- $\alpha$  par les BMDMs était variable selon les génotypes *emm*, les souches infectantes de génotype *emm1* induisant les niveaux de production les plus élevés comparativement aux souches des autres génotypes. Par contre le niveau de production de IL-6 par les BMDMs était indépendant du caractère invasif des souches à l'exception des souches de génotype *emm3* dont les souches non invasives, comparativement aux souches invasives, entraînaient un niveau de production supérieur à T2 et T4. De même le niveau de production de TNF- $\alpha$  par les BMDMs était indépendant du caractère invasif des souches à l'exception des souches de génotype *emm89* pour lesquelles un niveau de production supérieur a été observé avec les souches invasives comparativement aux souches non invasives. La cinétique de production de IFN- $\beta$  par les BMDMs était variable selon les

génotypes *emm*, la production la plus précoce était observée avec les souches de génotype *emm89* même si les souches infectantes de génotype *emm1* induisaient aux temps T4 et T6 le niveau de production le plus élevé comparativement aux souches des autres génotypes. De plus le niveau de production de IFN- $\beta$  par les BMDMs était indépendant du caractère invasif des souches, exception faite des souches de génotype *emm1* et *emm3* dont les souches invasives induisaient un niveau de production supérieur à T6 comparativement aux souches non invasives.

La constitution d'une collection pertinente de souches cliniques de *S. pyogenes* nous a permis de montrer que, *in vitro*, la phagocytose et la survie dans les macrophages est variable selon le génotype *emm* des souches notamment en induisant la production de médiateurs immunitaires de façon variable. Ceci suggère que les étapes précoces de l'infection par *S. pyogenes* varient selon le génotype *emm* des souches.



**Figure 22. Les souches de *S. pyogenes* induisent la production des médiateurs immunitaires par les BMDMs infectés.**

Quantification de IL-6, TNF- $\alpha$  et IFN- $\beta$  dans le surnageant de culture de BMDMs infectés à T2h (A), T4h (B) et T6h (C) post-infection en fonction du génotype *emm* des souches. La valeur moyenne obtenue pour l'ensemble des souches invasives (barres grises) et non invasives (barres blanches) d'un même génotype *emm* sont représentées. Les barres noires représentent la moyenne obtenue pour un génotype *emm* quelque soit le caractère invasif. Les résultats représentent la moyenne + l'écart-type de trois expériences indépendantes. Au sein d'un même génotype les valeurs obtenues pour les souches invasives et les souches non invasives ont été comparées. La valeur moyenne obtenue pour chaque génotype a été comparée à celle obtenue pour les souches de génotype *emm1*. Analyse statistique selon le test de Mann-Withney (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,005$ ).

### **3. La présence du locus *sil* est corrélée au génotype *emm* des souches cliniques de *S. pyogenes* mais pas à leur caractère invasif : article III, annexe III**

**Publication n°3 : Presence of the *sil* locus is correlated to the genetic background but not to the invasive status of *Streptococcus pyogenes* clinical strains**

Céline Plainvert, Márcia Dinis, Anne Bouvet, Emanuel Hanski, Agnès Fouet, Claire Poyart  
*Résultats non publiés, article en cours de soumission*

Le locus *sil*, identifié dans la souche JS95 de *S. pyogenes emm14* isolée chez un patient au cours d'une DHN (205), est constitué de 6 gènes ; *silA/B* et *silD/E* codant respectivement un TCS et un ABC transporteur. *silC* et *silCR* sont localisés entre ces deux couples chacun sur un brin d'ADN et se chevauchent. Le locus *sil*, et notamment *silCR*, est impliqué dans la virulence de *S. pyogenes* (203-205). Le séquençage du locus *sil* de la souche JS95 a mis en évidence une mutation ponctuelle dans le codon d'initiation de *silCR* (ATA à la place de ATG) (29, 205). Par ailleurs, le séquençage du locus *sil* de trois souches *emm4* a identifié un décalage du cadre de lecture dans *silD* (47). La prévalence du locus *sil*, étudiée sur un nombre de souches de *S. pyogenes* restreint, s'élève respectivement à 13% en Chine sur une collection de souches invasives et non invasive et 16% en France sur une collection de souches pédiatriques invasives (47, 228).

Le but de notre étude était (i) d'évaluer la prévalence du locus *sil* dans une large collection de souches cliniques de *S. pyogenes*, (ii) de déterminer s'il existe un lien entre la présence du locus *sil* et les génotypes *emm*, (iii) de définir si le locus *sil* est principalement détecté dans des souches invasives, non invasives ou de colonisation et (iv) de déterminer si, lorsqu'il est présent, le locus *sil* est fonctionnel ou muté, afin de déterminer la prévalence d'un locus *sil* fonctionnel dans des souches de *S. pyogenes* de caractère invasif variable.

### 3.1. Caractéristiques cliniques et épidémiologiques des souches de *S. pyogenes*

Au total, nous avons sélectionné 637 souches cliniques non redondantes de *S. pyogenes* isolées entre 2003 et 2009 sur l'ensemble du territoire, au sein de la collection du CNR-Strep. Parmi ces 637 souches, 435 (68%) provenaient d'infections invasives, 138 (22%) d'infections non invasives et 64 souches (10%) étaient responsables de colonisation asymptomatique (Tableau XIII).

Les 637 souches de *S. pyogenes* ont été sélectionnées afin d'obtenir un panel de génotypes le plus large possible, 87 génotypes *emm* différents ayant été identifiés à l'exception du génotype *emm14* (Tableau XIV). Ainsi toutes les souches d'un même génotype *emm* ont été sélectionnées lorsqu'elles n'excédaient pas 6 souches. L'effectif des 12 génotypes *emm* les plus fréquents a été incrémenté en tenant compte des données épidémiologiques françaises. Enfin, aux vues des résultats préliminaires obtenus avec les génotypes *emm4*, 25, 32, 43, 53, 58, 60, 63, 64, 71, 74, 87, 90, 93, 94, 101 et 102, toutes les souches disponibles pour ces génotypes ont été incluses dans la collection.

### 3.2. Prévalence du locus *sil*

La présence du locus *sil*, déterminée par PCR, a été détectée dans 206 souches appartenant à 42 génotypes *emm* différents, parmi les 637 souches de *S. pyogenes*, (Tableaux XIII et XIV). Nous avons constaté une prévalence du locus *sil* variable selon les génotypes *emm* ; le locus *sil* a été détecté dans 95% (n=93) des souches *emm4* alors qu'il était absent des génotypes *emm1* (n=60), *emm28* (n=58) et *emm89* (n=45), représentant les trois génotypes les plus fréquents en France (265, 278, 384) (Tableau XIII).

Le locus *sil* a été détecté dans 151 (35%) souches invasives, 43 (31%) souches non invasives et 12 (19%) souches de colonisation asymptomatiques (Tableaux XIII et XIV). Parmi les souches de génotype *emm4*, le locus *sil* a été détecté dans respectivement 96 %, 95% et 92% des souches invasives, non invasives et de colonisation asymptomatiques.



Enfin, après avoir tenu compte de la fréquence des différents génotypes *emm* en France en 2009, nous avons estimé la prévalence du locus *sil* à 16 %. Selon le type de caractère invasif, la prévalence du locus *sil* s'élevait respectivement à 18%, 16% et 8% pour les souches invasives, non invasives et de colonisation asymptomatiques suggérant une fréquence moindre dans les souches de colonisation.

**Tableau XIII. Caractéristiques cliniques des 637 souches de *S. pyogenes* et prévalence du locus *sil***

Type de caractère invasif	Manifestations cliniques	Nb de souches	Nb de souches <i>sil</i> <sup>+</sup> <sup>e</sup> (%)	Locus <i>sil</i> fonctionnel présomptif (%) <sup>f</sup>
Invasive				
	Dermo-hypodermite nécrosante	91	32 (35%)	20 (22%)
	Autres infections de la peau et des tissus mous	50	22 (44%)	12 (24%)
	Bactériémie sans foyer	132	50 (38%)	25 (19%)
	Infections gynéco-obstétricales	66	20 (30%)	13 (20%)
	Infections ostéo-articulaires	36	11 (31%)	6 (17%)
	Infections pleuro-pulmonaires	35	9 (26%)	4 (11%)
	Méningite	12	4 (33%)	3 (25%)
	Péritonite	8	2 (25%)	1 (13%)
	Autres <sup>b</sup>	5	1 (20%)	1 (20%)
Total		435	151 (35%)	85 (20%)
Total représentatif <sup>a</sup>		324	57 (18%)	28 (8%)
Non invasive				
	Infections cutanées superficielles	66	20 (30%)	12 (18%)
	Angine	20	2 (10%)	2 (10%)
	Scarlatine	16	9 (56%)	1 (6%)
	Abcès	11	4 (36%)	4 (36%)
	Vaginite	9	3 (33%)	1 (11%)
	Endophtalmie	7	2 (29%)	2 (29%)
	Otite	4	3 (75%)	3 (75%)
	Autres <sup>c</sup>	5	0 (0%)	
Total		138	43 (31%)	25 (18%)
Total représentatif <sup>a</sup>		76	12 (16%)	11 (14%)
Colonisation asymptomatique				
	Pharynx	46	10 (22%)	0 (0%)
	Nez	7	1 (14%)	0 (0%)
	Cutané	6	1 (17%)	1 (17%)
	Autres <sup>d</sup>	5	0 (0%)	0 (0%)
Total		64	12 (19%)	1 (2%)
Total représentatif <sup>a</sup>		12	1 (8%)	0

<sup>a</sup> après prise en compte des souches appartenant aux génotypes *emm* les plus répandus en France. <sup>b</sup> 2 endocardites, 2 échantillons post-mortem et une myocardite. <sup>c</sup> 3 ethmoïdites et 2 infections urinaires. <sup>d</sup> 3 colonisations du nouveau-né et 2 colonisations vaginales. <sup>e</sup> locus *sil* présent. <sup>f</sup> absence de délétion, décalage de cadre de lecture ou mutation conduisant à un codon stop dans les séquences de *silCR*, *silC* et *silD*. Les % relatifs au nombre total de souches, *sil*<sup>+</sup> et *sil*, partageant la même manifestation clinique ou le même type de caractère invasif.

**Tableau XIV. Prévalence du locus *sil* et d'un locus *sil* fonctionnel présumptif parmi les 87 géotypes *emm* différents selon le caractère invasif des 637 souches de *S. pyogenes***

Géotype <i>emm</i>	Nb de souches	Souches invasives			Souches non invasives			Souches de colonisation		
		<i>sil</i> <sup>b</sup>	<i>sil</i> <sup>+c</sup>	Locus <i>sil</i> fonctionnel présomptif (%) <sup>d</sup>	<i>sil</i> <sup>b</sup>	<i>sil</i> <sup>+c</sup>	Locus <i>sil</i> fonctionnel présomptif (%) <sup>d</sup>	<i>sil</i> <sup>b</sup>	<i>sil</i> <sup>+c</sup>	Locus <i>sil</i> fonctionnel présomptif (%) <sup>d</sup>
<i>emm1</i>	60	42	0		7	0		11	0	
<i>emm2</i>	15	9	0		5	0		1	0	
<i>emm3</i>	25	17	1	0	3	0		4	0	
<i>emm4</i>	98	3	64	4	1	18	2	1	11	0
<i>emm5</i>	7	4	0		2	0		1	0	
<i>emm6</i>	19	11	0		5	0		3	0	
<i>emm8</i>	2	2	0		0	0		0	0	
<i>emm9</i>	6	3	1	1	2	0		0	0	
<i>emm11</i>	13	6	0		3	0		4	0	
<i>emm12</i>	24	14	0		6	0		4	0	
<i>emm18</i>	5	0	5	3	0	0		0	0	
<i>emm22</i>	7	4	0		3	0		0	0	
<i>emm24</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm25</i>	3	1	2	2	0	0		0	0	
<i>emm27</i>	2	2	0		0	0		0	0	
<i>emm28</i>	58	39	0		14	0		5	0	
<i>emm29</i>	1	0	1	1	0	0		0	0	
<i>emm30</i>	1	0	0		0	1	1	0	0	
<i>emm32</i>	7	0	5	5	0	2	2	0	0	
<i>emm33</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm41</i>	4	0	3	3	0	1	0	0	0	
<i>emm42</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm43</i>	2	0	1	1	0	1	1	0	0	
<i>emm44</i>	4	2	0		2	0		0	0	
<i>emm48</i>	1	0	0		0	1	1	0	0	
<i>emm49</i>	6	5	0		1	0		0	0	
<i>emm50</i>	2	1	1	1	0	0		0	0	
<i>emm53</i>	3	0	2	2	0	1	1	0	0	
<i>emm55</i>	1	0	0		1	0		0	0	
<i>emm58</i>	7	2	1	1	3	1	1	0	0	
<i>emm59</i>	5	2	0		3	0		0	0	
<i>emm60</i>	11	1	5	5	0	5	5	0	0	
<i>emm63</i>	3	2	0		1	0		0	0	
<i>emm64</i>	4	2	0		1	0		1	0	
<i>emm65</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm66</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm68</i>	3	2	0		0	0		1	0	
<i>emm69</i>	1	1	0		0	0		0	0	

Génotype <i>emm</i>	Nb de souches	Souches invasives			Souches non invasives			Souches de colonisation		
		<i>sil</i> <sup>b</sup>	<i>sil</i> <sup>+c</sup>	Locus <i>sil</i> fonctionnel présomptif (%) <sup>d</sup>	<i>sil</i> <sup>b</sup>	<i>sil</i> <sup>+c</sup>	Locus <i>sil</i> fonctionnel présomptif (%) <sup>d</sup>	<i>sil</i> <sup>b</sup>	<i>sil</i> <sup>+c</sup>	Locus <i>sil</i> fonctionnel présomptif (%) <sup>d</sup>
<i>emm71</i>	3	0	2	2	0	1	1	0	0	
<i>emm73</i>	2	2	0		0	0		0	0	
<i>emm74</i>	3	0	2	2	0	1	1	0	0	
<i>emm75</i>	9	5	0		0	0		4	0	
<i>emm76</i>	5	2	0		3	0		0	0	
<i>emm77</i>	22	13	3	3	2	3	3	1	0	
<i>emm78</i>	4	2	0		1	0		1	0	
<i>emm81</i>	12	9	1	1	2	0		0	0	
<i>emm82</i>	8	7	1	1	0	0		0	0	
<i>emm83</i>	15	12	0		3	0		0	0	
<i>emm85</i>	2	1	1	1	0	0		0	0	
<i>emm87</i>	20	1	14	14	0	4	4	0	1	1
<i>emm88</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm89</i>	45	23	0		11	0		11	0	
<i>emm90</i>	7	0	7	7	0	0		0	0	
<i>emm92</i>	2	1	0		1	0		0	0	
<i>emm93</i>	2	0	2	2	0	0		0	0	
<i>emm94</i>	3	0	3	3	0	0		0	0	
<i>emm100</i>	1	0	0		0	1	1	0	0	
<i>emm101</i>	3	0	3	3	0	0		0	0	
<i>emm102</i>	7	1	4	3	0	2	1	0	0	
<i>emm103</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm104</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm106</i>	3	2	0		1	0		0	0	
<i>emm108</i>	1	0	1	1	0	0		0	0	
<i>emm110</i>	3	1	1	1	1	0		0	0	
<i>emm112</i>	2	1	1	1	0	0		0	0	
<i>emm113</i>	2	1	1	0	0	0		0	0	
<i>emm116</i>	3	2	0		1	0		0	0	
<i>emm117</i>	2	0	2	2	0	0		0	0	
<i>emm118</i>	4	2	2	2	0	0		0	0	
<i>emm122</i>	1	0	1	1	0	0		0	0	
<i>emm124</i>	2	2	0		0	0		0	0	
<i>emm142</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm147</i>	1	0	1	1	0	0		0	0	
<i>emm158</i>	1	0	1	1	0	0		0	0	
<i>emm168</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm172</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm174</i>	1	0	1	1	0	0		0	0	

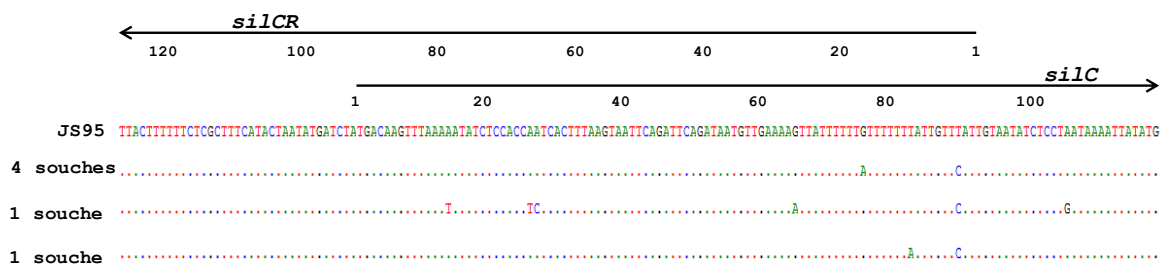
Génotype <i>emm</i>	Nb de souches	Souches invasives			Souches non invasives			Souches de colonisation		
		<i>sil</i> <sup>b</sup>	<i>sil</i> <sup>+c</sup>	Locus <i>sil</i> fonctionnel présomptif (%) <sup>d</sup>	<i>sil</i> <sup>b</sup>	<i>sil</i> <sup>+c</sup>	Locus <i>sil</i> fonctionnel présomptif (%) <sup>d</sup>	<i>sil</i> <sup>b</sup>	<i>sil</i> <sup>+c</sup>	Locus <i>sil</i> fonctionnel présomptif (%) <sup>d</sup>
<i>emm176</i>	3	0	0		3	0		0	0	
<i>emm179</i>	1	0	1	0	0	0		0	0	
<i>emm180</i>	2	2	0		0	0		0	0	
<i>emm182</i>	2	2	0		0	0		0	0	
<i>emm183</i>	1	0	1	1	0	0		0	0	
<i>emm187</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm192</i>	1	0	0		1	0		0	0	
<i>emm217</i>	2	1	1	1	0	0		0	0	
<i>emm230</i>	1	0	1	1	0	0		0	0	
<i>stG1750</i>	1	1	0		0	0		0	0	
Total (%)	637	284	151	85 (30%)	88	43	25 (28%)	52	12	1 (< 1%)
Total représentatif (%) <sup>a</sup>	430	267	57	28 (8%)	64	12	11 (14%)	11	1	0

<sup>a</sup> après prise en compte des souches appartenant aux génotypes *emm* les plus répandus en France. <sup>b</sup> locus *sil* absent. <sup>c</sup> locus *sil* présent. <sup>d</sup> absence de délétion, décalage de cadre de lecture ou mutation conduisant à un codon stop dans les séquences de *silCR*, *silC* et *silD*. Les % sont relatifs au nombre total de souches, *sil*<sup>+</sup> et *sil*<sup>-</sup>, partageant le même type de caractère invasif.

### 3.3. Analyse des séquences de *silC*, *silCR* et *silD*

*silC*, *silCR* et *silD* ont été séquencés dans toutes les souches de *S. pyogenes* pour lesquelles un locus *sil* a été détecté afin de rechercher les mutations initialement décrites dans des souches de génotype *emm14*, *emm4* et *emm18*.

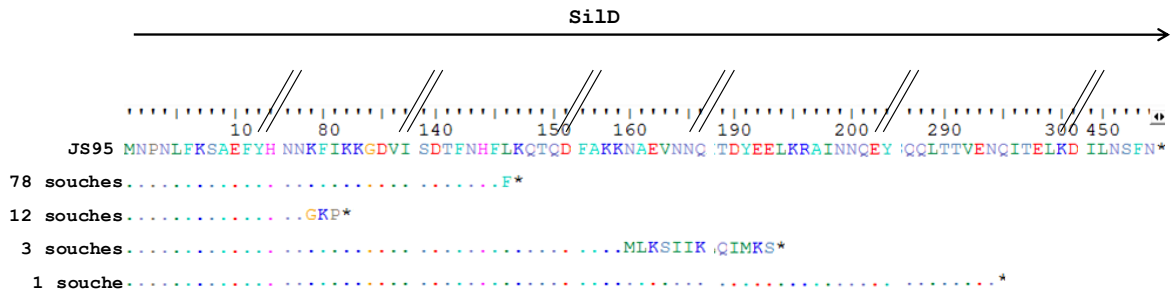
Le codon de démarrage de la traduction de *silCR* était intact dans les 206 souches porteuses du locus *sil* (Figure 23). Les séquences de *silC* et *silCR* obtenues pour les 206 souches étaient identiques à celles de la souche JS95 (exception faite du codon de démarrage de *silCR*) sauf pour 6 souches. Les mutations identifiées dans ces 6 souches étaient non conservatives pour deux souches, conduisant à l'apparition d'un codon stop pour une souche de génotype *emm41* non invasive et au remplacement d'acides aminés non homologues pour une souche *emm4* de colonisation asymptomatique.



**Figure 23. Apparition de mutation dans *silC* et *silCR***

Les gènes *silC* et *silCR* sont symbolisés par des flèches. Sous la séquence des gènes de la souche JS95, sont indiquées toutes les mutations identifiées au cours de cette étude ainsi le nombre de souches dans lesquelles ces mutations sont survenues.

La séquence de *silD* était identique à celle de JS95 pour 55 souches. Des mutations conduisant à un codon stop ont été identifiées dans 94 souches, dont 87 souches *emm4*, et 57 souches présentaient des SNPs (Figure 24). Ainsi parmi les 93 souches *emm4* hébergeant le locus *sil*, seulement trois (3%) possédaient une séquence *silD* identique à celle de JS95, 2 souches non invasives et une souche invasive.



**Figure 24. Apparition de mutation dans *silD***

Le gène *silD* est symbolisé par une flèche. Des fragments de la séquence de *silD* de la souche JS95 sont affichés, séparés par des lignes obliques. Les mutations conduisant à un arrêt prématuré de la traduction ou à des délétions sont indiqués en dessous de la séquence ainsi que le nombre de souches concernées par ces mutations.

Le séquençage de *silC*, *silCR* et *silD* a permis d'identifier 105 souches non *emm4* dont les protéines étaient putativement fonctionnelles, 81 souches invasives, 23 souches non invasives et une souche de colonisation asymptomatique.

Dans cette étude nous avons montré que la présence du locus *sil* est corrélée avec le génotype *emm* des souches de *S. pyogenes*. En revanche, aucune corrélation n'a pu être établie entre la présence d'un locus *sil* potentiellement actif et le type de caractère invasif des souches même si très peu de souches de colonisation asymptomatique possédaient un locus *sil* fonctionnel.

## **4. Une nouvelle mutation dans *covS* favorise le phénotype de colonisation chez *S. pyogenes* : article IV, annexe IV**

**Publication n°4 : A novel *covS* mutation favors *Streptococcus pyogenes* colonization phenotype**

Céline Plainvert, Isabelle Rosinski-Chupin, Gérald Touak, Elisabeth Sauvage, Claire Poyart, Philippe Glaser, Agnès Fouet

*Résultats non publiés, article en cours de soumission*

Afin d'identifier les facteurs responsables de la transition infection non invasive/invasive chez *S. pyogenes*, nous avons recherché l'existence éventuelle de différences génétiques entre des souches invasives et des souches de colonisation. Pour ce faire, nous avons sélectionné 12 souches de *S. pyogenes* isolées au cours de 6 cas groupés incluant chacun une souche invasive et une souche de colonisation. Le séquençage de ces souches a permis d'identifier deux couples de souches dont l'une des deux présentait une mutation dans *covS*. Le système CovR/CovS ayant été décrit comme régulant 15% du génome de *S. pyogenes* (82, 117, 176, 470) et la sélection de mutant *in vivo* renforçant la virulence des souches (139, 164, 211, 470), nous avons étudié les phénotypes de chaque souche ainsi que les profils de transcription, les interactions cellulaires et la virulence de l'un des mutants comparativement à la souche sauvage du même cas groupé.

### **4.1. Une souche invasive et une souche de colonisation appartenant à deux cas groupés différents présentent une mutation dans *covS***

Quatre souches appartenant à deux cas groupés distincts ont été étudiées au court de ce travail (Tableau XV).

Le premier cas groupé était constitué de deux souches de génotype *emm11* dont l'une présente une mutation dans *covS* conduisant à un décalage du cadre de lecture et à un codon



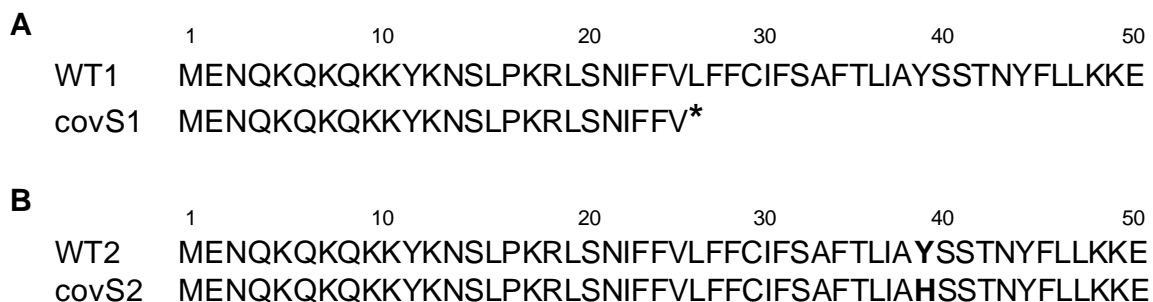
stop à la position 26 (Figure 25A). La souche présentant un gène *covS* sauvage et dénommée WT1 était la souche de colonisation pharyngée. La souche possédant une mutation dans *covS*, dénommée CovS1, correspondait à la souche invasive. Elle présentait une protéine CovS prédite tronquée correspondant au premier domaine transmembranaire.

Le deuxième cas groupé était constitué de deux souches de génotype *emm1* dont l'une présentait une mutation dans *covS* conduisant à la substitution d'une tyrosine par une histidine en position 39 (Y39H), soit à la fin du premier domaine transmembranaire hautement conservée de CovS (Figure 25B). Cette souche a été dénommée CovS2 et la souche présentant un gène *covS* sauvage WT2. Contrairement au cas groupés 1, la souche mutante CovS2 était la souche de colonisation alors que la souche sauvage était la souche invasive (Tableau XV). A notre connaissance cette mutation est décrite pour la première fois ; de plus, il s'agit de la première description d'une souche de colonisation mutée dans *covS* (31, 221).

**Tableau XV. Souches cliniques de *S. pyogenes* étudiées.**

Cas groupés	Souche	Sexe	Age	Prélèvement	Manifestation clinique	Génotype <i>emm</i> <sup>a</sup>	Profil de PFGE
Cas groupés 1	CovS1	F	56	Hémoculture	Péritonite+SCTS	<i>emm11</i>	11-A3
	WT1	M	54	Pharynx	Portage pharyngé	<i>emm11</i>	11-A3
Cas groupés 2	WT2	M	36	Hémoculture	DHN+SCTS	<i>emm1</i>	1-A
	CovS2	M	7	Pharynx	Portage pharyngé	<i>emm1</i>	1-A

<sup>a</sup>, le génotype *emm* a été obtenu comme précédemment (384). <sup>b</sup>, le profil de PFGE a été déterminé comme précédemment (70).



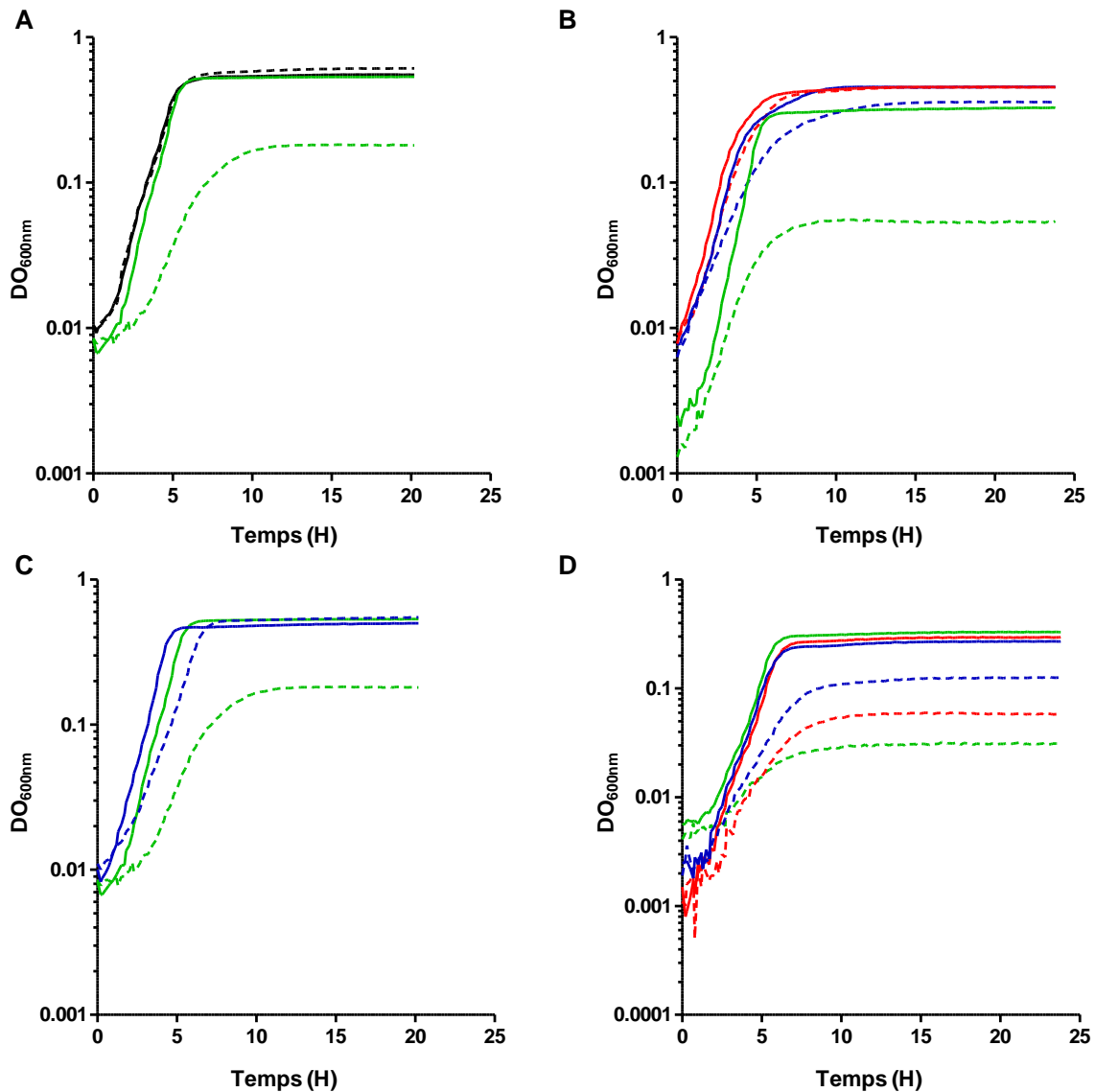
**Figure 25. Alignement des 50 premiers acides aminés des protéines CovS prédites pour les souches des cas groupés 1 (A) et 2 (B).** Les chiffres correspondent à la position des acides aminés. La tyrosine et l'histidine à la position 39 sont en gras.

## 4.2. La mutation de CovS1, et non celle de CovS2, affecte la croissance *in vitro*

Les mutations dans *covS* pouvant avoir un impact sur la croissance des souches de *S. pyogenes* (148, 164, 262, 476), nous avons étudié la croissance *in vitro* de CovS1 et CovS2 comparativement à leur souche sauvage (Figure 26).

La croissance de CovS1 est affectée en milieu THY comparativement à celle de WT1 (Figure 26A) en revanche, elle est similaire à celle de WT1 après addition, au milieu THY, de plasma humain à la concentration finale de 20% et 40% (Figure 26B) suggérant qu'à ces concentrations le plasma humain permet de restaurer la croissance de la souche mutée dans *covS*. CovS ayant été décrite comme le principale capteur du  $Mg^{2+}$  extracellulaire (179, 180, 485), la croissance de CovS1 a été étudiée en présence  $MgCl_2$  ; une concentration finale de 15 mM, permettait de restaurer la croissance de CovS1 (Figure 26C). L'effet d'autres cations divalents comme le  $Ca^{2+}$  ont été testés ; aux concentrations finale de 1 mM et 6 mM la croissance de CovS1 était partiellement restaurée, le meilleur effet étant observé à la plus forte concentration (Figure 26D).

Contrairement à CovS1, la croissance de CovS2 n'était pas affectée en milieu THY (Figure 26A), suggérant que la mutation Y39H n'avait pas d'impact *in vitro* sur la croissance de CovS2.



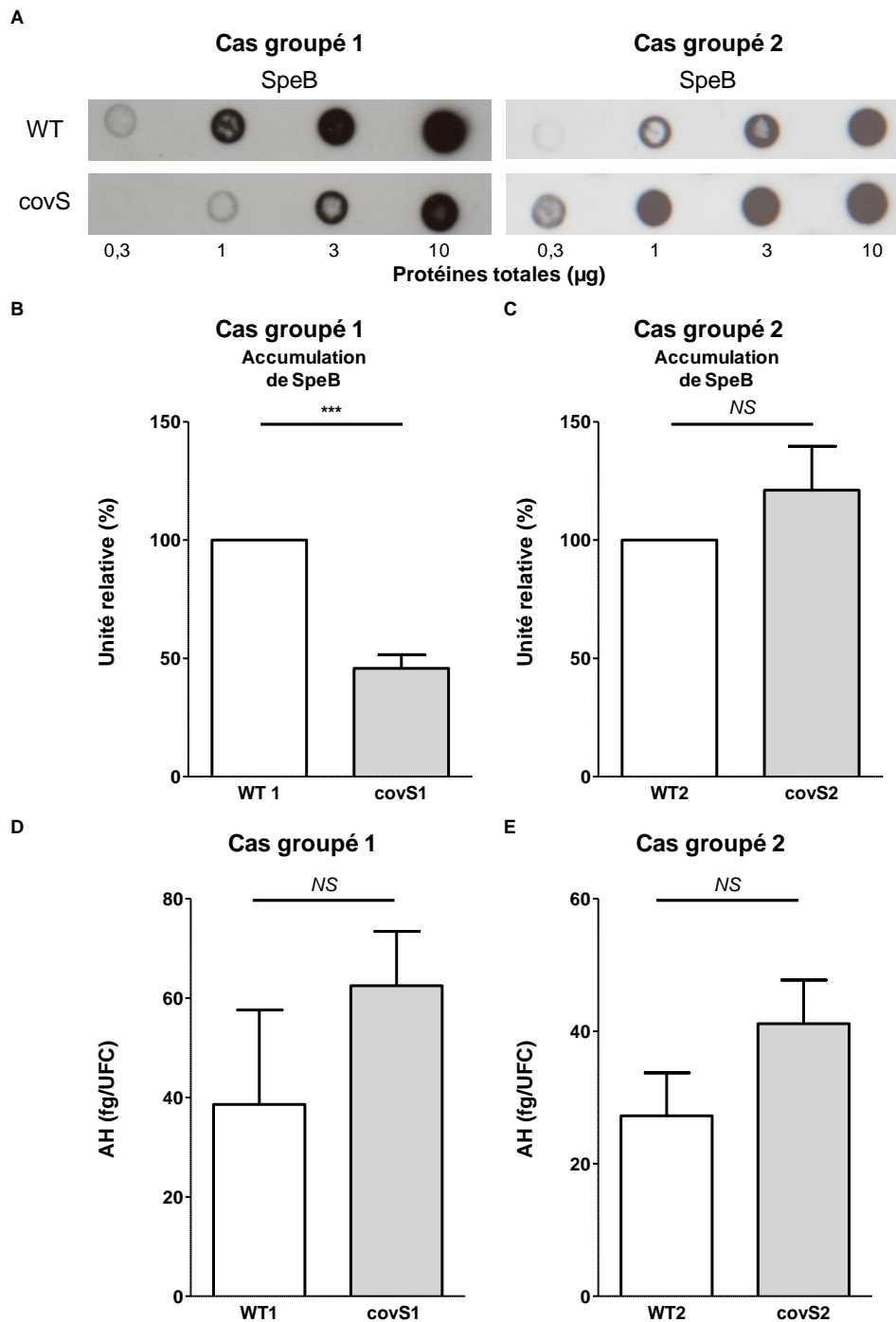
**Figure 26. La croissance de CovS1, contrairement à celle de CovS2, est affectée en THY mais restaurée après addition de plasma humain ou de MgCl<sub>2</sub>.**

Les souches des cas groupés 1 (A, B, C, D) et 2 (A) mises en culture en (A) THY seul ou supplémenté par (B) du plasma humain, (C) du MgCl<sub>2</sub> et (D) du CaCl<sub>2</sub>. Lignes continues, souches sauvages; pointillés, souches mutées. Vert, souches du cas groupé 1 en THY. (A) Noir, souches du cas groupé 2 en THY. (B, C, D) souches du cas groupé 1 mises en culture en THY supplémenté par (B) bleu, plasma humain 40% ; rouge, plasma humain 20%, (C) bleu, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, (D) bleu, 6 mM CaCl<sub>2</sub>; rouge, 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Les résultats montrés sont représentatifs des 3 expériences réalisées.

### 4.3. La mutation Y39H dans *covS* entraîne un profil d'accumulation de SpeB atypique

L'expression de *speB* et *has* étant contrôlée par le système CovR/CovS, nous avons évalué l'accumulation de SpeB et du polysaccharide capsulaire pour chacune des souches mutées dans *covS* comparativement à la souche sauvage correspondante (14, 197, 279, 470, 487, 497).

L'accumulation de SpeB était plus importante pour WT1 que pour CovS1 (45%) (Figure 27A et 27B) suggérant que la perte de CovS diminue l'expression de *speB* dans le fond génétique *emm11*, comme cela a déjà été constaté dans d'autres fonds génétiques (14, 470, 487, 497). Au contraire, l'accumulation de SpeB semblait similaire pour les souches CovS2 et WT2, voire légèrement augmentée pour CovS2 (Figure 27A et 27C), suggérant que la mutation Y39H ne diminuait pas l'accumulation de SpeB, ce qui n'avait jamais été décrit auparavant. Le dosage de l'acide hyaluronique capsulaire a montré un niveau de production légèrement plus élevé, bien que non significatif, pour chacune des souches mutées comparativement à leur souche sauvage. L'ensemble de ces résultats suggérait que CovS1 présentait un phénotype invasif typique, semblable à celui déjà décrit, alors que le phénotype de CovS2 était atypique pour un mutant *covS*.



**Figure 27. La mutation Y39H dans *covS* n'affecte pas l'accumulation de SpeB ni d'acide hyaluronique capsulaire.**

(A) Des dot blots ont été réalisés pour évaluer l'accumulation de SpeB après précipitation des protéines totales du surnageant d'une culture bactérienne en THY (DO 0,3-0,4). Les résultats représentatifs d'une expérience sont présentés. (B, C) Analyse des dot blots par le logiciel ImageJ. L'accumulation de SpeB est présentée en pourcentage relatif à la souche sauvage des cas groupés (B) 1 et (C) 2. Sont présentées la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM) de trois expériences indépendantes. Analyse statistique par un test de Student (\*\*\*)  $P < 0,0001$ . (D, E) Dosage de l'acide hyaluronique (AH) extrait d'une culture bactérienne en THY en milieu de phase exponentielle de croissance. Résultats exprimés en femtogramme (fg) par UFC. Sont présentées la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM) de trois expériences indépendantes. NS, non significatif.

#### 4.4. La mutation Y39H dans *covS* conduit à un profil de transcriptome original

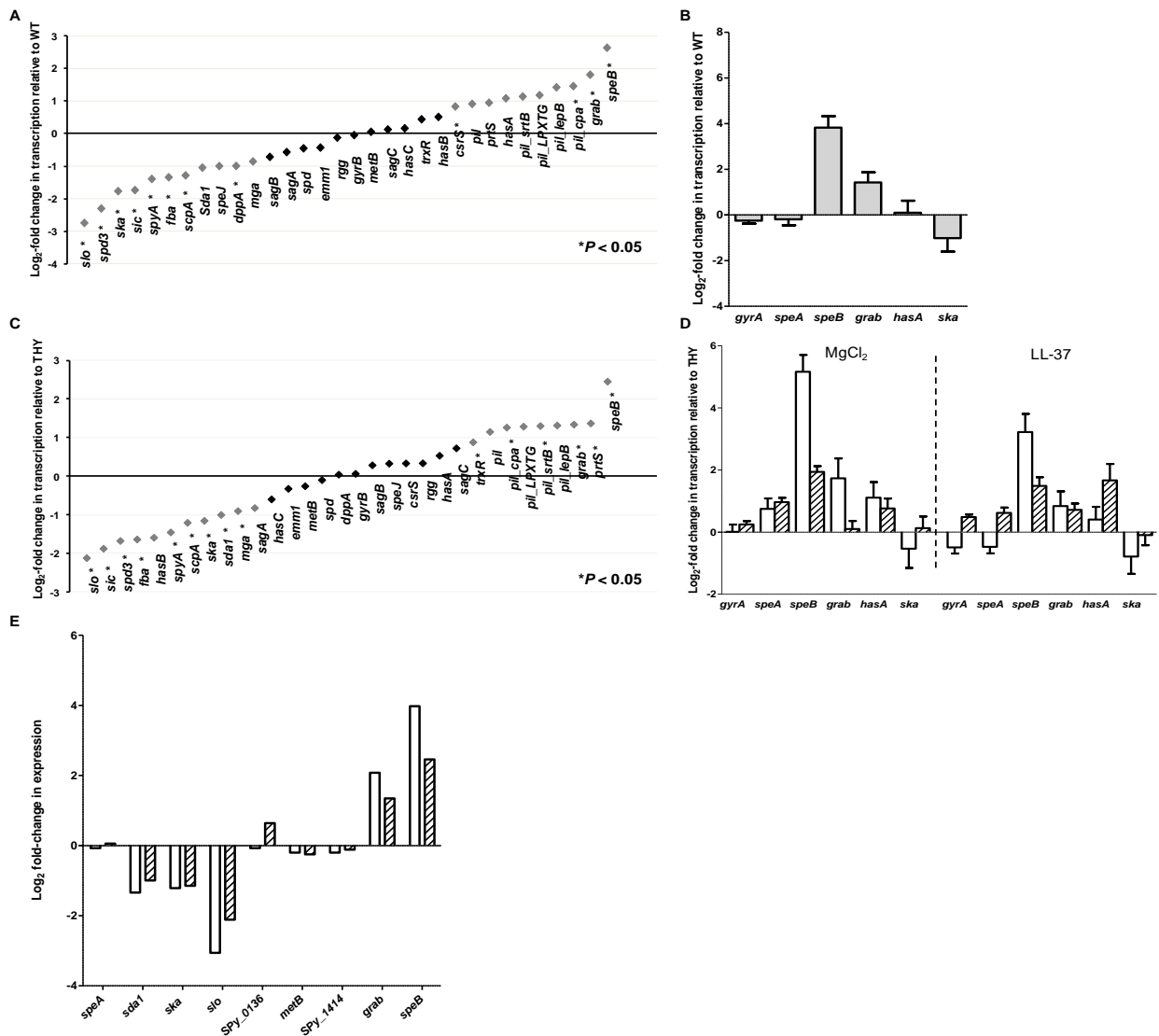
Le phénotype de CovS2 étant atypique, nous avons caractérisé les conséquences de la mutation Y39H dans *covS* en comparant les transcriptomes, obtenus par RNAseq, réalisés sur des cultures de WT2 et CovS2 en phase exponentielle tardive de croissance ( $DO_{600} = 0,6$ ).

L'expression de 47 gènes était différente entre les deux souches (Figure 28A), notamment les gènes codant des facteurs de virulence dont la streptolysine O (*slo*) et la streptokinase (*ska*) qui présentaient une expression plus élevée pour WT2 comparativement à CovS2 (209, 358). Au contraire, pour CovS2 l'expression des gènes codant SpeB, la protéine G liant les IgG (*grab*) et des gènes codant la synthèse du pilus étaient surexprimées comparativement à WT2. L'expression de *has* ne présentait pas de différence entre les deux souches. Ces résultats ont été confirmés par RT-PCR quantitative sur quelques gènes dont l'expression est régulée par le système CovR/CovS (Figure 28B). Ceci suggère que les variations d'expression observées entre WT2 et CovS2 sont opposées à celles décrites habituellement entre une souche sauvage et un mutant *covS*. En effet dans les souches invasives mutées dans *covS*, habituellement les expressions de *speB* et *grab* sont sous-exprimées et celles de *slo* et *ska* sont surexprimées alors que pour CovS2, elles sont respectivement surexprimées et sous-exprimées (179-181, 485).

Pour comprendre ce résultat inhabituel, nous avons testé l'influence du  $Mg^{2+}$  sur le profil des transcriptomes de ces souches (Figure 28C, 28D). L'expression d'au moins 224 gènes était modifiée dans WT2, celles notamment de *speB*, *grab*, des gènes codant la synthèse du pilus et un gène de l'opéron *has* étaient surexprimées en présence de  $Mg^{2+}$  alors que celles de *sci*, *slo*, *spyA*, *spd3* étaient sous-exprimées (Figure 28C). Ces résultats ont été confirmés par qRT-PCR (Figure 28D) suggérant que le  $Mg^{2+}$  entraîne les mêmes effets décrits au préalable pour des souches sauvages, sur l'expression de gènes de virulence (179-181, 485). Pour CovS2, seuls 26 gènes présentaient une expression modifiée après addition de  $Mg^{2+}$ , les degrés des variations observées par RNAseq et confirmées par qRT-PCR étant inférieurs à ceux obtenus avec WT2 (Figure 28C et 28D). Ainsi, comparativement à ce qui avait été observé pour WT2, les variations observées pour CovS2, consécutivement à l'addition de  $Mg^{2+}$ , étaient similaires mais à un moindre niveau, suggérant que la mutation Y39H dans *covS* conduit à une souche qui réagit faiblement à l'addition de  $Mg^{2+}$ .

Nous avons également testé l'influence du LL-37 sur l'expression des gènes de WT2 et CovS2, son effet ayant été décrit comme opposé à celui du  $Mg^{2+}$  sur l'expression des gènes régulés par le système CovR/CovS (Figure 28D et 28E) (179-181, 485). L'addition de LL-37 a entraîné une différence de transcription pour 111 gènes dans WT2, celles de *speB* et *grab* étant surexprimées et celles de *sda1*, *ska* et *slo* étant sous-exprimées ; ceci indique que les modifications induites par le LL-37 dans WT2 sont, de façon inattendue, similaires à celles induites par le  $Mg^{2+}$  sur les gènes régulés par le système CovR/CovS, mais à un niveau moindre. Pour CovS2, l'addition de LL-37 n'avait pratiquement aucun effet sur la transcription des gènes, à l'exception de *speB* dont l'expression était très légèrement surexprimée.

Ces résultats montrent que le LL-37 et le  $Mg^{2+}$  n'ont pas d'effet opposé sur l'expression des gènes dans WT2 et que l'effet observé and CovS2 est très atténué.



**Figure 28. CovS2 présente un profil de transcriptome atypique et répond mal aux signaux environnementaux.**

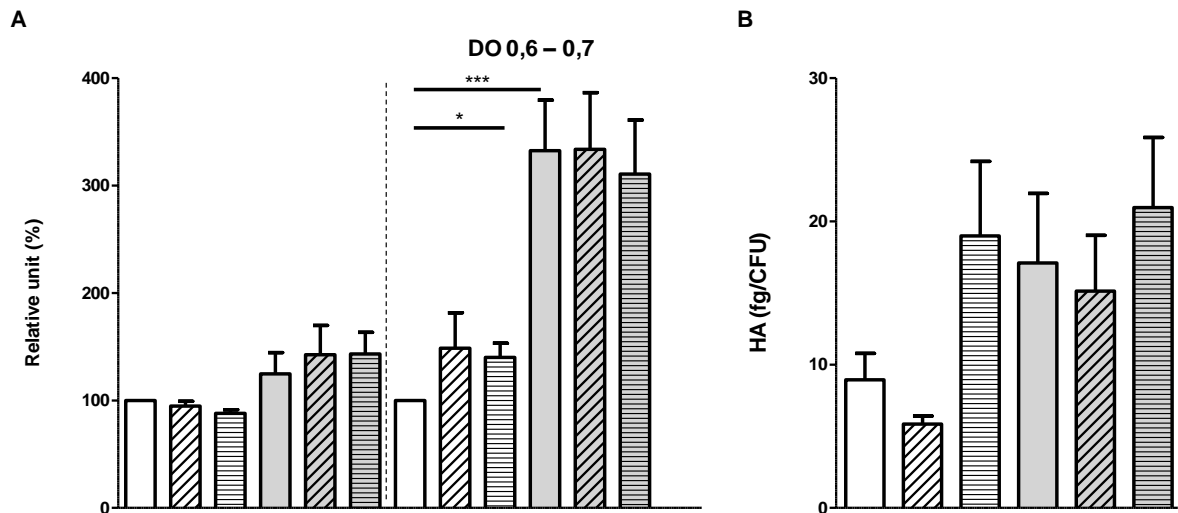
(A) Différences de transcription, exprimée en Log<sub>2</sub>, déterminées par RNAseq entre WT2 et CovS2 pour des gènes sélectionnés. Les gènes en gris situés au dessus et ceux situés au dessous de l'axe des abscisses sont surexprimés respectivement chez WT2 et CovS2, ceux en noir ne présentaient pas de différence de transcription. (B) Différences de transcription, exprimée en Log<sub>2</sub>, déterminées par RT-PCR quantitative entre WT2 et CovS2 pour des gènes sélectionnés. Les gènes situés au dessus et ceux situés au dessous de l'axe des abscisses sont respectivement surexprimés et sous-exprimés chez CovS2 comparativement à WT2. Sont présentées la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM) des qRT-PCR réalisées en duplicate sur 3 extractions d'ARN indépendantes. (C) Différences de transcription, exprimée en Log<sub>2</sub>, déterminées par RNAseq chez WT2 après addition ou non de Mg<sup>2+</sup> pour des gènes sélectionnés. Les gènes en gris situés au dessus et ceux situés au dessous de l'axe des abscisses sont surexprimés respectivement en présence et en absence de Mg<sup>2+</sup> 15 mM chez WT2, ceux en noir ne présentaient pas de différence de transcription. (D) Différences de transcription, exprimée en Log<sub>2</sub>, déterminées par RT-PCR quantitative après addition ou non de Mg<sup>2+</sup> ou de LL-37 pour WT2 (blanc) et CovS2 (hachures) pour des gènes sélectionnés. Les gènes situés au dessus et ceux situés au dessous de l'axe des abscisses sont respectivement surexprimés et sous-exprimés en présence de Mg<sup>2+</sup> ou de LL-37. Sont présentées la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM) des qRT-PCR réalisées en duplicate sur 3 extractions d'ARN indépendantes. (E) Différences de transcription, exprimée en Log<sub>2</sub>, déterminées par RNAseq chez WT2 après addition ou non de Mg<sup>2+</sup> (blanc) ou de LL-37 (hachures) pour des gènes de virulence sélectionnés.



#### **4.5. Le Mg<sup>2+</sup> et le LL-37 influencent l'accumulation de SpeB dans WT2 mais pas dans CovS2**

Nous avons déterminé les conséquences phénotypiques consécutives aux variations de transcriptions observées, en évaluant l'accumulation de SpeB et d'acide hyaluronique capsulaire sur des cultures de WT2 et de CovS2 supplémentées ou non en Mg<sup>2+</sup> ou en LL-37 en phase exponentielle précoce (DO<sub>600</sub> 0,3-0,4) et en phase exponentielle tardive de croissance (DO<sub>600</sub> 0,6-0,7) (Figure 29).

En phase exponentielle précoce, aucune différence significative concernant l'accumulation de SpeB n'a été observée entre les deux souches (Figures 27B, 29A). Cependant, en phase exponentielle tardive de croissance, l'accumulation de SpeB par CovS2 était trois fois supérieure à celle par WT2 en THY ( $P < 0,001$ ) et confirmait les résultats de transcription. L'ajout de Mg<sup>2+</sup> et de LL-37 a également permis de confirmer les résultats de transcription de WT2 à savoir l'absence d'effet opposé des deux signaux sur l'accumulation de SpeB. Les niveaux d'accumulation de SpeB par CovS2 étant similaires après l'ajout de Mg<sup>2+</sup> et de LL-37, confirmaient que CovS2 était devenue hypo-sensible à ces signaux. Le dosage de l'acide hyaluronique capsulaire montrait un niveau de production plus élevé, mais non significatif, dans CovS2 comparativement à WT2 cultivées en THY et l'ajout de Mg<sup>2+</sup> et de LL-37 n'a entraîné aucune modification significative dans aucune des deux souches confirmant également les données de transcription, où aucune différence significative n'avait été observée. (Figures 27C, 29B).



**Figure 29. CovS2 accumule plus de SpeB et répond moins aux facteurs environnementaux que WT2.**

Les protéines totales du surnageant d'une culture bactérienne en THY supplémentée ou non en MgCl<sub>2</sub> 15 mM ou en LL-37 100 nM ont été précipitées. Des dot blots ont été réalisés puis analysés par le logiciel ImageJ. (A) Accumulation de SpeB après une culture en phase exponentielle précoce (DO 0,3 – 0,4) ou tardive (DO 0,6 – 0,7) de croissance. Les résultats sont exprimés en pourcentage relatif à la croissance en THY seul. WT2 (blanc) et CovS2 (gris) ; en présence de MgCl<sub>2</sub> 15 mM (hachures diagonales), en présence de LL-37 100 nM (hachures horizontales). Sont présentées la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM) de trois expériences indépendantes. Analyse statistique par un test de Student (\* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ ). (B) Dosage de l'acide hyaluronique (AH) extrait d'une culture bactérienne en THY supplémentée ou non en MgCl<sub>2</sub> 15 mM (hachures diagonales) ou en LL-37 100 nM (hachures horizontales). Résultats exprimés en femtogramme (fg) par UFC. Sont présentées la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM) de quatre expériences indépendantes.

#### 4.6. WT2 et CovS2 adhèrent de façon similaire aux cellules épithéliales

L'adhésion aux cellules épithéliales étant primordiale au cours de l'étape de colonisation de *S. pyogenes*, nous avons testé la capacité de WT2 et CovS2 à adhérer à différentes lignées cellulaires épithéliales incluant Hep-2 (cellules de carcinome laryngé humain), A549 (cellules d'adénocarcinome pulmonaire humaine), HaCaT (kératinocytes humains) and Hec-1A (cellules d'adénocarcinome de l'endomètre). Aucune différence significative n'a été observée entre WT2 et CovS2 en termes de capacités d'adhésion même si des variations ont été constatées entre les différents types de lignées cellulaires (Tableau XVI), suggérant que la mutation Y39H dans *covS* n'affecte pas les capacités d'adhésion de CovS2.

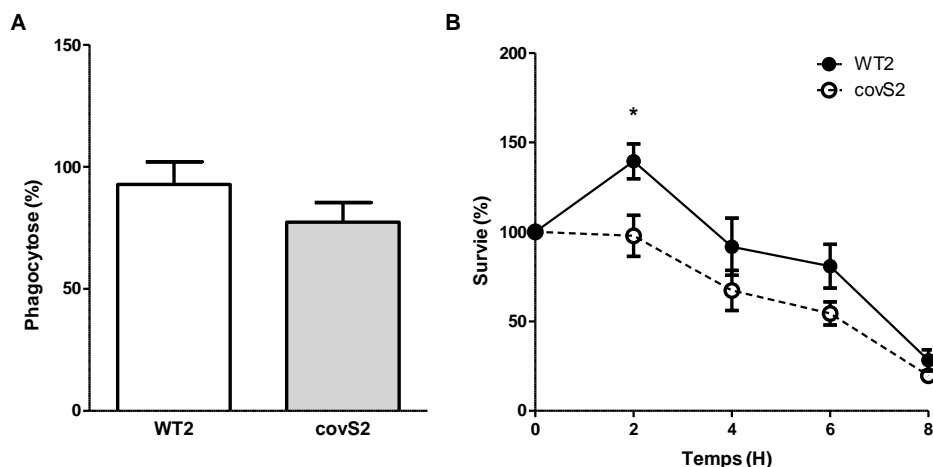
**Tableau XVI. WT2 et CovS2 adhèrent de façon similaire à différentes lignées cellulaires épithéliales**

	Pourcentage d'adhésion cellulaire*			
	Hep-2	A549	HaCaT	Hec-1A
<b>WT2</b>	45.6 ± 6.1	22.3 ± 2.9	35.2 ± 5.4	4.6 ± 0.7
<b>CovS2</b>	35.3 ± 5.3	23 ± 2.6	31.6 ± 6	5.6 ± 0.9

\* Les cellules ont été infectées à la concentration d'une bactérie par cellule pendant une heure à 37°C. Les résultats sont exprimés en pourcentage de bactéries adhérentes après avoir pris en compte le nombre total de bactéries à la fin période d'incubation. Sont présentées la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM) d'au moins trois expériences indépendantes.

#### 4.7. La capacité de survie de CovS2 dans les macrophages est affaiblie

Un rôle de réservoir à *S. pyogenes* ayant été évoqué pour les macrophages (200), nous avons testé les capacités de phagocytose et de survie de WT2 et CovS2 dans la lignée murine de macrophage RAW264.7. WT2 et CovS2 étaient phagocytées à des niveaux similaires (Figure 30A). La survie dans les macrophages a en revanche montré une meilleure survie de WT2 comparativement à CovS2 à T2 ( $P = 0,0149$ ) sans autre différence aux différents temps (Figure 30B) suggérant que la mutation Y39H dans *covS* pouvait altérer la survie dans les macrophages.



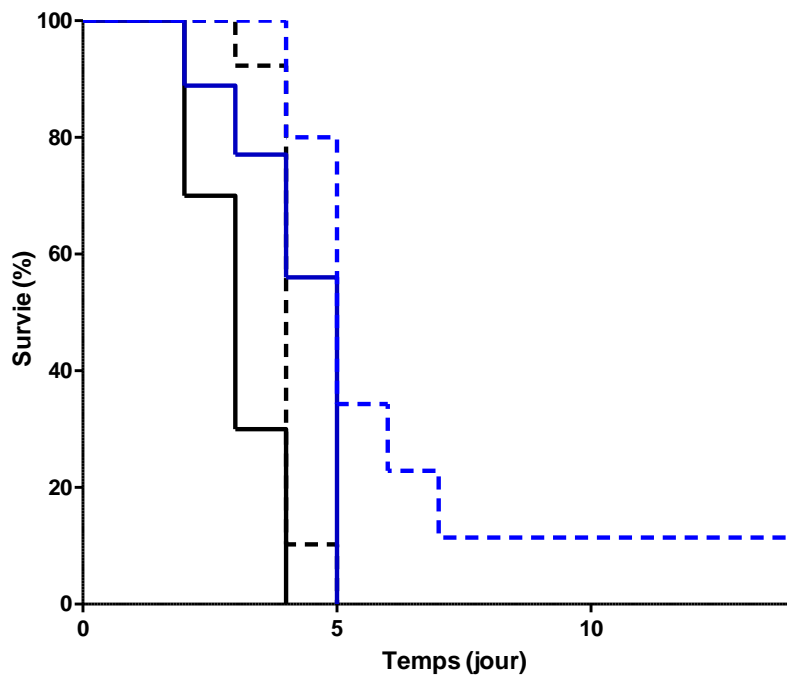
**Figure 30. La capacité de survie de CovS2 est affaiblie.**

(A) La phagocytose a été évaluée avec la lignée murine de macrophage RAW264.7. Les macrophages ont été infectés à la concentration de 10 bactéries par cellule. La phagocytose est exprimée en pourcentage de bactéries intracellulaires par rapport aux bactéries totales après lavages. (B) La survie dans les macrophages a été déterminée avec la lignée murine de macrophage RAW264.7 infectés à la concentration de 10 bactéries par cellule. La survie est exprimée en pourcentage de bactéries intracellulaires à T2, T4, T6 et T8 par rapport au nombre à T0. Sont présentées la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM) de trois expériences indépendantes. Analyse statistique par un test de Student ( $*P < 0,05$ ).

#### 4.8. CovS2 est moins virulente que WT2

CovS2 présentant un phénotype atypique, nous avons évalué sa virulence dans un modèle animal murin. Les souris ont été infectées par voie intraveineuse avec deux doses distinctes pour chaque souche ( $2 \text{ à } 4 \times 10^8$  et  $4 \text{ à } 5 \times 10^7$  UFC) et la survie a été suivie pendant 14 jours (Figure 31). Pour toutes les doses testées, la souche CovS2 était moins virulente que WT2 ( $p=0.0049$  et  $p=0.0005$ , pour la dose la plus élevée et la plus faible, respectivement).

Au total, dans ce travail nous avons caractérisé le phénotype de deux souches présentant une mutation dans *covS*. La première souche qui présentait une mutation conduisant à une protéine prédite CovS tronquée, arborait un phénotype typique des souches mutées dans *covS* corroborant le caractère invasif clinique de cette souche. L'étude du deuxième mutant nous a permis de mettre en évidence un phénotype tout à fait original. En effet, la protéine possédant la mutation Y39H dans CovS, jamais décrite auparavant, semblait moins sensible aux signaux environnementaux, son activité sur CovR semblant constitutive. Enfin, l'acquisition de la mutation Y39H dans CovS se traduisait par un phénotype de type colonisation, confirmé par les données du transcriptome et conduisait *in vivo* à une moindre virulence.



**Figure 31. CovS2 est moins virulente que WT2 dans un modèle murin d'infection invasive.**

Les souris (n=10) ont été infectées par voie intraveineuse avec WT2 (noir) ou CovS2 (bleu), à la dose de  $2 \times 10^8$  et  $4 \times 10^8$  UFC (lignes continues noire et bleue, respectivement), ou  $4 \times 10^7$  et  $5 \times 10^7$  UFC (lignes pointillées noire et bleue, respectivement) et la survie des animaux a été surveillée pendant 14 jours. Analyse statistique par le test de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

## **Discussion et perspectives**

---

## Discussion et perspectives

*S. pyogenes* est responsable d'un large éventail de manifestations cliniques dont la sévérité et le tropisme tissulaire sont très variables. *S. pyogenes* est également extrêmement diverse sur le plan génétique, les souches possédant un répertoire très changeant de facteurs de virulence. Des liens ont été établis entre fond génétique et tropisme tissulaire et, entre fond génétique et pathologie mais seulement pour les DHN et SCTS. De plus, la présence d'aucun facteur de virulence ne rend compte à elle seule d'une manifestation clinique.

Au cours de ce travail, nous avons cherché à identifier le ou des déterminants génétiques responsables de la transition colonisation – infections invasives. Pour cela, tirant partie de la large collection de souches du CNR-Strep, nous avons recherché la présence des marqueurs moléculaires codant des facteurs de virulence, ou leurs régulateurs, dans un grand nombre de souches de *S. pyogenes*. Ainsi nous avons pu établir une corrélation entre le génotype *emm* des souches de *S. pyogenes* et la présence de certains gènes de super-antigènes. De plus notre étude a permis de mettre en évidence une corrélation entre les génotypes *emm* et les gènes de résistance aux macrolides et à la tétracycline. Ces résultats, déjà décrits dans d'autres pays, suggèrent que les souches de *S. pyogenes* circulant en France appartiennent aux principaux clones de répartition mondiale (11, 51, 90, 99, 230, 278, 289, 294, 295, 301, 379, 401, 423, 434). Par ailleurs, certaines études réalisées sur un nombre restreint de souches de *S. pyogenes* suggéraient que la présence du locus *sil*, codant un système de quorum sensing était limitée à certains génotypes *emm* (47, 50, 228). Nos résultats, obtenus sur un très large panel de génotypes *emm* ont confirmé cette hypothèse, incriminant également les génotypes *emm* concernés par la présence du locus *sil*. Il est à noter que 82% des souches de génotype *emm4*, génotype au sein duquel la prévalence du locus *sil* était la plus élevée, partagent une même délétion de 516 paires de bases dans *silD*, suggérant le caractère clonal de cette mutation. L'ensemble de ces constatations suggèrent que différents mécanismes peuvent être mis en jeu lors de l'évolution du patrimoine génétique des souches de *S. pyogenes*. En ce qui concerne les gènes codant les super-antigènes, les évolutions récentes suggèrent qu'il s'agirait probablement d'acquisition de matériel génétique par les souches de *S. pyogenes*. Le lien entre les gènes présents et le génotype *emm* serait la conséquence de l'influence de la protéine M sur l'entrée dans *S. pyogenes* de prophages, dont ceux transportant ces gènes (90). Nous avons cependant observé des profils de gènes de super-antigènes variables au sein des souches

d'un même génotype *emm*, laissant supposer que d'autres protéines de surface influencent l'acquisition de matériel génétique. Notamment, il a été décrit que les souches de *S. pyogenes* possédant le gène *sof* étaient les plus fréquentes à posséder des ICE (32). La présence de CRISP dans certaines souches pourrait également limiter l'entrée de nouveaux prophages (126). Concernant les gènes de résistance aux antibiotiques portés par des éléments transposables, leur entrée et leur maintien mériteraient une étude moléculaire. L'omniprésence de certaines résistances dans d'autres espèces de *Streptococcus* a été décrite, notamment 85 % des souches de *S. agalactiae* sont résistantes à la tétracycline en relation avec la présence du gène *tet(M)* porté par un transposon, alors même que la tétracycline n'est plus utilisée (390). La raison de ce type de conservation et la présence de certaines résistances dans des génotypes *emm* donnés de *S. pyogenes* pourraient dépendre de mécanismes similaires qui restent à définir. Enfin, en ce qui concerne le locus *sil*, alors qu'il n'est retrouvé que dans quelques génotypes de *S. pyogenes*, il est très présent chez *S. dysgalactiae* subsp *equisimilis* (29, 205). Cette différence de prévalence ainsi que la prévalence de la délétion observée dans les souches *emm4* suggèrent, non pas une acquisition, mais plutôt que le locus *sil* était présent au sein du génome de leur ancêtre commun et que *S. pyogenes*, contrairement à *S. dysgalactiae* subsp *equisimilis*, l'aurait perdu.

La corrélation entre certains génotypes *emm* et la présence de certains gènes de super-antigènes permet aussi d'expliquer le lien observé entre les génotypes *emm* et la survenue de certaines manifestations cliniques. Ainsi, notre étude a confirmé l'association entre *speA* les génotypes *emm1* et *emm3*, ceux-ci étant les plus fréquents parmi les cas de SCTS (289, 354, 455, 519). Cependant, ce lien semble être le seul qui puisse être établi entre éléments génétiques et caractère invasif des souches. En effet, nous avons retrouvé la corrélation décrite entre la présence des allèles *speA1-speA3* et le gène *speJ*, et les génotypes *emm* parmi des souches de *S. pyogenes* responsables d'infections invasives et d'infections non invasives. En revanche, et contrairement à ce qui a été décrit dans une unique étude préalable, aucune corrélation n'a pu être établie entre la présence de ces éléments génétiques et le caractère invasif des souches de *S. pyogenes* (282). De même, nous n'avons pas observé de corrélation entre la présence d'un locus *sil* fonctionnel et le caractère invasif des souches. En effet, dans de nombreux génotypes comportant des souches invasives et non-invasives, le locus *sil* est absent. De plus, nous avons séquencé *silC*, *silCR* et *silD*, dans lesquels des mutations ont été décrites, dans toutes les souches comportant un locus *sil* afin de déterminer sa fonctionnalité putative telle que définie par l'absence de délétion, décalage du cadre de lecture ou mutation conduisant à un codon stop dans *silCR*, *silC* et *silD*. Dans la plupart des souches de génotype



*emm4*, le locus *sil* était non fonctionnel. En effet, seules 6 souches (6%) de génotype *emm4*, incluant 3 souches invasives et 3 souches non invasives, présentaient un locus *sil* potentiellement fonctionnel. Par ailleurs, le séquençage de *silCR* nous a permis d'identifier une seule souche dans laquelle une mutation était présente dans la région chevauchant *silC* et *silCR* conduisant à une mutation dans chacun des gènes. En revanche la mutation décrite dans le codon de démarrage de *silCR* au sein de la souche JS95 de génotype *emm14*, mutation favorisant la virulence de la souche, n'a été détectée dans aucune de nos souches arborant le locus *sil*, ni aucune des souches étudiées par d'autres équipes (47, 228). Cependant il est à noter que notre collection ne comportait pas de souches de *S. pyogenes emm14* malgré les 42 génotypes *emm* différents et que les collections étudiées par les autres équipes n'en possédaient pas non plus (47, 50, 228). En effet, la souche JS95 de génotype *emm14* a été isolée en Israël, où ce génotype est le cinquième plus fréquent alors qu'il est très rare en Europe, en Amérique du Nord et au Japon et ne représente que 2% des souches isolées dans la région Pacifique (222, 265, 278, 331, 384, 453). Le séquençage de *silCR* dans d'autres souches *emm14* permettrait toutefois de savoir si cette mutation est inféodée à ce génotype *emm* ou bien s'il s'agit d'une mutation ponctuelle accidentelle (2, 12). Ainsi, aucune corrélation n'a pu être établie entre la présence d'un locus *sil* putativement fonctionnel et le caractère invasif des souches. Ceci est différent de la situation observée avec *covS*. Cependant des études ont montré que malgré la présence de mutation dans *silCR* et/ou *silD*, les souches de *S. pyogenes* pouvaient répondre à SilCR par SilA/SilB (29, 205). De plus, des souches de *S. pyogenes* dépourvues de locus *sil* pouvaient également répondre au peptide SilCR (415). Cela suggère une coopération entre *S. pyogenes* et l'espèce *S. dysgalactiae* subsp *equisimilis* qui partagent une niche écologique, le pharynx.

Au cours de ce travail nous avons aussi recherché s'il existait des liens entre le fond génétique des souches de *S. pyogenes* ou leur caractère invasif et différentes caractéristiques de la réponse immunitaire innée. Plus précisément, nous avons étudié *in vitro* les premières étapes de la réponse immunitaire innée induite chez des macrophages (BMDMs) par différentes souches de *S. pyogenes*. Ces derniers jouent un rôle ambivalent au cours du processus infectieux de *S. pyogenes*; en effet, ils peuvent détruire les bactéries mais ils peuvent aussi constituer un réservoir pour les bactéries capables de survivre et de s'y multiplier (170, 200, 480). Nous avons ainsi observé une corrélation entre le génotype *emm* des souches ainsi que, pour certains *emm* types, leur caractère invasif et leur capacité à être phagocytées par les macrophages. En effet, d'une part, les souches de génotype *emm89*

présentaient une plus grande capacité à être phagocytées que les souches des autres génotypes et, d'autre part, les souches invasives *emm3* et *emm89* étaient plus phagocytées que les souches non invasives de même génotype *emm* type. La phagocytose plus importante des souches *emm89* était également associée à une meilleure capacité de survie dans les macrophages évoquant la persistance des souches *emm89* lors d'infections. Les macrophages constitueraient donc un sanctuaire pour les souches de génotype *emm89* au sein desquels elles sont à l'abri des antibiotiques ; ces souches pourraient par conséquent être à l'origine d'infections récurrentes et il serait intéressant d'étudier de tels cas et d'y déterminer la prévalence des souches *emm89*.

L'étude de la survie des bactéries dans les macrophages (hors souches de génotype *emm3*) n'a pas permis d'établir une corrélation avec le caractère invasif des souches de *S. pyogenes*. Cependant, alors que la survie ou la destruction des bactéries intracellulaires est influencée par le mécanisme d'entrée à l'intérieur des cellules (480), celui conduisant à la survie de *S. pyogenes* reste inconnu. Tout au plus a-t-il été décrit que la survie était dépendante de la protéine M1 qui inhibe la fusion vacuole phagocytaire – lysosome (200) et que SLO avec la NAD-glycohydrolase protégeaient *S. pyogenes* de la destruction (31). Nos résultats suggèrent que, soit la protéine M89 est plus efficace que la protéine M1 pour inhiber la fusion vacuole phagocytaire – lysosome, soit les souches de génotype *emm89* produisent d'autres facteurs favorisant la survie intracellulaire. Notamment, nous avons observé que les souches de génotype *emm89* induisaient une sécrétion plus précoce d'IFN- $\beta$  et des niveaux plus faibles d'IL-6 et TNF- $\alpha$  que les souches des autres génotypes *emm*. Ainsi, la protéine M89 pourrait, comme la protéine M1 mais plus efficacement, provoquer une suppression de signaux inflammatoires (200).

Par ailleurs, nous avons observé que les souches de génotype *emm3* induisaient l'apoptose des macrophages de façon bien plus précoce que ce qui est décrit pour les souches de génotype *emm1* (483). Cependant, alors que l'apoptose induite par les souches de génotype *emm1* est médiée par SLO (483) et que celle des cellules dendritiques implique SpeB et SLO (91), le mécanisme responsable de l'apoptose induite par les souches de génotype *emm3* semble différent. En effet, l'accumulation de SpeB et SLO est contrôlée par le système CovR/CovS, or le séquençage des gènes *covS* et *covR* ne nous a pas permis de corrélérer la présence de mutation avec la précocité de l'apoptose observée. Ainsi, l'apoptose induite par les souches de génotype *emm3* ne semblait pas impliquer de médiateurs dont la synthèse était régulée par le système CovR/CovS. L'implication de différentes protéines de surface, telles que la protéine M3, des adhésines ou des protéines liant les protéines de la matrice

extracellulaire, ou des protéines sécrétées dont la synthèse n'est pas sous le contrôle du système CovR/CovS pourrait être examinée en créant des souches délétées pour ces facteurs ou en procédant à des remplacements alléliques, pour la protéine M par exemple.

Concernant la synthèse de modulateurs de l'immunité innée, aucune différence relative avec le caractère invasif des souches de *S. pyogenes*, n'a été observé pour les BMDMs infectés par des souches de génotype *emm4* ou *emm28*. Par contre, tous les BMDMs infectés par des souches non-invasives de génotype *emm3* sécrétaient, dès les temps précoces, plus d'IL-6 que ceux infectés par des souches invasives de génotype *emm3*. De plus, les souches invasives de génotype *emm89* induisaient une plus forte synthèse de TNF- $\alpha$  que les souches non invasives de génotype *emm89* tout au long de l'expérience. De façon plus tardive (T6) les BMDMs infectés par les souches invasives de génotype *emm1* et *emm3* sécrétaient plus d'IFN- $\beta$  que ceux infectés par leurs homologues non-invasives. Les différences observées pourraient moduler le recrutement des cellules phagocytaires *in vivo*, notamment le recrutement d'autres cellules phagocytaires pouvant agir sur les bactéries échappant à la phagocytose des macrophages. Ces constatations sont cependant à prendre en compte en même temps que les facteurs génétiques de l'hôte qui influencent également la sévérité de la manifestation clinique observée (315, 348). Notamment, il serait intéressant d'évaluer *in vivo* la virulence de souches non invasives de notre collection, particulièrement pour les génotypes pour lesquels aucune différence lié au caractère invasif n'a été observée.

Au cours de ce travail nous avons mis à jour la similarité, pour la plupart des souches appartenant à un même génotype *emm*, des phénotypes de la réponse immunitaire innée. Cependant, quelques souche atypiques disparaissaient très rapidement ou, à l'inverse, persistaient plus longtemps que leurs homologues. Ceci pourrait résulter de mutations survenues dans les systèmes régulant la synthèse des facteurs impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire innée. Cependant aucune corrélation n'a été mise en évidence avec des mutations dans *covRS* (résultats non montrés). D'autres systèmes de régulation et des facteurs de virulence non-encore décrits peuvent également intervenir dans la modulation de la réponse immunitaire innée.

Afin d'identifier le ou les déterminants génétiques responsables de la transition colonisation–infections invasives, nous avons également utilisé un deuxième type d'approche,

à savoir l'étude de souches appartenant à des cas groupés. A ce titre, nous avons séquencé le génome complet de souches isolées au cours de tels cas. Nous avons choisi, au sein de chaque cas groupé, une souche invasive et une souche de colonisation ; ces souches étant isogéniques, il nous paraissait logique que les éventuelles différences dans le caractère invasif des souches soient liées à des mutations. Pour deux cas groupés, une des souches présentait une mutation dans *covS*.

La première mutation était survenue, comme déjà décrit, dans la souche invasive mais pour la première fois dans une souche de génotype *emm11* (164, 470). La croissance de cette souche était altérée *in vitro* mais restaurée après ajout de plasma humain. Ceci suggère que le défaut de croissance n'a pas d'impact *in vivo* dès lors que les bactéries avaient atteint le sang, contribuant ainsi à la virulence de cette souche invasive. Par ailleurs, l'ajout de  $Mg^{2+}$  permettait également de restaurer la croissance ce qui indique que le métabolisme bactérien était influencé par le  $Mg^{2+}$  via des voies de régulation indépendantes du système CovR/CovS. Enfin, l'ajout de  $Ca^{2+}$ , qui ne modifie pas l'expression des gènes régulés par le système CovR/CovS (180), restaurait aussi partiellement la croissance de cette souche par un mécanisme inconnu, mais qui pourrait être identique à celui impliquant le  $Mg^{2+}$ . Bien que le phénotype muqueux lié à l'hyper-capsulation des souches mutantes soit le phénomène à l'origine de la description du système CovR/CovS (279), nous n'avons observé aucune différence significative de production d'acide hyaluronique capsulaire entre les deux souches. Cela pourrait être dû à un autre système de régulation qui aurait un rôle plus important sur l'opéron *has* dans cette souche de génotype *emm11* que dans d'autres génotypes *emm* et conduisant à une absence de contrôle apparent de *has* par le système CovR/CovS. Ce résultat renforce aussi la notion que la capsule n'est pas l'unique facteur de virulence responsable de la sélection *in vivo* des souches mutées dans le système CovR/CovS.

La deuxième mutation dans *covS* était originale : en effet, c'est la souche de colonisation qui était mutée. La comparaison du profil d'expression des gènes, de la souche sauvage WT2 et de la souche mutée CovS2 suggérait que la mutation dans *covS*, conduisant au remplacement de la tyrosine en position 39 par une histidine (CovSY39H), avait des conséquences importantes sur l'expression des gènes régulés par le système CovR/CovS ; plus précisément, les effets observés étaient à l'opposé de ceux habituellement décrits pour les autres souches possédant des mutations dans *covS*. De plus, le phénotype observé pour WT2 était intermédiaire entre celui d'une souche classique mutée dans *covS* et celui de CovS2 suggérant que le rôle de la protéine CovSY39H sur CovR serait renforcé. Par ailleurs, l'enrichissement en  $Mg^{2+}$  du milieu de culture, un des signaux de CovS, a entraîné les mêmes

modifications d'expression des gènes dans les deux souches mais à un très faible niveau dans CovS2. Ceci suggère que la protéine CovSY39H a une capacité réduite de détection de, ou de réponse à, ce signal ; elle pourrait être dans une conformation à peine réceptive à l'environnement. Au total, ces résultats suggèrent que la conformation de la protéine mutante pourrait être telle que, soit aucun signal ne serait nécessaire, soit une plus faible concentration de molécules de signalisation serait suffisante, à son activation. La nécessité d'un signal, même faible, pourrait être testée en chélatant les ions  $Mg^{2+}$  présents dans les milieux de culture utilisés. Alternativement, un effet différentiel d'un agent contrecarrant l'effet de  $Mg^{2+}$  apporterait des informations. Malheureusement, alors que LL-37 a été décrit comme induisant des effets opposés à ceux de  $Mg^{2+}$  sur l'expression des gènes régulés par le système CovR/CovS, le profil d'expression des gènes dans WT2, obtenu après ajout de LL-37 au milieu de culture était similaire, quoiqu'à un moindre niveau, à celui obtenu après ajout de  $Mg^{2+}$  (485). Par conséquent, l'ajout de LL-37 sur le profil d'expression des gènes de la souche comportant CovS2 n'a pas été informatif. L'hypothèse la plus simple concernant cette absence d'effet opposé observé réside dans la matière première LL-37 (Sigma vs produit par l'équipe (420, 485)). Par ailleurs, une analyse plus approfondie de la protéine CovSY39H, la détermination de sa structure, de son interaction avec CovR permettrait d'approfondir nos connaissances sur le système CovR/CovS de *S. pyogenes*. En effet, ni la phosphorylation ni déphosphorylation de CovR par CovS n'ont été démontrées *in vitro*. La protéine CovSY39H pourrait soit être constitutivement « active », phosphorylant CovR, même en absence signal intense, soit incapable de le déphosphoryler. Il serait à ce titre intéressant de tester chacune de ces réactions *in vitro*. Le système CovR/CovS de *S. agalactiae* est contrôlé par deux autres régulateurs, l'un interférant avec la phosphorylation de CovR et l'autre, Abx1, modifiant la capacité de CovS à phosphoryler CovR (153). En absence d'Abx1, CovS est bloqué dans la conformation kinase, phosphorylant CovR, conduisant à une sur-répression des gènes contrôlés négativement par CovR. La protéine CovSY39H pourrait être bloquée dans une conformation similaire. Par ailleurs, la régulation de l'expression de certains gènes par le système CovR/CovS, dont *speB*, reste incomplètement décrite. Il a été montré que CovR réprime l'expression de *speB* et que cette répression était diminuée dans les mutants *covS* et en présence de  $Mg^{2+}$  (487). Notre hypothèse est que CovR, et non CovR-phosphorylé, réprime l'expression de *speB*. Le modèle que nous proposons, au vu des résultats obtenus avec la souche comportant CovSY39H, est en accord avec cette hypothèse ; en présence de la protéine CovSY39H CovR est phosphorylé et *speB* est dérprimé.

Nous avons aussi observé la surexpression des gènes codant les constituants des pili après addition de  $Mg^{2+}$  dans WT2. Ce résultat renforce donc l'hypothèse du rôle joué par les pili dans l'adhésion aux cellules épithéliales cutanées et pharyngées au cours de la phase de colonisation (1, 249, 297).

La pression immunitaire exercée *in vivo* contribue à la sélection des souches mutées dans *covR* ou *covS* avec, pour conséquence, le passage d'un phénotype colonisation à un phénotype invasif. A ce titre nos résultats sont en accord avec le fait que les macrophages peuvent soit détruire soit constituer un réservoir pour les bactéries (171, 200, 480). Ainsi nous avons observé que CovS2 n'avait pas, contrairement à WT2, la capacité de se multiplier durant les premières heures suivant la phagocytose suggérant une capacité invasive plus faible que WT2. L'absence de multiplication dans les macrophages est en accord avec les résultats obtenus *in vivo* dans un modèle murin d'infection invasive ; CovS2 était moins virulente que WT2.

Ainsi l'ensemble de nos résultats suggèrent que CovS2 possède toutes les caractéristiques *in vitro* d'une souche de colonisation ce qui est cohérent avec le fait que CovS2 a été isolée chez un porteur asymptomatique. C'est, à notre connaissance, la première fois qu'un tel phénotype est décrit pour une souche mutée dans *covS*. A ce jour, aucun mutant présentant un phénotype de colonisation n'a été isolé ou construit. De plus, l'ensemble des données obtenues soit par l'analyse de souches mutées dans *covS* sélectionnées *in vivo* (139, 164, 470), soit en comparant les propriétés *in vivo* de mutants *covS* construits (485, 487), suggère un phénotype invasif pour ces mutants. Par ailleurs, il a également été démontré que ces mutants ne parvenaient pas à s'implanter dans un modèle murin de colonisation nasopharyngée (6, 487). Notre étude a confirmé le rôle majeur du système CovR/CovS dans la transition colonisation – infection observée chez *S. pyogenes*, mais, contrairement aux autres études, nous avons décrit un phénotype favorisant la colonisation. Ainsi, le système CovR/CovS doit être sauvage pour que *S. pyogenes* assure l'ensemble des étapes du processus infectieux incluant la colonisation, l'invasion et la dissémination.

En conclusion, l'ensemble de ce travail d'épidémiologie moléculaire a permis de répondre à la question des liens entre génotypes *emm*, présence de facteurs de virulence et caractères invasifs des souches. Il existe un lien entre génotype *emm* et la présence de certains facteurs de virulence, les mécanismes conduisant à ce lien pouvant être variés, acquisition sélective ou perte de matériel génétique. Par contre, alors même qu'il existe une corrélation entre la présence de quelques facteurs bien définis et deux pathologies, aucun lien entre

génotype *emm* et caractère invasif n'a pu être défini. Toutefois, un génotype induisait une réponse immunitaire innée particulière. Enfin, l'état sauvage du système de régulation CovR/CovS, qui contrôle l'expression de 15% des gènes, dont des facteurs de virulence, est nécessaire pour l'établissement et le développement des infections invasives à *S. pyogenes*.

## **Références bibliographiques**

---



## Références bibliographiques

1. **Abbot, E., W. Smith, G. Siou, C. Chiriboga, R. Smith, J. Wilson, B. Hirst, and M. Kehoe.** 2007. Pili mediate specific adhesion of *Streptococcus pyogenes* to human tonsil and skin. *Cell Microbiol* **9**:1822-33.
2. **Abbot, E. L., W. D. Smith, G. P. Siou, C. Chiriboga, R. J. Smith, J. A. Wilson, B. H. Hirst, and M. A. Kehoe.** 2007. Pili mediate specific adhesion of *Streptococcus pyogenes* to human tonsil and skin. *Cell Microbiol* **9**:1822-33.
3. **Abdissa, A., D. Asrat, G. Kronvall, B. Shitu, D. Achiko, M. Zeidan, L. K. Yamuah, and A. Aseffa.** 2011. Throat carriage rate and antimicrobial susceptibility pattern of group A Streptococci (GAS) in healthy Ethiopian school children. *Ethiop Med J* **49**:125-30.
4. **Adams, E. M., S. Gudmundsson, D. E. Yocum, R. C. Haselby, W. A. Craig, and W. R. Sundstrom.** 1985. Streptococcal myositis. *Arch Intern Med* **145**:1020-3.
5. **Akesson, P., A. G. Sjöholm, and L. Björck.** 1996. Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function. *J Biol Chem* **271**:1081-8.
6. **Alam, F. M., C. E. Turner, K. Smith, S. Wiles, and S. Sriskandan.** 2013. Inactivation of the CovR/S virulence regulator impairs infection in an improved murine model of *Streptococcus pyogenes* naso-pharyngeal infection. *PLoS One* **8**:e61655.
7. **Alouf, J. E.** 1980. Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenic toxin). *Pharmacol Ther* **11**:661-717.
8. **Andersen, M. M., and T. Ronne.** 1995. Group A streptococcal bacteraemias in Denmark 1987-89. *J Infect* **31**:33-7.
9. **Anthony, B. F., E. L. Kaplan, L. W. Wannamaker, and S. S. Chapman.** 1976. The dynamics of streptococcal infections in a defined population of children: serotypes associated with skin and respiratory infections. *Am J Epidemiol* **104**:652-66.
10. **Arcus, V. L., T. Proft, J. A. Sigrell, H. M. Baker, J. D. Fraser, and E. N. Baker.** 2000. Conservation and variation in superantigen structure and activity highlighted by the three-dimensional structures of two new superantigens from *Streptococcus pyogenes*. *J Mol Biol* **299**:157-68.
11. **Ardanuy, C., A. Domenech, D. Rolo, L. Calatayud, F. Tubau, J. Ayats, R. Martin, and J. Linares.** 2010. Molecular characterization of macrolide- and multidrug-resistant *Streptococcus pyogenes* isolated from adult patients in Barcelona, Spain (1993-2008). *J Antimicrob Chemother* **65**:634-43.
12. **Ashbaugh, C. D., S. Alberti, and M. R. Wessels.** 1998. Molecular analysis of the capsule gene region of group A *Streptococcus*: the *hasAB* genes are sufficient for capsule expression. *J Bacteriol* **180**:4955-9.
13. **Ashbaugh, C. D., T. J. Moser, M. H. Shearer, G. L. White, R. C. Kennedy, and M. R. Wessels.** 2000. Bacterial determinants of persistent throat colonization and the associated immune response in a primate model of human group A streptococcal pharyngeal infection. *Cell Microbiol* **2**:283-92.
14. **Aziz, R. K., M. J. Pabst, A. Jeng, R. Kansal, D. E. Low, V. Nizet, and M. Kotb.** 2004. Invasive M1T1 group A *Streptococcus* undergoes a phase-shift *in vivo* to prevent proteolytic degradation of multiple virulence factors by SpeB. *Mol Microbiol* **51**:123-34.

15. **Baker, M., D. M. Gutman, A. C. Papageorgiou, C. M. Collins, and K. R. Acharya.** 2001. Structural features of a zinc binding site in the superantigen streptococcal pyrogenic exotoxin A (SpeA1): implications for MHC class II recognition. *Protein Sci* **10**:1268-73.
16. **Banks, D. J., S. B. Beres, and J. M. Musser.** 2002. The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence. *Trends Microbiol* **10**:515-21.
17. **Banks, D. J., S. F. Porcella, K. D. Barbian, S. B. Beres, L. E. Philips, J. M. Voyich, F. R. DeLeo, J. M. Martin, G. A. Somerville, and J. M. Musser.** 2004. Progress toward characterization of the group A *Streptococcus* metagenome: complete genome sequence of a macrolide-resistant serotype M6 strain. *J Infect Dis* **190**:727-38.
18. **Barry, W., L. Hudgins, S. T. Donta, and E. L. Pesanti.** 1992. Intravenous immunoglobulin therapy for toxic shock syndrome. *JAMA* **267**:3315-6.
19. **Batsford, S. R., S. Mezzano, M. Mihatsch, E. Schiltz, and B. Rodriguez-Iturbe.** 2005. Is the nephritogenic antigen in post-streptococcal glomerulonephritis pyrogenic exotoxin B (SPE B) or GAPDH? *Kidney Int* **68**:1120-9.
20. **Batzloff, M. R., W. A. Hayman, M. R. Davies, M. Zeng, S. Pruksakorn, E. R. Brandt, and M. F. Good.** 2003. Protection against group A *streptococcus* by immunization with J8-diphtheria toxoid: contribution of J8- and diphtheria toxoid-specific antibodies to protection. *J Infect Dis* **187**:1598-608.
21. **Bauer, M. J., M. M. Georgousakis, T. Vu, A. Henningham, A. Hofmann, M. Rettel, L. M. Hafner, K. S. Sriprakash, and D. J. McMillan.** 2012. Evaluation of novel *Streptococcus pyogenes* vaccine candidates incorporating multiple conserved sequences from the C-repeat region of the M-protein. *Vaccine* **30**:2197-205.
22. **Beachey, E. H., H. Gras-Masse, A. Tarter, M. Jolivet, F. Audibert, L. Chedid, and J. M. Seyer.** 1986. Opsonic antibodies evoked by hybrid peptide copies of types 5 and 24 streptococcal M proteins synthesized in tandem. *J Exp Med* **163**:1451-8.
23. **Beachey, E. H., and I. Ofek.** 1976. Epithelial cell binding of group A streptococci by lipoteichoic acid on fimbriae denuded of M protein. *J Exp Med* **143**:759-71.
24. **Beachey, E. H., J. M. Seyer, J. B. Dale, W. A. Simpson, and A. H. Kang.** 1981. Type-specific protective immunity evoked by synthetic peptide of *Streptococcus pyogenes* M protein. *Nature* **292**:457-9.
25. **Beall, B., R. Facklam, and T. Thompson.** 1996. Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J Clin Microbiol* **34**:953-8.
26. **Beall, B., G. Gherardi, M. Lovgren, R. R. Facklam, B. A. Forwick, and G. J. Tyrrell.** 2000. *emm* and *sof* gene sequence variation in relation to serological typing of opacity-factor-positive group A streptococci. *Microbiology* **146** ( Pt 5):1195-209.
27. **Becherelli, M., A. G. Manetti, S. Buccato, E. Viciani, L. Ciucchi, G. Mollica, G. Grandi, and I. Margarit.** 2012. The ancillary protein 1 of *Streptococcus pyogenes* FCT-1 pili mediates cell adhesion and biofilm formation through heterophilic as well as homophilic interactions. *Mol Microbiol* **83**:1035-47.
28. **Becquet, O., J. Pasche, H. Gatti, C. Chenel, M. Abely, P. Morville, and C. Pietrement.** 2010. Acute post-streptococcal glomerulonephritis in children of French Polynesia: a 3-year retrospective study. *Pediatr Nephrol* **25**:275-80.
29. **Belotserkovsky, I., M. Baruch, A. Peer, E. Dov, M. Ravins, I. Mishalian, M. Persky, Y. Smith, and E. Hanski.** 2009. Functional analysis of the quorum-sensing streptococcal invasion locus (*sil*). *PLoS Pathog* **5**:e1000651.

30. **Bensi, G., M. Mora, G. Tuscano, M. Biagini, E. Chiarot, M. Bombaci, S. Capo, F. Falugi, A. G. Manetti, P. Donato, E. Swennen, M. Gallotta, M. Garibaldi, V. Pinto, N. Chiappini, J. M. Musser, R. Janulczyk, M. Mariani, M. Scarselli, J. L. Telford, R. Grifantini, N. Norais, I. Margarit, and G. Grandi.** 2012. Multi high-throughput approach for highly selective identification of vaccine candidates: the Group A *Streptococcus* case. *Mol Cell Proteomics* **11**:M111 015693.
31. **Beres, S. B., R. K. Carroll, P. R. Shea, I. Sitkiewicz, J. C. Martinez-Gutierrez, D. E. Low, A. McGeer, B. M. Willey, K. Green, G. J. Tyrrell, T. D. Goldman, M. Feldgarden, B. W. Birren, Y. Fofanov, J. Boos, W. D. Wheaton, C. Honisch, and J. M. Musser.** 2010. Molecular complexity of successive bacterial epidemics deconvoluted by comparative pathogenomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:4371-6.
32. **Beres, S. B., and J. M. Musser.** 2007. Contribution of exogenous genetic elements to the group A *Streptococcus* metagenome. *PLoS One* **2**:e800.
33. **Beres, S. B., E. W. Richter, M. J. Nagiec, P. Sumby, S. F. Porcella, F. R. DeLeo, and J. M. Musser.** 2006. Molecular genetic anatomy of inter- and intraserotype variation in the human bacterial pathogen group A *Streptococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:7059-64.
34. **Beres, S. B., G. L. Sylva, K. D. Barbian, B. Lei, J. S. Hoff, N. D. Mammarella, M. Y. Liu, J. C. Smoot, S. F. Porcella, L. D. Parkins, D. S. Campbell, T. M. Smith, J. K. McCormick, D. Y. Leung, P. M. Schlievert, and J. M. Musser.** 2002. Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:10078-83.
35. **Berg, U., S. Bygdeman, A. Henningsson, B. Nystrom, and R. Tunell.** 1982. An outbreak of group A streptococcal infection in a maternity unit. *J Hosp Infect* **3**:333-9.
36. **Berge, A., and L. Bjorck.** 1995. Streptococcal cysteine proteinase releases biologically active fragments of streptococcal surface proteins. *J Biol Chem* **270**:9862-7.
37. **Berge, A., and U. Sjobring.** 1993. PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* **268**:25417-24.
38. **Berggard, K., E. Johnsson, E. Morfeldt, J. Persson, M. Stalhammar-Carlemalm, and G. Lindahl.** 2001. Binding of human C4BP to the hypervariable region of M protein: a molecular mechanism of phagocytosis resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **42**:539-51.
39. **Berkley, J. A., B. S. Lowe, I. Mwangi, T. Williams, E. Bauni, S. Mwarumba, C. Ngetsa, M. P. Slack, S. Njenga, C. A. Hart, K. Maitland, M. English, K. Marsh, and J. A. Scott.** 2005. Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. *N Engl J Med* **352**:39-47.
40. **Berkower, C., M. Ravins, A. E. Moses, and E. Hanski.** 1999. Expression of different group A streptococcal M proteins in an isogenic background demonstrates diversity in adherence to and invasion of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **31**:1463-75.
41. **Bessen, D., and V. A. Fischetti.** 1990. Synthetic peptide vaccine against mucosal colonization by group A streptococci. I. Protection against a heterologous M serotype with shared C repeat region epitopes. *J Immunol* **145**:1251-6.
42. **Bessen, D., K. F. Jones, and V. A. Fischetti.** 1989. Evidence for two distinct classes of streptococcal M protein and their relationship to rheumatic fever. *J Exp Med* **169**:269-83.
43. **Bessen, D. E., T. R. Fiorentino, and S. K. Hollingshead.** 1997. Molecular markers for throat and skin isolates of group A streptococci. *Adv Exp Med Biol* **418**:537-43.

44. **Bessen, D. E., N. Kumar, G. S. Hall, D. R. Riley, F. Luo, S. Lizano, C. N. Ford, W. M. McShan, S. V. Nguyen, J. C. Dunning Hotopp, and H. Tettelin.** 2011. Whole-genome association study on tissue tropism phenotypes in group A *Streptococcus*. *J Bacteriol* **193**:6651-63.
45. **Bessen, D. E., K. F. McGregor, and A. M. Whatmore.** 2008. Relationships between emm and multilocus sequence types within a global collection of *Streptococcus pyogenes*. *BMC Microbiol* **8**:59.
46. **Bessen, D. E., C. M. Sotir, T. L. Readdy, and S. K. Hollingshead.** 1996. Genetic correlates of throat and skin isolates of group A streptococci. *J Infect Dis* **173**:896-900.
47. **Bidet, P., C. Courroux, C. Salgueiro, A. Carol, P. Mariani-Kurkdjian, S. Bonacorsi, and E. Bingen.** 2007. Molecular epidemiology of the sil streptococcal invasive locus in group A streptococci causing invasive infections in French children. *J Clin Microbiol* **45**:2002-4.
48. **Bidet, P., C. Plainvert, C. Doit, P. Mariani-Kurkdjian, S. Bonacorsi, A. Lepoutre, A. Bouvet, C. Poyart, and E. Bingen.** 2010. [*Streptococcus pyogenes* or group A streptococcal infections in child: French national reference center data]. *Arch Pediatr* **17**:201-8.
49. **Billal, D. S., D. P. Fedorko, S. S. Yan, M. Hotomi, K. Fujihara, N. Nelson, and N. Yamanaka.** 2007. *In vitro* induction and selection of fluoroquinolone-resistant mutants of *Streptococcus pyogenes* strains with multiple emm types. *J Antimicrob Chemother* **59**:28-34.
50. **Billal, D. S., M. Hotomi, J. Shimada, K. Fujihara, K. Ubukata, R. Sugita, and N. Yamanaka.** 2008. Prevalence of *Streptococcus* invasive locus (*sil*) and its relationship with macrolide resistance among group A *Streptococcus* strains. *J Clin Microbiol* **46**:1563-4.
51. **Bingen, E., P. Bidet, L. Mihaila-Amrouche, C. Doit, S. Forcet, N. Brahimi, A. Bouvet, and R. Cohen.** 2004. Emergence of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in French children. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3559-62.
52. **Bingen, E., F. Fitoussi, C. Doit, R. Cohen, A. Tanna, R. George, C. Loukil, N. Brahimi, I. Le Thomas, and D. Deforche.** 2000. Resistance to macrolides in *Streptococcus pyogenes* in France in pediatric patients. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1453-7.
53. **Binks, M., D. McMillan, and K. S. Sriprakash.** 2003. Genomic location and variation of the gene for CRS, a complement binding protein in the M57 strains of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **71**:6701-6.
54. **Bisno, A. L.** 1996. Acute pharyngitis: etiology and diagnosis. *Pediatrics* **97**:949-54.
55. **Bisno, A. L., M. O. Brito, and C. M. Collins.** 2003. Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect Dis* **3**:191-200.
56. **Bisno, A. L., I. A. Pearce, H. P. Wall, M. D. Moody, and G. H. Stollerman.** 1970. Contrasting epidemiology of acute rheumatic fever and acute glomerulonephritis. *N Engl J Med* **283**:561-5.
57. **Biswas, I., and J. R. Scott.** 2003. Identification of *rocA*, a positive regulator of *covR* expression in the group A streptococcus. *J Bacteriol* **185**:3081-90.
58. **Blackman Northwood, J., M. Del Grosso, L. R. Cossins, M. D. Coley, R. Creti, A. Pantosti, and D. J. Farrell.** 2009. Characterization of macrolide efflux pump *mef* subclasses detected in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* isolated between 1999 and 2005. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:1921-5.

59. **Bolken, T. C., C. A. Franke, K. F. Jones, R. H. Bell, R. M. Swanson, D. S. King, V. A. Fischetti, and D. E. Hruby.** 2002. Analysis of factors affecting surface expression and immunogenicity of recombinant proteins expressed by gram-positive commensal vectors. *Infect Immun* **70**:2487-91.
60. **Brandt, E. R., K. S. Sriprakash, R. I. Hobb, W. A. Hayman, W. Zeng, M. R. Batzloff, D. C. Jackson, and M. F. Good.** 2000. New multi-determinant strategy for a group A streptococcal vaccine designed for the Australian Aboriginal population. *Nat Med* **6**:455-9.
61. **Broder, C. C., R. Lottenberg, G. O. von Mering, K. H. Johnston, and M. D. Boyle.** 1991. Isolation of a prokaryotic plasmin receptor. Relationship to a plasminogen activator produced by the same micro-organism. *J Biol Chem* **266**:4922-8.
62. **Bronze, M. S., H. S. Courtney, and J. B. Dale.** 1992. Epitopes of group A streptococcal M protein that evoke cross-protective local immune responses. *J Immunol* **148**:888-93.
63. **Brook, I.** 1985. Role of beta-lactamase-producing bacteria in the failure of penicillin to eradicate group A streptococci. *Pediatr Infect Dis* **4**:491-5.
64. **Brook, I., and A. E. Gober.** 2008. Failure to eradicate streptococci and beta-lactamase producing bacteria. *Acta Paediatr* **97**:193-5.
65. **Brook, I., and A. E. Gober.** 1998. Persistence of group A beta-hemolytic streptococci in toothbrushes and removable orthodontic appliances following treatment of pharyngotonsillitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **124**:993-5.
66. **Brouillard, J. N., S. Gunther, A. K. Varma, I. Gyski, C. A. Herfst, A. K. Rahman, D. Y. Leung, P. M. Schlievert, J. Madrenas, E. J. Sundberg, and J. K. McCormick.** 2007. Crystal structure of the streptococcal superantigen SpeI and functional role of a novel loop domain in T cell activation by group V superantigens. *J Mol Biol* **367**:925-34.
67. **Bryant, A. E., C. R. Bayer, R. Y. Chen, P. H. Guth, R. J. Wallace, and D. L. Stevens.** 2005. Vascular dysfunction and ischemic destruction of tissue in *Streptococcus pyogenes* infection: the role of streptolysin O-induced platelet/neutrophil complexes. *J Infect Dis* **192**:1014-22.
68. **Buchanan, J. T., A. J. Simpson, R. K. Aziz, G. Y. Liu, S. A. Kristian, M. Kotb, J. Feramisco, and V. Nizet.** 2006. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* **16**:396-400.
69. **Burns, E. H., Jr., A. M. Marciel, and J. M. Musser.** 1996. Activation of a 66-kilodalton human endothelial cell matrix metalloprotease by *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease. *Infect Immun* **64**:4744-50.
70. **Cady, A., C. Plainvert, P. Donnio, P. Loury, D. Huguenet, A. Briand, M. Revest, S. Kayal, and A. Bouvet.** 2011. Clonal spread of *Streptococcus pyogenes* emm44 among homeless persons, Rennes, France. *Emerg Infect Dis* **17**:315-7.
71. **Caparon, M. G., R. T. Geist, J. Perez-Casal, and J. R. Scott.** 1992. Environmental regulation of virulence in group A streptococci: transcription of the gene encoding M protein is stimulated by carbon dioxide. *J Bacteriol* **174**:5693-701.
72. **Caparon, M. G., D. S. Stephens, A. Olsen, and J. R. Scott.** 1991. Role of M protein in adherence of group A streptococci. *Infect Immun* **59**:1811-7.
73. **Carapetis, J. R., A. C. Steer, E. K. Mulholland, and M. Weber.** 2005. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis* **5**:685-94.

74. **Carlsson, F., C. Sandin, and G. Lindahl.** 2005. Human fibrinogen bound to *Streptococcus pyogenes* M protein inhibits complement deposition via the classical pathway. *Mol Microbiol* **56**:28-39.
75. **Carr, A., D. D. Sledjeski, A. Podbielski, M. D. Boyle, and B. Kreikemeyer.** 2001. Similarities between complement-mediated and streptolysin S-mediated hemolysis. *J Biol Chem* **276**:41790-6.
76. **Caswell, C. C., E. Lukomska, N. S. Seo, M. Hook, and S. Lukomski.** 2007. Sc11-dependent internalization of group A *Streptococcus* via direct interactions with the alpha2beta(1) integrin enhances pathogen survival and re-emergence. *Mol Microbiol* **64**:1319-31.
77. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2003. Outbreak of group A streptococcal pneumonia among Marine Corps Recruits--California, November 1-December 20, 2002. *JAMA* **289**:1373-5.
78. **Chatellier, S., N. Ihendyane, R. G. Kansal, F. Khambaty, H. Basma, A. Norrby-Teglund, D. E. Low, A. McGeer, and M. Kotb.** 2000. Genetic relatedness and superantigen expression in group A *Streptococcus* serotype M1 isolates from patients with severe and nonsevere invasive diseases. *Infect Immun* **68**:3523-34.
79. **Chaussee, M. S., G. L. Sylva, D. E. Sturdevant, L. M. Smoot, M. R. Graham, R. O. Watson, and J. M. Musser.** 2002. Rgg influences the expression of multiple regulatory loci to coregulate virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **70**:762-70.
80. **Chen, S. M., Y. S. Tsai, C. M. Wu, S. K. Liao, L. C. Wu, C. S. Chang, Y. H. Liu, and P. J. Tsai.** 2010. Streptococcal collagen-like surface protein 1 promotes adhesion to the respiratory epithelial cell. *BMC Microbiol* **10**:320.
81. **Chuang, I., C. Van Beneden, B. Beall, and A. Schuchat.** 2002. Population-based surveillance for postpartum invasive group a *streptococcus* infections, 1995-2000. *Clin Infect Dis* **35**:665-70.
82. **Churchward, G.** 2007. The two faces of Janus: virulence gene regulation by CovR/S in group A streptococci. *Mol Microbiol* **64**:34-41.
83. **Churchward, G., C. Bates, A. A. Gusa, V. Stringer, and J. R. Scott.** 2009. Regulation of streptokinase expression by CovR/S in *Streptococcus pyogenes*: CovR acts through a single high-affinity binding site. *Microbiology* **155**:566-75.
84. **Clancy, J., J. Petitpas, F. Dib-Hajj, W. Yuan, M. Cronan, A. V. Kamath, J. Bergeron, and J. A. Retsema.** 1996. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **22**:867-79.
85. **Cleary, P. P., U. Prahbu, J. B. Dale, D. E. Wexler, and J. Handley.** 1992. Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase. *Infect Immun* **60**:5219-23.
86. **Cohen, R., C. Levy, C. Doit, F. De La Rocque, M. Boucherat, F. Fitoussi, J. Languet, and E. Bingen.** 1996. Six-day amoxicillin vs. ten-day penicillin V therapy for group A streptococcal tonsillopharyngitis. *Pediatr Infect Dis J* **15**:678-82.
87. **Cole, J. N., T. C. Barnett, V. Nizet, and M. J. Walker.** 2011. Molecular insight into invasive group A streptococcal disease. *Nat Rev Microbiol* **9**:724-36.
88. **Collin, M., and A. Olsen.** 2001. Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins. *Infect Immun* **69**:7187-9.
89. **Collin, M., and A. Olsen.** 2001. EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG. *EMBO J* **20**:3046-55.

90. **Commons, R., S. Rogers, T. Gooding, M. Danchin, J. Carapetis, R. Robins-Browne, and N. Curtis.** 2008. Superantigen genes in group A streptococcal isolates and their relationship with *emm* types. *J Med Microbiol* **57**:1238-46.
91. **Cortés, G., and M. R. Wessels.** 2009. Inhibition of Dendritic Cell Maturation by Group A *Streptococcus*. *Journal of Infectious Diseases* **200**:1152-1161.
92. **Courtney, H. S., M. S. Bronze, J. B. Dale, and D. L. Hasty.** 1994. Analysis of the role of M24 protein in group A streptococcal adhesion and colonization by use of omega-interposon mutagenesis. *Infect Immun* **62**:4868-73.
93. **Courtney, H. S., D. L. Hasty, and J. B. Dale.** 2006. Anti-phagocytic mechanisms of *Streptococcus pyogenes*: binding of fibrinogen to M-related protein. *Mol Microbiol* **59**:936-47.
94. **Courtney, H. S., Y. Li, J. B. Dale, and D. L. Hasty.** 1994. Cloning, sequencing, and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A streptococci. *Infect Immun* **62**:3937-46.
95. **Courtney, H. S., S. Liu, J. B. Dale, and D. L. Hasty.** 1997. Conversion of M serotype 24 of *Streptococcus pyogenes* to M serotypes 5 and 18: effect on resistance to phagocytosis and adhesion to host cells. *Infect Immun* **65**:2472-4.
96. **Coyle, E. A., R. Cha, and M. J. Rybak.** 2003. Influences of linezolid, penicillin, and clindamycin, alone and in combination, on streptococcal pyrogenic exotoxin a release. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1752-5.
97. **Crater, D. L., B. A. Dougherty, and I. van de Rijn.** 1995. Molecular characterization of *hasC* from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. Demonstration of UDP-glucose pyrophosphorylase activity. *J Biol Chem* **270**:28676-80.
98. **Crater, D. L., and I. van de Rijn.** 1995. Hyaluronic acid synthesis operon (*has*) expression in group A streptococci. *J Biol Chem* **270**:18452-8.
99. **Creti, R., M. Imperi, L. Baldassarri, M. Pataracchia, S. Recchia, G. Alfarone, and G. Orefici.** 2007. *emm* Types, virulence factors, and antibiotic resistance of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Italy: What has changed in 11 years? *J Clin Microbiol* **45**:2249-56.
100. **Cu, G. A., S. Mezzano, J. D. Bannan, and J. B. Zabriskie.** 1998. Immunohistochemical and serological evidence for the role of streptococcal proteinase in acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Kidney Int* **54**:819-26.
101. **Cue, D., P. E. Dombek, H. Lam, and P. P. Cleary.** 1998. *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. *Infect Immun* **66**:4593-601.
102. **Cue, D., S. O. Southern, P. J. Southern, J. Prabhakar, W. Lorelli, J. M. Smallheer, S. A. Mousa, and P. P. Cleary.** 2000. A nonpeptide integrin antagonist can inhibit epithelial cell ingestion of *Streptococcus pyogenes* by blocking formation of integrin alpha 5beta 1-fibronectin-M1 protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:2858-63.
103. **Cunningham, M. W.** 2000. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* **13**:470-511.
104. **Cunningham, M. W.** 2012. *Streptococcus* and rheumatic fever. *Curr Opin Rheumatol* **24**:408-16.
105. **Currie, B. J., and J. R. Carapetis.** 2000. Skin infections and infestations in Aboriginal communities in northern Australia. *Australas J Dermatol* **41**:139-43; quiz 144-5.
106. **Cywes, C., I. Stamenkovic, and M. R. Wessels.** 2000. CD44 as a receptor for colonization of the pharynx by group A *Streptococcus*. *J Clin Invest* **106**:995-1002.

107. **Cywes, C., and M. R. Wessels.** 2001. Group A *Streptococcus* tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. *Nature* **414**:648-52.
108. **D'Alessandri, R., G. Plotkin, R. M. Kluge, M. K. Wittner, E. N. Fox, A. Dorfman, and R. H. Waldman.** 1978. Protective studies with group A streptococcal M protein vaccine. III. Challenge of volunteers after systemic or intranasal immunization with Type 3 or Type 12 group A *Streptococcus*. *J Infect Dis* **138**:712-8.
109. **d'Humieres, C., R. Cohen, C. Levy, P. Bidet, F. Thollot, A. Wollner, and E. Bingen.** 2012. Decline in macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates from French children. *Int J Med Microbiol* **302**:300-3.
110. **Dale, J. B.** 1999. Multivalent group A streptococcal vaccine designed to optimize the immunogenicity of six tandem M protein fragments. *Vaccine* **17**:193-200.
111. **Dale, J. B., and E. C. Chiang.** 1995. Intranasal immunization with recombinant group A streptococcal M protein fragment fused to the B subunit of Escherichia coli labile toxin protects mice against systemic challenge infections. *J Infect Dis* **171**:1038-41.
112. **Dale, J. B., E. Y. Chiang, and J. W. Lederer.** 1993. Recombinant tetravalent group A streptococcal M protein vaccine. *J Immunol* **151**:2188-94.
113. **Dale, J. B., E. Y. Chiang, S. Liu, H. S. Courtney, and D. L. Hasty.** 1999. New protective antigen of group A streptococci. *J Clin Invest* **103**:1261-8.
114. **Dale, J. B., J. M. Seyer, and E. H. Beachey.** 1983. Type-specific immunogenicity of a chemically synthesized peptide fragment of type 5 streptococcal M protein. *J Exp Med* **158**:1727-32.
115. **Dale, J. B., M. Simmons, E. C. Chiang, and E. Y. Chiang.** 1996. Recombinant, octavalent group A streptococcal M protein vaccine. *Vaccine* **14**:944-8.
116. **Dale, J. B., R. G. Washburn, M. B. Marques, and M. R. Wessels.** 1996. Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect Immun* **64**:1495-501.
117. **Dalton, T. L., J. T. Collins, T. C. Barnett, and J. R. Scott.** 2006. RscA, a member of the MDR1 family of transporters, is repressed by CovR and required for growth of *Streptococcus pyogenes* under heat stress. *J Bacteriol* **188**:77-85.
118. **Dalton, T. L., and J. R. Scott.** 2004. CovS inactivates CovR and is required for growth under conditions of general stress in *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **186**:3928-37.
119. **Danchin, M. H., S. Rogers, L. Kelpie, G. Selvaraj, N. Curtis, J. B. Carlin, T. M. Nolan, and J. R. Carapetis.** 2007. Burden of acute sore throat and group A streptococcal pharyngitis in school-aged children and their families in Australia. *Pediatrics* **120**:950-7.
120. **Daneman, N., K. A. Green, D. E. Low, A. E. Simor, B. Willey, B. Schwartz, B. Toye, P. Jessamine, G. J. Tyrrell, S. Krajdén, L. Ramage, D. Rose, R. Schertzberg, D. Bragg, and A. McGeer.** 2007. Surveillance for hospital outbreaks of invasive group a streptococcal infections in Ontario, Canada, 1992 to 2000. *Ann Intern Med* **147**:234-41.
121. **Dano, K., P. A. Andreasen, J. Grondahl-Hansen, P. Kristensen, L. S. Nielsen, and L. Skriver.** 1985. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* **44**:139-266.
122. **Darenberg, J., N. Ihendyane, J. Sjolín, E. Aufwerber, S. Haidl, P. Follin, J. Andersson, and A. Norrby-Teglund.** 2003. Intravenous immunoglobulin G therapy in streptococcal toxic shock syndrome: a European randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis* **37**:333-40.



123. **Datta, V., S. M. Myskowski, L. A. Kwinn, D. N. Chiem, N. Varki, R. G. Kansal, M. Kotb, and V. Nizet.** 2005. Mutational analysis of the group A streptococcal operon encoding streptolysin S and its virulence role in invasive infection. *Mol Microbiol* **56**:681-95.
124. **Davies, H. D., A. McGeer, B. Schwartz, K. Green, D. Cann, A. E. Simor, and D. E. Low.** 1996. Invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada. Ontario Group A Streptococcal Study Group. *N Engl J Med* **335**:547-54.
125. **DeAngelis, P. L., J. Papaconstantinou, and P. H. Weigel.** 1993. Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* **268**:19181-4.
126. **Deltcheva, E., K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pirzada, M. R. Eckert, J. Vogel, and E. Charpentier.** 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* **471**:602-7.
127. **Deutscher, M., S. Schillie, C. Gould, J. Baumbach, M. Mueller, C. Avery, and C. A. Van Beneden.** 2011. Investigation of a group A streptococcal outbreak among residents of a long-term acute care hospital. *Clin Infect Dis* **52**:988-94.
128. **Dhakal, R., S. Sujatha, S. C. Parija, and B. V. Bhat.** 2010. Asymptomatic colonization of upper respiratory tract by potential bacterial pathogens. *Indian J Pediatr* **77**:775-8.
129. **Dinkla, K., M. Rohde, W. T. Jansen, J. R. Carapetis, G. S. Chhatwal, and S. R. Talay.** 2003. *Streptococcus pyogenes* recruits collagen via surface-bound fibronectin: a novel colonization and immune evasion mechanism. *Mol Microbiol* **47**:861-9.
130. **Dombek, P. E., D. Cue, J. Sedgewick, H. Lam, S. Ruschkowski, B. B. Finlay, and P. P. Cleary.** 1999. High-frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci: M1 protein-mediated invasion and cytoskeletal rearrangements. *Mol Microbiol* **31**:859-70.
131. **Dougherty, B. A., and I. van de Rijn.** 1992. Molecular characterization of a locus required for hyaluronic acid capsule production in group A streptococci. *J Exp Med* **175**:1291-9.
132. **Dougherty, B. A., and I. van de Rijn.** 1994. Molecular characterization of *hasA* from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. *J Biol Chem* **269**:169-75.
133. **Dougherty, B. A., and I. van de Rijn.** 1993. Molecular characterization of *hasB* from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. Demonstration of UDP-glucose dehydrogenase activity. *J Biol Chem* **268**:7118-24.
134. **Duben, J., J. Jelinkova, J. Jelinek, and J. Rotta.** 1979. Prospective study on streptococcal pharyngitis among a town population. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* **23**:159-67.
135. **Eagle, H.** 1952. Experimental approach to the problem of treatment failure with penicillin. I. Group A streptococcal infection in mice. *Am J Med* **13**:389-99.
136. **Edwards, R. J., G. W. Taylor, M. Ferguson, S. Murray, N. Rendell, A. Wrigley, Z. Bai, J. Boyle, S. J. Finney, A. Jones, H. H. Russell, C. Turner, J. Cohen, L. Faulkner, and S. Sriskandan.** 2005. Specific C-terminal cleavage and inactivation of interleukin-8 by invasive disease isolates of *Streptococcus pyogenes*. *J Infect Dis* **192**:783-90.
137. **Egesten, A., M. Eliasson, H. M. Johansson, A. I. Olin, M. Morgelin, A. Mueller, J. E. Pease, I. M. Frick, and L. Bjorck.** 2007. The CXC chemokine MIG/CXCL9 is important in innate immunity against *Streptococcus pyogenes*. *J Infect Dis* **195**:684-93.

138. **Elliott, S. D.** 1945. A Proteolytic Enzyme Produced by Group a Streptococci with Special Reference to Its Effect on the Type-Specific M Antigen. *J Exp Med* **81**:573-92.
139. **Engleberg, N. C., A. Heath, A. Miller, C. Rivera, and V. J. DiRita.** 2001. Spontaneous mutations in the CsrRS two-component regulatory system of *Streptococcus pyogenes* result in enhanced virulence in a murine model of skin and soft tissue infection. *J Infect Dis* **183**:1043-54.
140. **Enright, M. C., and B. G. Spratt.** 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* **7**:482-7.
141. **Enright, M. C., B. G. Spratt, A. Kalia, J. H. Cross, and D. E. Bessen.** 2001. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between *emm* type and clone. *Infect Immun* **69**:2416-27.
142. **Eran, Y., Y. Getter, M. Baruch, I. Belotserkovsky, G. Padalon, I. Mishalian, A. Podbielski, B. Kreikemeyer, and E. Hanski.** 2007. Transcriptional regulation of the *sil* locus by the SilCR signalling peptide and its implications on group A *streptococcus* virulence. *Mol Microbiol* **63**:1209-22.
143. **Eriksson, A., and M. Norgren.** 2003. Cleavage of antigen-bound immunoglobulin G by SpeB contributes to streptococcal persistence in opsonizing blood. *Infect Immun* **71**:211-7.
144. **Facklam, R. F., D. R. Martin, M. Lovgren, D. R. Johnson, A. Efstratiou, T. A. Thompson, S. Gowan, P. Kriz, G. J. Tyrrell, E. Kaplan, and B. Beall.** 2002. Extension of the Lancefield classification for group A streptococci by addition of 22 new M protein gene sequence types from clinical isolates: *emm103* to *emm124*. *Clin Infect Dis* **34**:28-38.
145. **Factor, S. H., O. S. Levine, B. Schwartz, L. H. Harrison, M. M. Farley, A. McGeer, and A. Schuchat.** 2003. Invasive group A streptococcal disease: risk factors for adults. *Emerg Infect Dis* **9**:970-7.
146. **Falugi, F., C. Zingaretti, V. Pinto, M. Mariani, L. Amodeo, A. G. Manetti, S. Capo, J. M. Musser, G. Orefici, I. Margarit, J. L. Telford, G. Grandi, and M. Mora.** 2008. Sequence variation in group A *Streptococcus pili* and association of pilus backbone types with lancefield T serotypes. *J Infect Dis* **198**:1834-41.
147. **Farmand, S., P. Henneke, M. Hufnagel, and R. Berner.** 2012. Significant decline in the erythromycin resistance of group A *streptococcus* isolates at a German paediatric tertiary care centre. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**:707-10.
148. **Federle, M. J., K. S. McIver, and J. R. Scott.** 1999. A response regulator that represses transcription of several virulence operons in the group A *streptococcus*. *J Bacteriol* **181**:3649-57.
149. **Federle, M. J., and J. R. Scott.** 2002. Identification of binding sites for the group A streptococcal global regulator CovR. *Mol Microbiol* **43**:1161-72.
150. **Fernie-King, B. A., D. J. Seilly, A. Davies, and P. J. Lachmann.** 2002. Streptococcal inhibitor of complement inhibits two additional components of the mucosal innate immune system: secretory leukocyte proteinase inhibitor and lysozyme. *Infect Immun* **70**:4908-16.
151. **Fernie-King, B. A., D. J. Seilly, C. Willers, R. Wurznner, A. Davies, and P. J. Lachmann.** 2001. Streptococcal inhibitor of complement (SIC) inhibits the membrane attack complex by preventing uptake of C567 onto cell membranes. *Immunology* **103**:390-8.

152. **Ferretti, J. J., W. M. McShan, D. Ajdic, D. J. Savic, G. Savic, K. Lyon, C. Primeaux, S. Sezate, A. N. Suvorov, S. Kenton, H. S. Lai, S. P. Lin, Y. Qian, H. G. Jia, F. Z. Najjar, Q. Ren, H. Zhu, L. Song, J. White, X. Yuan, S. W. Clifton, B. A. Roe, and R. McLaughlin.** 2001. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4658-63.
153. **Firon, A., A. Tazi, V. Da Cunha, S. Brinster, E. Sauvage, S. Dramsi, D. T. Golenbock, P. Glaser, C. Poyart, and P. Trieu-Cuot.** 2013. The Abi-domain protein Abx1 interacts with the CovS histidine kinase to control virulence gene expression in group B *Streptococcus*. *PLoS Pathog* **9**:e1003179.
154. **Fischetti, V. A.** 1991. Streptococcal M protein. *Sci Am* **264**:58-65.
155. **Fischetti, V. A.** 1989. Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clin Microbiol Rev* **2**:285-314.
156. **Fischetti, V. A., K. F. Jones, and J. R. Scott.** 1985. Size variation of the M protein in group A streptococci. *J Exp Med* **161**:1384-401.
157. **Fischetti, V. A., V. Pancholi, and O. Schneewind.** 1990. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Mol Microbiol* **4**:1603-5.
158. **Fittipaldi, N., S. B. Beres, R. J. Olsen, V. Kapur, P. R. Shea, M. E. Watkins, C. C. Cantu, D. R. Laucirica, L. Jenkins, A. R. Flores, M. Lovgren, C. Ardanuy, J. Linares, D. E. Low, G. J. Tyrrell, and J. M. Musser.** 2012. Full-genome dissection of an epidemic of severe invasive disease caused by a hypervirulent, recently emerged clone of group A *Streptococcus*. *Am J Pathol* **180**:1522-34.
159. **Fluckiger, U., K. F. Jones, and V. A. Fischetti.** 1998. Immunoglobulins to group A streptococcal surface molecules decrease adherence to and invasion of human pharyngeal cells. *Infect Immun* **66**:974-9.
160. **Fox, E. N., R. H. Waldman, M. K. Wittner, A. A. Mauceri, and A. Dorfman.** 1973. Protective study with a group A streptococcal M protein vaccine. Infectivity challenge of human volunteers. *J Clin Invest* **52**:1885-92.
161. **Fritzer, A., B. M. Senn, D. B. Minh, M. Hanner, D. Gelbmann, B. Noiges, T. Henics, K. Schulze, C. A. Guzman, J. Goodacre, A. von Gabain, E. Nagy, and A. L. Meinke.** 2010. Novel conserved group A streptococcal proteins identified by the antigenome technology as vaccine candidates for a non-M protein-based vaccine. *Infect Immun* **78**:4051-67.
162. **Froehlich, B. J., C. Bates, and J. R. Scott.** 2009. *Streptococcus pyogenes* CovRS mediates growth in iron starvation and in the presence of the human cationic antimicrobial peptide LL-37. *J Bacteriol* **191**:673-7.
163. **Gao, J., A. A. Gusa, J. R. Scott, and G. Churchward.** 2005. Binding of the global response regulator protein CovR to the *sag* promoter of *Streptococcus pyogenes* reveals a new mode of CovR-DNA interaction. *J Biol Chem* **280**:38948-56.
164. **Garcia, A. F., L. M. Abe, G. Erdem, C. L. Cortez, D. Kurahara, and K. Yamaga.** 2010. An insert in the *covS* gene distinguishes a pharyngeal and a blood isolate of *Streptococcus pyogenes* found in the same individual. *Microbiology* **156**:3085-95.
165. **Garnier, A., M. Peuchmaur, and G. Deschenes.** 2009. [Postinfectious acute glomerulonephritis]. *Nephrol Ther* **5**:97-101.
166. **Gastanaduy, A. S., E. L. Kaplan, B. B. Huwe, C. McKay, and L. W. Wannamaker.** 1980. Failure of penicillin to eradicate group A streptococci during an outbreak of pharyngitis. *Lancet* **2**:498-502.

167. **Gemmell, C. G., P. K. Peterson, D. Schmeling, Y. Kim, J. Mathews, L. Wannamaker, and P. G. Quie.** 1981. Potentiation of opsonization and phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* following growth in the presence of clindamycin. *J Clin Invest* **67**:1249-56.
168. **Gerber, M. A., R. S. Baltimore, C. B. Eaton, M. Gewitz, A. H. Rowley, S. T. Shulman, and K. A. Taubert.** 2009. Prevention of rheumatic fever and diagnosis and treatment of acute Streptococcal pharyngitis: a scientific statement from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, the Interdisciplinary Council on Functional Genomics and Translational Biology, and the Interdisciplinary Council on Quality of Care and Outcomes Research: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* **119**:1541-51.
169. **Gibson, C., G. Fogg, N. Okada, R. T. Geist, E. Hanski, and M. Caparon.** 1995. Regulation of host cell recognition in *Streptococcus pyogenes*. *Dev Biol Stand* **85**:137-44.
170. **Goldmann, O., G. S. Chhatwal, and E. Medina.** 2004. Role of host genetic factors in susceptibility to group A streptococcal infections. *Indian J Med Res* **119 Suppl**:141-3.
171. **Goldmann, O., M. Rohde, G. S. Chhatwal, and E. Medina.** 2004. Role of macrophages in host resistance to group A streptococci. *Infect Immun* **72**:2956-63.
172. **Goodfellow, A. M., M. Hibble, S. R. Talay, B. Kreikemeyer, B. J. Currie, K. S. Sriprakash, and G. S. Chhatwal.** 2000. Distribution and antigenicity of fibronectin binding proteins (SfbI and SfbII) of *Streptococcus pyogenes* clinical isolates from the northern territory, Australia. *J Clin Microbiol* **38**:389-92.
173. **Goossens, H., M. Ferech, R. Vander Stichele, and M. Elseviers.** 2005. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* **365**:579-87.
174. **Goroncy-Bermes, P., J. B. Dale, E. H. Beachey, and W. Opferkuch.** 1987. Monoclonal antibody to human renal glomeruli cross-reacts with streptococcal M protein. *Infect Immun* **55**:2416-9.
175. **Goshorn, S. C., and P. M. Schlievert.** 1988. Nucleotide sequence of streptococcal pyrogenic exotoxin type C. *Infect Immun* **56**:2518-20.
176. **Graham, M. R., L. M. Smoot, C. A. Migliaccio, K. Virtaneva, D. E. Sturdevant, S. F. Porcella, M. J. Federle, G. J. Adams, J. R. Scott, and J. M. Musser.** 2002. Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and in vivo infection modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:13855-60.
177. **Green, M. D., B. Beall, M. J. Marcon, C. H. Allen, J. S. Bradley, B. Dashefsky, J. R. Gilsdorf, G. E. Schutze, C. Smith, E. B. Walter, J. M. Martin, K. M. Edwards, K. A. Barbadora, and E. R. Wald.** 2006. Multicentre surveillance of the prevalence and molecular epidemiology of macrolide resistance among pharyngeal isolates of group A streptococci in the USA. *J Antimicrob Chemother* **57**:1240-3.
178. **Green, N. M., S. Zhang, S. F. Porcella, M. J. Nagiec, K. D. Barbian, S. B. Beres, R. B. LeFebvre, and J. M. Musser.** 2005. Genome sequence of a serotype M28 strain of group a *streptococcus*: potential new insights into puerperal sepsis and bacterial disease specificity. *J Infect Dis* **192**:760-70.
179. **Gryllos, I., R. Grifantini, A. Colaprico, S. Jiang, E. Deforce, A. Hakansson, J. L. Telford, G. Grandi, and M. R. Wessels.** 2007. Mg(2+) signalling defines the group A streptococcal CsrRS (CovRS) regulon. *Mol Microbiol* **65**:671-83.

180. **Gryllos, I., J. C. Levin, and M. R. Wessels.** 2003. The CsrR/CsrS two-component system of group A *Streptococcus* responds to environmental Mg<sup>2+</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:4227-32.
181. **Gryllos, I., H. J. Tran-Winkler, M. F. Cheng, H. Chung, R. Bolcome, 3rd, W. Lu, R. I. Lehrer, and M. R. Wessels.** 2008. Induction of group A *Streptococcus* virulence by a human antimicrobial peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:16755-60.
182. **Guedez, Y., A. Kotby, M. El-Demellawy, A. Galal, G. Thomson, S. Zaher, S. Kassem, and M. Kotb.** 1999. HLA class II associations with rheumatic heart disease are more evident and consistent among clinically homogeneous patients. *Circulation* **99**:2784-90.
183. **Guillemot, D., P. Weber, P. Bidet, R. Cohen, Y. Pean, P. Choutet, C. Poyart, C. Bernede, E. Bingen, and H. Portier.** 2007. Sensibilité aux macrolides et apparentés de *Streptococcus pyogenes* (SGA) au cours des angines aiguës en France, hiver 2005-2006. *Bull Epidemiol Hebd* **33**:291-3.
184. **Gusa, A. A., B. J. Froehlich, D. Desai, V. Stringer, and J. R. Scott.** 2007. CovR activation of the dipeptide permease promoter (*PdppA*) in Group A *Streptococcus*. *J Bacteriol* **189**:1407-16.
185. **Gusa, A. A., J. Gao, V. Stringer, G. Churchward, and J. R. Scott.** 2006. Phosphorylation of the group A Streptococcal CovR response regulator causes dimerization and promoter-specific recruitment by RNA polymerase. *J Bacteriol* **188**:4620-6.
186. **Gusa, A. A., and J. R. Scott.** 2005. The CovR response regulator of group A *streptococcus* (GAS) acts directly to repress its own promoter. *Mol Microbiol* **56**:1195-207.
187. **Gustafsson, M. C., J. Lannergard, O. R. Nilsson, B. M. Kristensen, J. E. Olsen, C. L. Harris, R. L. Ufret-Vincenty, M. Stalhammar-Carlemalm, and G. Lindahl.** 2013. Factor H binds to the hypervariable region of many *Streptococcus pyogenes* M proteins but does not promote phagocytosis resistance or acute virulence. *PLoS Pathog* **9**:e1003323.
188. **Haanes, E. J., and P. P. Cleary.** 1989. Identification of a divergent M protein gene and an M protein-related gene family in *Streptococcus pyogenes* serotype 49. *J Bacteriol* **171**:6397-408.
189. **Hackett, S. P., and D. L. Stevens.** 1992. Streptococcal toxic shock syndrome: synthesis of tumor necrosis factor and interleukin-1 by monocytes stimulated with pyrogenic exotoxin A and streptolysin O. *J Infect Dis* **165**:879-85.
190. **Hagman, M. M., J. B. Dale, and D. L. Stevens.** 1999. Comparison of adherence to and penetration of a human laryngeal epithelial cell line by group A streptococci of various M protein types. *FEMS Immunol Med Microbiol* **23**:195-204.
191. **Hall, M. A., S. D. Stroop, M. C. Hu, M. A. Walls, M. A. Reddish, D. S. Burt, G. H. Lowell, and J. B. Dale.** 2004. Intranasal immunization with multivalent group A streptococcal vaccines protects mice against intranasal challenge infections. *Infect Immun* **72**:2507-12.
192. **Hanski, E., and M. Caparon.** 1992. Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A *streptococcus* *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6172-6.
193. **Hartas, J., and K. S. Sriprakash.** 1999. *Streptococcus pyogenes* strains containing *emm12* and *emm55* possess a novel gene coding for distantly related SIC protein. *Microb Pathog* **26**:25-33.
194. **Hasty, D. L., I. Ofek, H. S. Courtney, and R. J. Doyle.** 1992. Multiple adhesins of streptococci. *Infect Immun* **60**:2147-52.

195. **Hauser, A. R., and P. M. Schlievert.** 1990. Nucleotide sequence of the streptococcal pyrogenic exotoxin type B gene and relationship between the toxin and the streptococcal proteinase precursor. *J Bacteriol* **172**:4536-42.
196. **Hauser, A. R., D. L. Stevens, E. L. Kaplan, and P. M. Schlievert.** 1991. Molecular analysis of pyrogenic exotoxins from *Streptococcus pyogenes* isolates associated with toxic shock-like syndrome. *J Clin Microbiol* **29**:1562-7.
197. **Heath, A., V. J. DiRita, N. L. Barg, and N. C. Engleberg.** 1999. A two-component regulatory system, CsrR-CsrS, represses expression of three *Streptococcus pyogenes* virulence factors, hyaluronic acid capsule, streptolysin S, and pyrogenic exotoxin B. *Infect Immun* **67**:5298-305.
198. **Henningham, A., E. Chiarot, C. M. Gillen, J. N. Cole, M. Rohde, M. Fulde, V. Ramachandran, A. J. Cork, J. Hartas, G. Magor, S. P. Djordjevic, S. J. Cordwell, B. Kobe, K. S. Sriprakash, V. Nizet, G. S. Chhatwal, I. Y. Margarit, M. R. Batzloff, and M. J. Walker.** 2012. Conserved anchorless surface proteins as group A streptococcal vaccine candidates. *J Mol Med (Berl)* **90**:1197-207.
199. **Herbert, D., and E. W. Todd.** 1944. The oxygen-stable haemolysin of group A haemolytic streptococci (streptolysin S). *Br. J. Exp. Pathol.* **25**:242-254.
200. **Hertzen, E., L. Johansson, R. Wallin, H. Schmidt, M. Kroll, A. P. Rehn, M. Kotb, M. Morgelin, and A. Norrby-Teglund.** 2010. M1 protein-dependent intracellular trafficking promotes persistence and replication of *Streptococcus pyogenes* in macrophages. *J Innate Immun* **2**:534-45.
201. **Herwald, H., M. Collin, W. Muller-Esterl, and L. Bjorck.** 1996. Streptococcal cysteine proteinase releases kinins: a virulence mechanism. *J Exp Med* **184**:665-73.
202. **Herwald, H., H. Cramer, M. Morgelin, W. Russell, U. Sollenberg, A. Norrby-Teglund, H. Flodgaard, L. Lindbom, and L. Bjorck.** 2004. M protein, a classical bacterial virulence determinant, forms complexes with fibrinogen that induce vascular leakage. *Cell* **116**:367-79.
203. **Hidalgo-Grass, C., M. Dan-Goor, A. Maly, Y. Eran, L. A. Kwinn, V. Nizet, M. Ravins, J. Jaffe, A. Peyser, A. E. Moses, and E. Hanski.** 2004. Effect of a bacterial pheromone peptide on host chemokine degradation in group A streptococcal necrotising soft-tissue infections. *Lancet* **363**:696-703.
204. **Hidalgo-Grass, C., I. Mishalian, M. Dan-Goor, I. Belotserkovsky, Y. Eran, V. Nizet, A. Peled, and E. Hanski.** 2006. A streptococcal protease that degrades CXC chemokines and impairs bacterial clearance from infected tissues. *EMBO J* **25**:4628-37.
205. **Hidalgo-Grass, C., M. Ravins, M. Dan-Goor, J. Jaffe, A. E. Moses, and E. Hanski.** 2002. A locus of group A *Streptococcus* involved in invasive disease and DNA transfer. *Mol Microbiol* **46**:87-99.
206. **Hoe, N., K. Nakashima, D. Grigsby, X. Pan, S. J. Dou, S. Naidich, M. Garcia, E. Kahn, D. Bergmire-Sweat, and J. M. Musser.** 1999. Rapid molecular genetic subtyping of serotype M1 group A *Streptococcus* strains. *Emerg Infect Dis* **5**:254-63.
207. **Hoe, N. P., R. M. Ireland, F. R. DeLeo, B. B. Gowen, D. W. Dorward, J. M. Voyich, M. Liu, E. H. Burns, Jr., D. M. Culnan, A. Bretscher, and J. M. Musser.** 2002. Insight into the molecular basis of pathogen abundance: group A *Streptococcus* inhibitor of complement inhibits bacterial adherence and internalization into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7646-51.

208. **Hoe, N. P., K. Nakashima, S. Lukomski, D. Grigsby, M. Liu, P. Kordari, S. J. Dou, X. Pan, J. Vuopio-Varkila, S. Salmelinna, A. McGeer, D. E. Low, B. Schwartz, A. Schuchat, S. Naidich, D. De Lorenzo, Y. X. Fu, and J. M. Musser.** 1999. Rapid selection of complement-inhibiting protein variants in group A *Streptococcus* epidemic waves. *Nat Med* **5**:924-9.
209. **Hoff, J., M. DeWald, S. Moseley, C. Collins, and J. Voyich.** 2011. SpyA, a C3-like ADP-ribosyltransferase, contributes to virulence in a mouse subcutaneous model of *Streptococcus pyogenes* infection. *Infect Immun*. **79**:2404-11.
210. **Holden, M. T., A. Scott, I. Cherevach, T. Chillingworth, C. Churcher, A. Cronin, L. Dowd, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, M. A. Quail, C. Price, E. Rabinowitsch, S. Sharp, J. Skelton, S. Whitehead, B. G. Barrell, M. Kehoe, and J. Parkhill.** 2007. Complete genome of acute rheumatic fever-associated serotype M5 *Streptococcus pyogenes* strain manfredo. *J Bacteriol* **189**:1473-7.
211. **Hollands, A., M. A. Pence, A. M. Timmer, S. R. Osvath, L. Turnbull, C. B. Whitchurch, M. J. Walker, and V. Nizet.** 2010. Genetic switch to hypervirulence reduces colonization phenotypes of the globally disseminated group A *streptococcus* MIT1 clone. *J Infect Dis* **202**:11-9.
212. **Hollingshead, S. K., V. A. Fischetti, and J. R. Scott.** 1987. A highly conserved region present in transcripts encoding heterologous M proteins of group A streptococci. *Infect Immun* **55**:3237-9.
213. **Hollingshead, S. K., J. W. Simecka, and S. M. Michalek.** 1993. Role of M protein in pharyngeal colonization by group A streptococci in rats. *Infect Immun* **61**:2277-83.
214. **Holm, S. E., A. Norrby, A. M. Bergholm, and M. Norgren.** 1992. Aspects of pathogenesis of serious group A streptococcal infections in Sweden, 1988-1989. *J Infect Dis* **166**:31-7.
215. **Hondorp, E. R., and K. S. McIver.** 2007. The Mga virulence regulon: infection where the grass is greener. *Mol Microbiol* **66**:1056-65.
216. **Horaud T., and C. Le Bouguenec.** 1989. Streptococcaceae. Flammarion.
217. **Horstmann, R. D., H. J. Sievertsen, J. Knobloch, and V. A. Fischetti.** 1988. Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:1657-61.
218. **Hu, M. C., M. A. Walls, S. D. Stroop, M. A. Reddish, B. Beall, and J. B. Dale.** 2002. Immunogenicity of a 26-valent group A streptococcal vaccine. *Infect Immun* **70**:2171-7.
219. **Humtsoe, J. O., J. K. Kim, Y. Xu, D. R. Keene, M. Hook, S. Lukomski, and K. K. Wary.** 2005. A streptococcal collagen-like protein interacts with the alpha2beta1 integrin and induces intracellular signaling. *J Biol Chem* **280**:13848-57.
220. **Husmann, L. K., D. L. Yung, S. K. Hollingshead, and J. R. Scott.** 1997. Role of putative virulence factors of *Streptococcus pyogenes* in mouse models of long-term throat colonization and pneumonia. *Infect Immun* **65**:1422-30.
221. **Ikebe, T., M. Ato, T. Matsumura, H. Hasegawa, T. Sata, K. Kobayashi, and H. Watanabe.** 2010. Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates. *PLoS Pathog* **6**:e1000832.

222. **Ikebe, T., K. Hirasawa, R. Suzuki, H. Ohya, J. Isobe, D. Tanaka, C. Katsukawa, R. Kawahara, M. Tomita, K. Ogata, M. Endoh, R. Okuno, Y. Tada, N. Okabe, and H. Watanabe.** 2007. Distribution of *emm* genotypes among group A *Streptococcus* isolates from patients with severe invasive streptococcal infections in Japan, 2001-2005. *Epidemiol Infect* **135**:1227-9.
223. **Jackson, S. J., A. C. Steer, and H. Campbell.** 2011. Systematic Review: Estimation of global burden of non-suppurative sequelae of upper respiratory tract infection: rheumatic fever and post-streptococcal glomerulonephritis. *Trop Med Int Health* **16**:2-11.
224. **Jadoun, J., O. Eyal, and S. Sela.** 2002. Role of CsrR, hyaluronic acid, and SpeB in the internalization of *Streptococcus pyogenes* M type 3 strain by epithelial cells. *Infect Immun* **70**:462-9.
225. **Jaffe, J., S. Natanson-Yaron, M. G. Caparon, and E. Hanski.** 1996. Protein F2, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, possesses two binding domains. *Mol Microbiol* **21**:373-84.
226. **Ji, Y., B. Carlson, A. Kondagunta, and P. P. Cleary.** 1997. Intranasal immunization with C5a peptidase prevents nasopharyngeal colonization of mice by the group A *Streptococcus*. *Infect Immun* **65**:2080-7.
227. **Ji, Y., L. McLandsborough, A. Kondagunta, and P. P. Cleary.** 1996. C5a peptidase alters clearance and trafficking of group A streptococci by infected mice. *Infect Immun* **64**:503-10.
228. **Jing, H. B., B. A. Ning, H. J. Hao, Y. L. Zheng, D. Chang, W. Jiang, and Y. Q. Jiang.** 2006. Epidemiological analysis of group A streptococci recovered from patients in China. *J Med Microbiol* **55**:1101-7.
229. **Johansson, L., P. Thulin, P. Sendi, E. Hertzén, A. Linder, P. Akesson, D. E. Low, B. Agerberth, and A. Norrby-Teglund.** 2008. Cathelicidin LL-37 in severe *Streptococcus pyogenes* soft tissue infections in humans. *Infect Immun* **76**:3399-404.
230. **Johnson, D. R., E. L. Kaplan, A. VanGheem, R. R. Facklam, and B. Beall.** 2006. Characterization of group A streptococci (*Streptococcus pyogenes*): correlation of M-protein and *emm*-gene type with T-protein agglutination pattern and serum opacity factor. *J Med Microbiol* **55**:157-64.
231. **Johnson, D. R., D. L. Stevens, and E. L. Kaplan.** 1992. Epidemiologic analysis of group A streptococcal serotypes associated with severe systemic infections, rheumatic fever, or uncomplicated pharyngitis. *J Infect Dis* **166**:374-82.
232. **Johansson, E., K. Berggard, H. Kotarsky, J. Hellwage, P. F. Zipfel, U. Sjöbring, and G. Lindahl.** 1998. Role of the hypervariable region in streptococcal M proteins: binding of a human complement inhibitor. *J Immunol* **161**:4894-901.
233. **Jones, K. F., and V. A. Fischetti.** 1988. The importance of the location of antibody binding on the M6 protein for opsonization and phagocytosis of group A M6 streptococci. *J Exp Med* **167**:1114-23.
234. **Kamezawa, Y., T. Nakahara, S. Nakano, Y. Abe, J. Nozaki-Renard, and T. Isono.** 1997. Streptococcal mitogenic exotoxin Z, a novel acidic superantigenic toxin produced by a T1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **65**:3828-33.
235. **Kansal, R. G., V. Nizet, A. Jeng, W. J. Chuang, and M. Kotb.** 2003. Selective modulation of superantigen-induced responses by streptococcal cysteine protease. *J Infect Dis* **187**:398-407.
236. **Kaplan, E. L.** 1991. The resurgence of group A streptococcal infections and their sequelae. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **10**:55-7.



237. **Kaplan, E. L., G. S. Chhatwal, and M. Rohde.** 2006. Reduced ability of penicillin to eradicate ingested group A streptococci from epithelial cells: clinical and pathogenetic implications. *Clin Infect Dis* **43**:1398-406.
238. **Kaplan, E. L., and D. R. Johnson.** 2001. Unexplained reduced microbiological efficacy of intramuscular benzathine penicillin G and of oral penicillin V in eradication of group a streptococci from children with acute pharyngitis. *Pediatrics* **108**:1180-6.
239. **Kapur, V., M. W. Majesky, L. L. Li, R. A. Black, and J. M. Musser.** 1993. Cleavage of interleukin 1 beta (IL-1 beta) precursor to produce active IL-1 beta by a conserved extracellular cysteine protease from *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:7676-80.
240. **Kapur, V., K. Nelson, P. M. Schlievert, R. K. Selander, and J. M. Musser.** 1992. Molecular population genetic evidence of horizontal spread of two alleles of the pyrogenic exotoxin C gene (*speC*) among pathogenic clones of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **60**:3513-7.
241. **Kapur, V., S. Topouzis, M. W. Majesky, L. L. Li, M. R. Hamrick, R. J. Hamill, J. M. Patti, and J. M. Musser.** 1993. A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microb Pathog* **15**:327-46.
242. **Katerov, V., P. E. Lindgren, A. A. Totolian, and C. Schalen.** 2000. Streptococcal opacity factor: a family of bifunctional proteins with lipoproteinase and fibronectin-binding activities. *Curr Microbiol* **40**:149-56.
243. **Kaul, R., A. McGeer, A. Norrby-Teglund, M. Kotb, B. Schwartz, K. O'Rourke, J. Talbot, and D. E. Low.** 1999. Intravenous immunoglobulin therapy for streptococcal toxic shock syndrome--a comparative observational study. The Canadian Streptococcal Study Group. *Clin Infect Dis* **28**:800-7.
244. **Kawabata, S., H. Kuwata, I. Nakagawa, S. Morimatsu, K. Sano, and S. Hamada.** 1999. Capsular hyaluronic acid of group A streptococci hampers their invasion into human pharyngeal epithelial cells. *Microb Pathog* **27**:71-80.
245. **Kilian, M., J. Mestecky, and M. W. Russell.** 1988. Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol Rev* **52**:296-303.
246. **Kimura, K. R., M. Nakata, T. Sumitomo, B. Kreikemeyer, A. Podbielski, Y. Terao, and S. Kawabata.** 2012. Involvement of T6 pili in biofilm formation by serotype M6 *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **194**:804-12.
247. **Kline, J. B., and C. M. Collins.** 1996. Analysis of the superantigenic activity of mutant and allelic forms of streptococcal pyrogenic exotoxin A. *Infect Immun* **64**:861-9.
248. **Koh, E., and S. Kim.** 2010. Decline in erythromycin resistance in group A Streptococci from acute pharyngitis due to changes in the *emm* Genotypes rather than restriction of antibiotic use. *Korean J Lab Med* **30**:485-90.
249. **Köller, T., A. Manetti, B. Kreikemeyer, C. Lembke, I. Margarit, G. Grandi, and A. Podbielski.** 2010. MIT1 group A streptococcal pili promote epithelial colonization but diminish systemic virulence through neutrophil extracellular entrapment. *J Med Microbiol*. **88**:371-81.
250. **Koller, T., A. G. Manetti, B. Kreikemeyer, C. Lembke, I. Margarit, G. Grandi, and A. Podbielski.** 2010. Typing of the pilus-protein-encoding FCT region and biofilm formation as novel parameters in epidemiological investigations of *Streptococcus pyogenes* isolates from various infection sites. *J Med Microbiol* **59**:442-52.

251. **Komaroff, A. L., T. M. Pass, M. D. Aronson, C. T. Ervin, S. Cretin, R. N. Winickoff, and W. T. Branch, Jr.** 1986. The prediction of streptococcal pharyngitis in adults. *J Gen Intern Med* **1**:1-7.
252. **Kotarsky, H., M. Gustafsson, H. G. Svensson, P. F. Zipfel, L. Truedsson, and U. Sjobring.** 2001. Group A streptococcal phagocytosis resistance is independent of complement factor H and factor H-like protein 1 binding. *Mol Microbiol* **41**:817-26.
253. **Kotb, M., A. Norrby-Teglund, A. McGeer, H. El-Sherbini, M. T. Dorak, A. Khurshid, K. Green, J. Peeples, J. Wade, G. Thomson, B. Schwartz, and D. E. Low.** 2002. An immunogenetic and molecular basis for differences in outcomes of invasive group A streptococcal infections. *Nat Med* **8**:1398-404.
254. **Kotloff, K. L., M. Corretti, K. Palmer, J. D. Campbell, M. A. Reddish, M. C. Hu, S. S. Wasserman, and J. B. Dale.** 2004. Safety and immunogenicity of a recombinant multivalent group a streptococcal vaccine in healthy adults: phase 1 trial. *JAMA* **292**:709-15.
255. **Kotloff, K. L., S. S. Wasserman, K. F. Jones, S. Livio, D. E. Hruby, C. A. Franke, and V. A. Fischetti.** 2005. Clinical and microbiological responses of volunteers to combined intranasal and oral inoculation with a *Streptococcus gordonii* carrier strain intended for future use as a group A streptococcus vaccine. *Infect Immun* **73**:2360-6.
256. **Kratovac, Z., A. Manoharan, F. Luo, S. Lizano, and D. E. Bessen.** 2007. Population genetics and linkage analysis of loci within the FCT region of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **189**:1299-310.
257. **Kreikemeyer, B., S. Beckert, A. Braun-Kiewnick, and A. Podbielski.** 2002. Group A streptococcal RofA-type global regulators exhibit a strain-specific genomic presence and regulation pattern. *Microbiology* **148**:1501-11.
258. **Kreikemeyer, B., D. R. Martin, and G. S. Chhatwal.** 1999. SfbII protein, a fibronectin binding surface protein of group A streptococci, is a serum opacity factor with high serotype-specific apolipoproteinase activity. *FEMS Microbiol Lett* **178**:305-11.
259. **Kreikemeyer, B., K. S. McIver, and A. Podbielski.** 2003. Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. *Trends Microbiol* **11**:224-32.
260. **Kreikemeyer, B., S. Oehmcke, M. Nakata, R. Hoffrogge, and A. Podbielski.** 2004. *Streptococcus pyogenes* fibronectin-binding protein F2: expression profile, binding characteristics, and impact on eukaryotic cell interactions. *J Biol Chem* **279**:15850-9.
261. **Kreikemeyer, B., S. R. Talay, and G. S. Chhatwal.** 1995. Characterization of a novel fibronectin-binding surface protein in group A streptococci. *Mol Microbiol* **17**:137-45.
262. **Kreth, J., Z. Chen, J. Ferretti, and H. Malke.** 2011. Counteractive balancing of transcriptome expression involving CodY and CovRS in *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **193**:4153-65.
263. **Kuhn, S. M., J. Preiksaitis, G. J. Tyrrel, T. Jadavji, D. Church, and H. D. Davies.** 2001. Evaluation of potential factors contributing to microbiological treatment failure in *Streptococcus pyogenes* pharyngitis. *Can J Infect Dis* **12**:33-9.
264. **Kuo, C. F., Y. S. Lin, W. J. Chuang, J. J. Wu, and N. Tsao.** 2008. Degradation of complement 3 by streptococcal pyrogenic exotoxin B inhibits complement activation and neutrophil opsonophagocytosis. *Infect Immun* **76**:1163-9.

265. **Lamagni, T. L., J. Darenberg, B. Luca-Harari, T. Siljander, A. Efstratiou, B. Henriques-Normark, J. Vuopio-Varkila, A. Bouvet, R. Creti, K. Ekelund, M. Koliou, R. R. Reinert, A. Stathi, L. Strakova, V. Ungureanu, C. Schalen, and A. Jasir.** 2008. Epidemiology of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. *J Clin Microbiol* **46**:2359-67.
266. **Lamagni, T. L., A. Efstratiou, J. Vuopio-Varkila, A. Jasir, and C. Schalen.** 2005. The epidemiology of severe *Streptococcus pyogenes* associated disease in Europe. *Euro Surveill* **10**:179-84.
267. **Lamagni, T. L., S. Neal, C. Keshishian, N. Alhaddad, R. George, G. Duckworth, J. Vuopio-Varkila, and A. Efstratiou.** 2008. Severe *Streptococcus pyogenes* infections, United Kingdom, 2003-2004. *Emerg Infect Dis* **14**:202-9.
268. **Lancefield, R. C.** 1928. The Antigenic Complex of *Streptococcus Haemolyticus* : I. Demonstration of a Type-Specific Substance in Extracts of *Streptococcus Haemolyticus*. *J Exp Med* **47**:91-103.
269. **Lancefield, R. C.** 1962. Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *J Immunol* **89**:307-13.
270. **Lancefield, R. C.** 1959. Persistence of type-specific antibodies in man following infection with group A streptococci. *J Exp Med* **110**:271-92.
271. **Lancefield, R. C.** 1933. A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci. *J Exp Med* **57**:571-95.
272. **Lancefield, R. C., and V. P. Dole.** 1946. The Properties of T Antigens Extracted from Group a Hemolytic Streptococci. *J Exp Med* **84**:449-71.
273. **LaPenta, D., C. Rubens, E. Chi, and P. P. Cleary.** 1994. Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:12115-9.
274. **Laupland, K. B., T. Ross, D. L. Church, and D. B. Gregson.** 2006. Population-based surveillance of invasive pyogenic streptococcal infection in a large Canadian region. *Clin Microbiol Infect* **12**:224-30.
275. **Lehtonen, O. P., P. Kero, O. Ruuskanen, E. T. Gaworzewska, O. Hollo, R. Erkkola, and T. Salmi.** 1987. A nursery outbreak of group A streptococcal infection. *J Infect* **14**:263-70.
276. **Lei, B., F. R. DeLeo, N. P. Hoe, M. R. Graham, S. M. Mackie, R. L. Cole, M. Liu, H. R. Hill, D. E. Low, M. J. Federle, J. R. Scott, and J. M. Musser.** 2001. Evasion of human innate and acquired immunity by a bacterial homolog of CD11b that inhibits opsonophagocytosis. *Nat Med* **7**:1298-305.
277. **Lei, B., M. Liu, G. L. Chesney, and J. M. Musser.** 2004. Identification of new candidate vaccine antigens made by *Streptococcus pyogenes*: purification and characterization of 16 putative extracellular lipoproteins. *J Infect Dis* **189**:79-89.
278. **Lepoutre, A., A. Doloy, P. Bidet, A. Leblond, A. Perrocheau, E. Bingen, P. Trieu-Cuot, A. Bouvet, C. Poyart, and D. Levy-Bruhl.** 2011. Epidemiology of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in France in 2007. *J Clin Microbiol* **49**:4094-100.
279. **Levin, J. C., and M. R. Wessels.** 1998. Identification of *csrR/csrS*, a genetic locus that regulates hyaluronic acid capsule synthesis in group A *Streptococcus*. *Mol Microbiol* **30**:209-19.
280. **Li, Z., V. Sakota, D. Jackson, A. R. Franklin, and B. Beall.** 2003. Array of M protein gene subtypes in 1064 recent invasive group A *streptococcus* isolates recovered from the active bacterial core surveillance. *J Infect Dis* **188**:1587-92.
281. **Lindberg, L. H., and K. L. Vosti.** 1969. Elution of glomerular bound antibodies in experimental streptococcal glomerulonephritis. *Science* **166**:1032-3.

282. **Lintges, M., M. van der Linden, R. D. Hilgers, S. Arlt, A. Al-Lahham, R. R. Reinert, S. Plucken, and L. Rink.** 2010. Superantigen genes are more important than the *emm* type for the invasiveness of group A *Streptococcus* infection. *J Infect Dis* **202**:20-8.
283. **Liu, M., H. Zhu, J. Li, C. C. Garcia, W. Feng, L. N. Kirpotina, J. Hilmer, L. P. Tavares, A. W. Layton, M. T. Quinn, B. Bothner, M. M. Teixeira, and B. Lei.** 2012. Group A *Streptococcus* secreted esterase hydrolyzes platelet-activating factor to impede neutrophil recruitment and facilitate innate immune evasion. *PLoS Pathog* **8**:e1002624.
284. **Liu, M., H. Zhu, J. Zhang, and B. Lei.** 2007. Active and passive immunizations with the streptococcal esterase Sse protect mice against subcutaneous infection with group A streptococci. *Infect Immun* **75**:3651-7.
285. **Liu, X., X. Shen, H. Chang, G. Huang, Z. Fu, Y. Zheng, L. Wang, C. Li, L. Liu, Y. Shen, and Y. Yang.** 2009. High macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* strains isolated from children with pharyngitis in China. *Pediatr Pulmonol* **44**:436-41.
286. **Llewelyn, M.** 2005. Human leukocyte antigen class II haplotypes that protect against or predispose to streptococcal toxic shock. *Clin Infect Dis* **41 Suppl 7**:S445-8.
287. **Llewelyn, M., S. Sriskandan, M. Peakman, D. R. Ambrozak, D. C. Douek, W. W. Kwok, J. Cohen, and D. M. Altmann.** 2004. HLA class II polymorphisms determine responses to bacterial superantigens. *J Immunol* **172**:1719-26.
288. **Love, J. F., H. J. Tran-Winkler, and M. R. Wessels.** 2012. Vitamin D and the human antimicrobial peptide LL-37 enhance group a *streptococcus* resistance to killing by human cells. *MBio* **3**.
289. **Luca-Harari, B., J. Darenberg, S. Neal, T. Siljander, L. Strakova, A. Tanna, R. Creti, K. Ekelund, M. Koliou, P. T. Tassios, M. van der Linden, M. Straut, J. Vuopio-Varkila, A. Bouvet, A. Efstratiou, C. Schalen, B. Henriques-Normark, and A. Jasir.** 2009. Clinical and microbiological characteristics of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. *J Clin Microbiol* **47**:1155-65.
290. **Luca-Harari, B., M. Straut, S. Cretoiu, M. Surdeanu, V. Ungureanu, M. van der Linden, and A. Jasir.** 2008. Molecular characterization of invasive and non-invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Romania. *J Med Microbiol* **57**:1354-63.
291. **Ludlam, H., and B. Cookson.** 1986. Scrum kidney: epidemic pyoderma caused by a nephritogenic *Streptococcus pyogenes* in a rugby team. *Lancet* **2**:331-3.
292. **Lukomski, S., N. P. Hoe, I. Abdi, J. Rurangirwa, P. Kordari, M. Liu, S. J. Dou, G. G. Adams, and J. M. Musser.** 2000. Nonpolar inactivation of the hypervariable streptococcal inhibitor of complement gene (*sic*) in serotype M1 *Streptococcus pyogenes* significantly decreases mouse mucosal colonization. *Infect Immun* **68**:535-42.
293. **Lukomski, S., K. Nakashima, I. Abdi, V. J. Cipriano, R. M. Ireland, S. D. Reid, G. G. Adams, and J. M. Musser.** 2000. Identification and characterization of the *scl* gene encoding a group A *Streptococcus* extracellular protein virulence factor with similarity to human collagen. *Infect Immun* **68**:6542-53.
294. **Malhotra-Kumar, S., C. Lammens, S. Chapelle, M. Wijdooghe, J. Piessens, K. Van Herck, and H. Goossens.** 2005. Macrolide- and telithromycin-resistant *Streptococcus pyogenes*, Belgium, 1999-2003. *Emerg Infect Dis* **11**:939-42.
295. **Malhotra-Kumar, S., C. Lammens, J. Piessens, and H. Goossens.** 2005. Multiplex PCR for simultaneous detection of macrolide and tetracycline resistance determinants in streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4798-800.

296. **Malhotra-Kumar, S., L. Van Heirstraeten, C. Lammens, S. Chapelle, and H. Goossens.** 2009. Emergence of high-level fluoroquinolone resistance in *emm6* *Streptococcus pyogenes* and *in vitro* resistance selection with ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin. *J Antimicrob Chemother* **63**:886-94.
297. **Manetti, A., C. Zingaretti, F. Falugi, S. Capo, M. Bombaci, F. Bagnoli, G. Gambellini, G. Bensi, M. Mora, A. Edwards, J. Musser, E. Graviss, J. Telford, G. Grandi, and I. Margarit.** 2007. *Streptococcus pyogenes* pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation. *Mol Microbiol.* **64**:968-83.
298. **Manetti, A. G., T. Koller, M. Becherelli, S. Buccato, B. Kreikemeyer, A. Podbielski, G. Grandi, and I. Margarit.** 2010. Environmental acidification drives *S. pyogenes* pilus expression and microcolony formation on epithelial cells in a FCT-dependent manner. *PLoS One* **5**:e13864.
299. **Manetti, A. G., C. Zingaretti, F. Falugi, S. Capo, M. Bombaci, F. Bagnoli, G. Gambellini, G. Bensi, M. Mora, A. M. Edwards, J. M. Musser, E. A. Graviss, J. L. Telford, G. Grandi, and I. Margarit.** 2007. *Streptococcus pyogenes* pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation. *Mol Microbiol* **64**:968-83.
300. **Manning, S. E., E. Lee, M. Bambino, J. Ackelsberg, D. Weiss, C. Sathyakumar, J. Kornblum, O. Barbot, D. Johnson, E. L. Kaplan, and M. Layton.** 2005. Invasive group A streptococcal infection in high school football players, New York City, 2003. *Emerg Infect Dis* **11**:146-9.
301. **Maripuu, L., A. Eriksson, and M. Norgren.** 2008. Superantigen gene profile diversity among clinical group A streptococcal isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol* **54**:236-44.
302. **Marouni, M. J., A. Barzilai, N. Keller, E. Rubinstein, and S. Sela.** 2004. Intracellular survival of persistent group A streptococci in cultured epithelial cells. *Int J Med Microbiol* **294**:27-33.
303. **Martin, D. R., and L. A. Single.** 1993. Molecular epidemiology of group A *streptococcus* M type 1 infections. *J Infect Dis* **167**:1112-7.
304. **Martin, P. R., and E. A. Hoiby.** 1990. Streptococcal serogroup A epidemic in Norway 1987-1988. *Scand J Infect Dis* **22**:421-9.
305. **Massell, B. F., L. H. Honikman, and J. Amezcua.** 1969. Rheumatic fever following streptococcal vaccination. Report of three cases. *JAMA* **207**:1115-9.
306. **Massell, B. F., J. G. Michael, J. Amezcua, and M. Siner.** 1968. Secondary and apparent primary antibody responses after group A streptococcal vaccination of 21 children. *Appl Microbiol* **16**:509-18.
307. **Maxted, W. R., J. P. Widdowson, and C. A. Fraser.** 1973. Use of the serum-opacity reaction in the typing of group-A streptococci. *J Med Microbiol* **6**:P13.
308. **Mayer, G., and S. Van Ore.** 1983. Recurrent pharyngitis in family of four. Household pet as reservoir of group A streptococci. *Postgrad Med* **74**:277-9.
309. **McMillan, D. J., M. R. Batzloff, C. L. Browning, M. R. Davies, M. F. Good, K. S. Sriprakash, R. Janulczyk, and M. Rasmussen.** 2004. Identification and assessment of new vaccine candidates for group A streptococcal infections. *Vaccine* **22**:2783-90.
310. **McNamara, C., A. S. Zinkernagel, P. Macheboeuf, M. W. Cunningham, V. Nizet, and P. Ghosh.** 2008. Coiled-coil irregularities and instabilities in group A *Streptococcus* M1 are required for virulence. *Science* **319**:1405-8.
311. **McNeil, S. A., S. A. Halperin, J. M. Langley, B. Smith, A. Warren, G. P. Sharratt, D. M. Baxendale, M. A. Reddish, M. C. Hu, S. D. Stroop, J. Linden, L. F. Fries, P. E. Vink, and J. B. Dale.** 2005. Safety and immunogenicity of 26-valent group a *streptococcus* vaccine in healthy adult volunteers. *Clin Infect Dis* **41**:1114-22.

312. **McShan, W. M., J. J. Ferretti, T. Karasawa, A. N. Suvorov, S. Lin, B. Qin, H. Jia, S. Kenton, F. Najjar, H. Wu, J. Scott, B. A. Roe, and D. J. Savic.** 2008. Genome sequence of a nephritogenic and highly transformable M49 strain of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **190**:7773-85.
313. **Mead, P. B., and W. C. Winn.** 2000. Vaginal-rectal colonization with group A streptococci in late pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol* **8**:217-9.
314. **Medina, E., O. Goldmann, A. W. Toppel, and G. S. Chhatwal.** 2003. Survival of *Streptococcus pyogenes* within host phagocytic cells: a pathogenic mechanism for persistence and systemic invasion. *J Infect Dis* **187**:597-603.
315. **Medina, E., and A. Lengeling.** 2005. Genetic regulation of host responses to group A streptococcus in mice. *Brief Funct Genomic Proteomic* **4**:248-57.
316. **Medina, E., M. Rohde, and G. S. Chhatwal.** 2003. Intracellular survival of *Streptococcus pyogenes* in polymorphonuclear cells results in increased bacterial virulence. *Infect Immun* **71**:5376-80.
317. **Mehta, S., A. McGeer, D. E. Low, D. Hallett, D. J. Bowman, S. L. Grossman, and T. E. Stewart.** 2006. Morbidity and mortality of patients with invasive group A streptococcal infections admitted to the ICU. *Chest* **130**:1679-86.
318. **Mejia, L. M., K. E. Stockbauer, X. Pan, A. Cravioto, and J. M. Musser.** 1997. Characterization of group A *Streptococcus* strains recovered from Mexican children with pharyngitis by automated DNA sequencing of virulence-related genes: unexpectedly large variation in the gene (*sic*) encoding a complement-inhibiting protein. *J Clin Microbiol* **35**:3220-4.
319. **Mihaila-Amrouche, L., A. Bouvet, and J. Loubinoux.** 2004. Clonal spread of *emm* type 28 isolates of *Streptococcus pyogenes* that are multiresistant to antibiotics. *J Clin Microbiol* **42**:3844-6.
320. **Miller, A. A., N. C. Engleberg, and V. J. DiRita.** 2001. Repression of virulence genes by phosphorylation-dependent oligomerization of CsrR at target promoters in *S. pyogenes*. *Mol Microbiol* **40**:976-90.
321. **Miller, M. B., and B. L. Bassler.** 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**:165-99.
322. **Miyoshi-Akiyama, T., D. Takamatsu, M. Koyanagi, J. Zhao, K. Imanishi, and T. Uchiyama.** 2005. Cytocidal effect of *Streptococcus pyogenes* on mouse neutrophils *in vivo* and the critical role of streptolysin S. *J Infect Dis* **192**:107-16.
323. **Miyoshi-Akiyama, T., S. Watanabe, and T. Kirikae.** 2012. Complete genome sequence of *Streptococcus pyogenes* M1 476, isolated from a patient with streptococcal toxic shock syndrome. *J Bacteriol* **194**:5466.
324. **Molinari, G., and G. S. Chhatwal.** 1998. Invasion and survival of *Streptococcus pyogenes* in eukaryotic cells correlates with the source of the clinical isolates. *J Infect Dis* **177**:1600-7.
325. **Molinari, G., M. Rohde, C. A. Guzman, and G. S. Chhatwal.** 2000. Two distinct pathways for the invasion of *Streptococcus pyogenes* in non-phagocytic cells. *Cell Microbiol* **2**:145-54.
326. **Molinari, G., S. R. Talay, P. Valentin-Weigand, M. Rohde, and G. S. Chhatwal.** 1997. The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun* **65**:1357-63.
327. **Mollick, J. A., G. G. Miller, J. M. Musser, R. G. Cook, D. Grossman, and R. R. Rich.** 1993. A novel superantigen isolated from pathogenic strains of *Streptococcus pyogenes* with aminoterminal homology to staphylococcal enterotoxins B and C. *J Clin Invest* **92**:710-9.

328. **Montes, M., E. Tamayo, B. Orden, J. Larruskain, and E. Perez-Trallero.** 2010. Prevalence and clonal characterization of *Streptococcus pyogenes* clinical isolates with reduced fluoroquinolone susceptibility in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:93-7.
329. **Mora, M., G. Bensi, S. Capo, F. Falugi, C. Zingaretti, A. G. Manetti, T. Maggi, A. R. Taddei, G. Grandi, and J. L. Telford.** 2005. Group A *Streptococcus* produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:15641-6.
330. **Mori, K., T. Sasazuki, A. Kimura, and Y. Ito.** 1996. HLA-DP antigens and post-streptococcal acute glomerulonephritis. *Acta Paediatr* **85**:916-8.
331. **Moses, A. E., C. Hidalgo-Grass, M. Dan-Goor, J. Jaffe, I. Shetzigovsky, M. Ravins, Z. Korenman, R. Cohen-Poradosu, and R. Nir-Paz.** 2003. *emm* typing of M nontypeable invasive group A streptococcal isolates in Israel. *J Clin Microbiol* **41**:4655-9.
332. **Moses, A. E., M. R. Wessels, K. Zalcman, S. Alberti, S. Natanson-Yaron, T. Menes, and E. Hanski.** 1997. Relative contributions of hyaluronic acid capsule and M protein to virulence in a mucoid strain of the group A *Streptococcus*. *Infect Immun* **65**:64-71.
333. **Nadal, D., R. P. Lauener, C. P. Braegger, A. Kaufhold, B. Simma, R. Luttkien, and R. A. Seger.** 1993. T cell activation and cytokine release in streptococcal toxic shock-like syndrome. *J Pediatr* **122**:727-9.
334. **Nagiec, M. J., B. Lei, S. K. Parker, M. L. Vasil, M. Matsumoto, R. M. Ireland, S. B. Beres, N. P. Hoe, and J. M. Musser.** 2004. Analysis of a novel prophage-encoded group A *Streptococcus* extracellular phospholipase A(2). *J Biol Chem* **279**:45909-18.
335. **Naito, S., M. Kohara, and K. Arakawa.** 1987. Association of class II antigens of HLA with primary glomerulopathies. *Nephron* **45**:111-4.
336. **Nakagawa, I., K. Kurokawa, A. Yamashita, M. Nakata, Y. Tomiyasu, N. Okahashi, S. Kawabata, K. Yamazaki, T. Shiba, T. Yasunaga, H. Hayashi, M. Hattori, and S. Hamada.** 2003. Genome sequence of an M3 strain of *Streptococcus pyogenes* reveals a large-scale genomic rearrangement in invasive strains and new insights into phage evolution. *Genome Res* **13**:1042-55.
337. **Nakata, M., T. Koller, K. Moritz, D. Ribardo, L. Jonas, K. S. McIver, T. Sumitomo, Y. Terao, S. Kawabata, A. Podbielski, and B. Kreikemeyer.** 2009. Mode of expression and functional characterization of FCT-3 pilus region-encoded proteins in *Streptococcus pyogenes* serotype M49. *Infect Immun* **77**:32-44.
338. **Nandi, S., R. Kumar, P. Ray, H. Vohra, and N. K. Ganguly.** 2001. Group A streptococcal sore throat in a periurban population of northern India: a one-year prospective study. *Bull World Health Organ* **79**:528-33.
339. **Natanson, S., S. Sela, A. E. Moses, J. M. Musser, M. G. Caparon, and E. Hanski.** 1995. Distribution of fibronectin-binding proteins among group A streptococci of different M types. *J Infect Dis* **171**:871-8.
340. **Navarre, W. W., and O. Schneewind.** 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:174-229.
341. **Neeman, R., N. Keller, A. Barzilai, Z. Korenman, and S. Sela.** 1998. Prevalence of internalisation-associated gene, prtF1, among persisting group-A *streptococcus* strains isolated from asymptomatic carriers. *Lancet* **352**:1974-7.

342. **Nelson, K., P. M. Schlievert, R. K. Selander, and J. M. Musser.** 1991. Characterization and clonal distribution of four alleles of the *speA* gene encoding pyrogenic exotoxin A (scarlet fever toxin) in *Streptococcus pyogenes*. *J Exp Med* **174**:1271-4.
343. **Neuhaus, F. C., and J. Baddiley.** 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:686-723.
344. **Nilsson, M., O. E. Sorensen, M. Morgelin, M. Weineisen, U. Sjobring, and H. Herwald.** 2006. Activation of human polymorphonuclear neutrophils by streptolysin O from *Streptococcus pyogenes* leads to the release of proinflammatory mediators. *Thromb Haemost* **95**:982-90.
345. **Nizet, V.** 2007. Understanding how leading bacterial pathogens subvert innate immunity to reveal novel therapeutic targets. *J Allergy Clin Immunol* **120**:13-22.
346. **Nooh, M. M., R. K. Aziz, M. Kotb, A. Eroshkin, W. J. Chuang, T. Proft, and R. Kansal.** 2006. Streptococcal mitogenic exotoxin, SmeZ, is the most susceptible M1T1 streptococcal superantigen to degradation by the streptococcal cysteine protease, SpeB. *J Biol Chem* **281**:35281-8.
347. **Norrby-Teglund, A., H. Basma, J. Andersson, A. McGeer, D. E. Low, and M. Kotb.** 1998. Varying titers of neutralizing antibodies to streptococcal superantigens in different preparations of normal polyspecific immunoglobulin G: implications for therapeutic efficacy. *Clin Infect Dis* **26**:631-8.
348. **Norrby-Teglund, A., S. Chatellier, D. E. Low, A. McGeer, K. Green, and M. Kotb.** 2000. Host variation in cytokine responses to superantigens determine the severity of invasive group A streptococcal infection. *Eur J Immunol* **30**:3247-55.
349. **Norrby-Teglund, A., R. Kaul, D. E. Low, A. McGeer, J. Andersson, U. Andersson, and M. Kotb.** 1996. Evidence for the presence of streptococcal-superantigen-neutralizing antibodies in normal polyspecific immunoglobulin G. *Infect Immun* **64**:5395-8.
350. **Norrby-Teglund, A., R. Kaul, D. E. Low, A. McGeer, D. W. Newton, J. Andersson, U. Andersson, and M. Kotb.** 1996. Plasma from patients with severe invasive group A streptococcal infections treated with normal polyspecific IgG inhibits streptococcal superantigen-induced T cell proliferation and cytokine production. *J Immunol* **156**:3057-64.
351. **Norrby-Teglund, A., G. T. Nepom, and M. Kotb.** 2002. Differential presentation of group A streptococcal superantigens by HLA class II DQ and DR alleles. *Eur J Immunol* **32**:2570-7.
352. **Norrby-Teglund, A., P. Thulin, B. S. Gan, M. Kotb, A. McGeer, J. Andersson, and D. E. Low.** 2001. Evidence for superantigen involvement in severe group a streptococcal tissue infections. *J Infect Dis* **184**:853-60.
353. **Nyberg, P., M. Rasmussen, U. Von Pawel-Rammingen, and L. Bjorck.** 2004. SpeB modulates fibronectin-dependent internalization of *Streptococcus pyogenes* by efficient proteolysis of cell-wall-anchored protein F1. *Microbiology* **150**:1559-69.
354. **O'Brien, K. L., B. Beall, N. L. Barrett, P. R. Cieslak, A. Reingold, M. M. Farley, R. Danila, E. R. Zell, R. Facklam, B. Schwartz, and A. Schuchat.** 2002. Epidemiology of invasive group a *Streptococcus* disease in the United States, 1995-1999. *Clin Infect Dis* **35**:268-76.
355. **O'Connor, S. P., and P. P. Cleary.** 1986. Localization of the streptococcal C5a peptidase to the surface of group A streptococci. *Infect Immun* **53**:432-4.



356. **O'Grady, K. A., L. Kelpie, R. M. Andrews, N. Curtis, T. M. Nolan, G. Selvaraj, J. W. Passmore, F. Oppedisano, J. A. Carnie, and J. R. Carapetis.** 2007. The epidemiology of invasive group A streptococcal disease in Victoria, Australia. *Med J Aust* **186**:565-9.
357. **O'Loughlin, R. E., A. Roberson, P. R. Cieslak, R. Lynfield, K. Gershman, A. Craig, B. A. Albanese, M. M. Farley, N. L. Barrett, N. L. Spina, B. Beall, L. H. Harrison, A. Reingold, and C. Van Beneden.** 2007. The epidemiology of invasive group A streptococcal infection and potential vaccine implications: United States, 2000-2004. *Clin Infect Dis* **45**:853-62.
358. **O'Seaghda, M., and M. Wessels.** 2013. Streptolysin O and its co-toxin NAD-glycohydrolase protect group A *Streptococcus* from Xenophagic killing. *PLoS Pathog* **9**:e1003394.
359. **Oehmcke, S., A. Podbielski, and B. Kreikemeyer.** 2004. Function of the fibronectin-binding serum opacity factor of *Streptococcus pyogenes* in adherence to epithelial cells. *Infect Immun* **72**:4302-8.
360. **Ofek, I., W. A. Simpson, and E. H. Beachey.** 1982. Formation of molecular complexes between a structurally defined M protein and acylated or deacylated lipoteichoic acid of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **149**:426-33.
361. **Ogawa, T., Y. Terao, H. Okuni, K. Ninomiya, H. Sakata, K. Ikebe, Y. Maeda, and S. Kawabata.** 2011. Biofilm formation or internalization into epithelial cells enable *Streptococcus pyogenes* to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis. *Microb Pathog* **51**:58-68.
362. **Okada, N., M. K. Liszewski, J. P. Atkinson, and M. Caparon.** 1995. Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A *streptococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:2489-93.
363. **Okada, N., A. P. Pentland, P. Falk, and M. G. Caparon.** 1994. M protein and protein F act as important determinants of cell-specific tropism of *Streptococcus pyogenes* in skin tissue. *J Clin Invest* **94**:965-77.
364. **Olive, C., K. Schulze, H. K. Sun, T. Ebensen, A. Horvath, I. Toth, and C. A. Guzman.** 2007. Enhanced protection against *Streptococcus pyogenes* infection by intranasal vaccination with a dual antigen component M protein/SfbI lipid core peptide vaccine formulation. *Vaccine* **25**:1789-97.
365. **Oliver-Kozup, H. A., M. Elliott, B. A. Bachert, K. H. Martin, S. D. Reid, D. E. Schwegler-Berry, B. J. Green, and S. Lukomski.** 2011. The streptococcal collagen-like protein-1 (Sc11) is a significant determinant for biofilm formation by group A *Streptococcus*. *BMC Microbiol* **11**:262.
366. **Olivier, C.** 2000. Rheumatic fever--is it still a problem? *J Antimicrob Chemother* **45 Suppl**:13-21.
367. **Olsen, R. J., and J. M. Musser.** 2010. Molecular pathogenesis of necrotizing fasciitis. *Annu Rev Pathol* **5**:1-31.
368. **Olsen, R. J., S. A. Shelburne, and J. M. Musser.** 2009. Molecular mechanisms underlying group A streptococcal pathogenesis. *Cell Microbiol* **11**:1-12.
369. **Osterlund, A., and L. Engstrand.** 1995. Intracellular penetration and survival of *Streptococcus pyogenes* in respiratory epithelial cells *in vitro*. *Acta Otolaryngol* **115**:685-8.
370. **Osterlund, A., and L. Engstrand.** 1997. An intracellular sanctuary for *Streptococcus pyogenes* in human tonsillar epithelium--studies of asymptomatic carriers and *in vitro* cultured biopsies. *Acta Otolaryngol* **117**:883-8.

371. **Ovetchkine, P., C. Levy, F. de la Rocque, M. Boucherat, E. Bingen, and R. Cohen.** 2002. Variables influencing bacteriological outcome in patients with streptococcal tonsillopharyngitis treated with penicillin V. *Eur J Pediatr* **161**:365-7.
372. **Ozeri, V., I. Rosenshine, D. F. Mosher, R. Fassler, and E. Hanski.** 1998. Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. *Mol Microbiol* **30**:625-37.
373. **Pancholi, V., and V. A. Fischetti.** 1992. A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med* **176**:415-26.
374. **Pandiripally, V., E. Gregory, and D. Cue.** 2002. Acquisition of regulators of complement activation by *Streptococcus pyogenes* serotype M1. *Infect Immun* **70**:6206-14.
375. **Papageorgiou, A. C., C. M. Collins, D. M. Gutman, J. B. Kline, S. M. O'Brien, H. S. Tranter, and K. R. Acharya.** 1999. Structural basis for the recognition of superantigen streptococcal pyrogenic exotoxin A (SpeA1) by MHC class II molecules and T-cell receptors. *EMBO J* **18**:9-21.
376. **Passaro, D. J., D. S. Smith, E. C. Hett, A. L. Reingold, P. Daily, C. A. van Beneden, and D. J. Vugia.** 2002. Invasive group A streptococcal infections in the San Francisco Bay area, 1989-99. *Epidemiol Infect* **129**:471-8.
377. **Perez-Caballero, D., I. Garcia-Laorden, G. Cortes, M. R. Wessels, S. R. de Cordoba, and S. Alberti.** 2004. Interaction between complement regulators and *Streptococcus pyogenes*: binding of C4b-binding protein and factor H/factor H-like protein 1 to M18 strains involves two different cell surface molecules. *J Immunol* **173**:6899-904.
378. **Perez-Casal, J., N. Okada, M. G. Caparon, and J. R. Scott.** 1995. Role of the conserved C-repeat region of the M protein of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **15**:907-16.
379. **Perez-Trallero, E., J. E. Martin-Herrero, A. Mazon, C. Garcia-Delafuente, P. Robles, V. Iriarte, R. Dal-Re, and J. Garcia-de-Lomas.** 2010. Antimicrobial resistance among respiratory pathogens in Spain: latest data and changes over 11 years (1996-1997 to 2006-2007). *Antimicrob Agents Chemother* **54**:2953-9.
380. **Pfoh, E., M. R. Wessels, D. Goldmann, and G. M. Lee.** 2008. Burden and economic cost of group A streptococcal pharyngitis. *Pediatrics* **121**:229-34.
381. **Phillips, G., A. Efstratiou, A. Tanna, B. Beall, J. Ferguson, and M. Roworth.** 2000. An outbreak of skin sepsis in abattoir workers caused by an 'unusual' strain of *Streptococcus pyogenes*. *J Med Microbiol* **49**:371-4.
382. **Pichichero, M. E., and P. A. Margolis.** 1991. A comparison of cephalosporins and penicillins in the treatment of group A beta-hemolytic streptococcal pharyngitis: a meta-analysis supporting the concept of microbial copathogenicity. *Pediatr Infect Dis J* **10**:275-81.
383. **Pires, R., C. Ardanuy, D. Rolo, A. Morais, A. Brito-Avo, J. Goncalo-Marques, J. Linares, and I. Santos-Sanches.** 2010. Emergence of ciprofloxacin-nonsusceptible *Streptococcus pyogenes* isolates from healthy children and pediatric patients in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:2677-80.
384. **Plainvert, C., A. Doloy, J. Loubinoux, A. Lepoutre, G. Collobert, G. Touak, P. Trieu-Cuot, A. Bouvet, and C. Poyart.** 2012. Invasive group A streptococcal infections in adults, France (2006-2010). *Clin Microbiol Infect* **18**:702-710.
385. **Podbielski, A., N. Schnitzler, P. Beyhs, and M. D. Boyle.** 1996. M-related protein (Mrp) contributes to group A streptococcal resistance to phagocytosis by human granulocytes. *Mol Microbiol* **19**:429-41.

386. **Polly, S. M., R. H. Waldman, P. High, M. K. Wittner, and A. Dorfman.** 1975. Protective studies with a group A streptococcal M protein vaccine. II. Challenge of volunteers after local immunization in the upper respiratory tract. *J Infect Dis* **131**:217-24.
387. **Ponting, C. P., J. M. Marshall, and S. A. Cederholm-Williams.** 1992. Plasminogen: a structural review. *Blood Coagul Fibrinolysis* **3**:605-14.
388. **Poon-King, T., I. Mohammed, R. Cox, E. V. Potter, N. M. Simon, A. C. Siegel, and D. P. Earle.** 1967. Recurrent epidemic nephritis in South Trinidad. *N Engl J Med* **277**:728-33.
389. **Port, G. C., E. Paluscio, and M. G. Caparon.** 2013. Complete Genome Sequence of *emm* Type 14 *Streptococcus pyogenes* Strain HSC5. *Genome Announc* **1**.
390. **Poyart, C., L. Jardy, G. Quesne, P. Berche, and P. Trieu-Cuot.** 2003. Genetic basis of antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* strains isolated in a French hospital. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:794-7.
391. **Proft, T., and J. D. Fraser.** 2007. Streptococcal superantigens. *Chem Immunol Allergy* **93**:1-23.
392. **Proft, T., S. L. Moffatt, C. J. Berkahn, and J. D. Fraser.** 1999. Identification and characterization of novel superantigens from *Streptococcus pyogenes*. *J Exp Med* **189**:89-102.
393. **Proft, T., S. L. Moffatt, K. D. Weller, A. Paterson, D. Martin, and J. D. Fraser.** 2000. The streptococcal superantigen SMEZ exhibits wide allelic variation, mosaic structure, and significant antigenic variation. *J Exp Med* **191**:1765-76.
394. **Proft, T., P. D. Webb, V. Handley, and J. D. Fraser.** 2003. Two novel superantigens found in both group A and group C *Streptococcus*. *Infect Immun* **71**:1361-9.
395. **Purushothaman, S. S., B. Wang, and P. P. Cleary.** 2003. M1 protein triggers a phosphoinositide cascade for group A *Streptococcus* invasion of epithelial cells. *Infect Immun* **71**:5823-30.
396. **Quigley, B. R., M. Hatkoff, D. G. Thanassi, M. Ouattara, Z. Eichenbaum, and J. R. Scott.** 2010. A foreign protein incorporated on the Tip of T3 pili in *Lactococcus lactis* elicits systemic and mucosal immunity. *Infect Immun* **78**:1294-303.
397. **Rakonjac, J. V., J. C. Robbins, and V. A. Fischetti.** 1995. DNA sequence of the serum opacity factor of group A streptococci: identification of a fibronectin-binding repeat domain. *Infect Immun* **63**:622-31.
398. **Rasmussen, M., A. Eden, and L. Bjorck.** 2000. SclA, a novel collagen-like surface protein of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **68**:6370-7.
399. **Reda, K. B., V. Kapur, D. Goela, J. G. Lamphear, J. M. Musser, and R. R. Rich.** 1996. Phylogenetic distribution of streptococcal superantigen SSA allelic variants provides evidence for horizontal transfer of *ssa* within *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **64**:1161-5.
400. **Reddy, K. N., and G. Markus.** 1972. Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. Presence of active center in streptokinase-plasminogen complex. *J Biol Chem* **247**:1683-91.
401. **Reinert, R. R., C. Franken, M. van der Linden, R. Luttkicken, M. Cil, and A. Al-Lahham.** 2004. Molecular characterisation of macrolide resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated in Germany, 2002-2003. *Int J Antimicrob Agents* **24**:43-7.
402. **Rezcallah, M. S., K. Hodges, D. B. Gill, J. P. Atkinson, B. Wang, and P. P. Cleary.** 2005. Engagement of CD46 and alpha5beta1 integrin by group A streptococci is required for efficient invasion of epithelial cells. *Cell Microbiol* **7**:645-53.

403. **Roberts, A. L., K. L. Connolly, D. J. Kirse, A. K. Evans, K. A. Poehling, T. R. Peters, and S. D. Reid.** 2012. Detection of group A *Streptococcus* in tonsils from pediatric patients reveals high rate of asymptomatic streptococcal carriage. *BMC Pediatr* **12**:3.
404. **Roberts, S. A., G. G. Churchward, and J. R. Scott.** 2007. Unraveling the regulatory network in *Streptococcus pyogenes*: the global response regulator CovR represses *rivR* directly. *J Bacteriol* **189**:1459-63.
405. **Robinson, J. H., M. C. Atherton, J. A. Goodacre, M. Pinkney, H. Weightman, and M. A. Kehoe.** 1991. Mapping T-cell epitopes in group A streptococcal type 5 M protein. *Infect Immun* **59**:4324-31.
406. **Robinson, J. H., M. C. Case, and M. A. Kehoe.** 1993. Characterization of a conserved helper-T-cell epitope from group A Streptococcal M proteins. *Infect Immun* **61**:1062-8.
407. **Rodriguez-Ortega, M. J., N. Norais, G. Bensi, S. Liberatori, S. Capo, M. Mora, M. Scarselli, F. Doro, G. Ferrari, I. Garaguso, T. Maggi, A. Neumann, A. Covre, J. L. Telford, and G. Grandi.** 2006. Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A *Streptococcus* surface proteome. *Nat Biotechnol* **24**:191-7.
408. **Roos, K., E. Grahn, and S. E. Holm.** 1986. Evaluation of beta-lactamase activity and microbial interference in treatment failures of acute streptococcal tonsillitis. *Scand J Infect Dis* **18**:313-9.
409. **Roos, K., E. Grahn, S. E. Holm, H. Johansson, and L. Lind.** 1993. Interfering alpha-streptococci as a protection against recurrent streptococcal tonsillitis in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* **25**:141-8.
410. **Rotta, J., J. Duben, F. Jedlicka, H. Havlickova, B. Tumova, and M. Bruckova.** 1989. Prospective study of pharyngitis: clinical diagnosis and microbiological profile. *Zentralbl Bakteriologie* **271**:532-42.
411. **Roussel, A., B. F. Anderson, H. M. Baker, J. D. Fraser, and E. N. Baker.** 1997. Crystal structure of the streptococcal superantigen SPE-C: dimerization and zinc binding suggest a novel mode of interaction with MHC class II molecules. *Nat Struct Biol* **4**:635-43.
412. **Sabuncu, E., J. David, C. Bernede-Bauduin, S. Pepin, M. Leroy, P. Y. Boelle, L. Watier, and D. Guillemot.** 2009. Significant reduction of antibiotic use in the community after a nationwide campaign in France, 2002-2007. *PLoS Med* **6**:e1000084.
413. **Safar, A., D. Lennon, J. Stewart, A. Trenholme, D. Drinkovic, B. Peat, S. Taylor, K. Read, S. Roberts, and L. Voss.** 2011. Invasive group A streptococcal infection and vaccine implications, Auckland, New Zealand. *Emerg Infect Dis* **17**:983-9.
414. **Sakurai, A., N. Okahashi, F. Maruyama, T. Ooshima, S. Hamada, and I. Nakagawa.** 2008. *Streptococcus pyogenes* degrades extracellular matrix in chondrocytes via MMP-13. *Biochem Biophys Res Commun* **373**:450-4.
415. **Salim, K. Y., J. C. de Azavedo, D. J. Bast, and D. G. Cvitkovitch.** 2008. Regulation of *saga*, *siaA* and *scpC* by SilCR, a putative signaling peptide of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **289**:119-25.
416. **Salvadori, L. G., M. S. Blake, M. McCarty, J. Y. Tai, and J. B. Zabriskie.** 1995. Group A *streptococcus*-liposome ELISA antibody titers to group A polysaccharide and opsonophagocytic capabilities of the antibodies. *J Infect Dis* **171**:593-600.
417. **Sanderson-Smith, M. L., M. Dowton, M. Ranson, and M. J. Walker.** 2007. The plasminogen-binding group A streptococcal M protein-related protein Prp binds plasminogen via arginine and histidine residues. *J Bacteriol* **189**:1435-40.

418. **Sandson, J., D. Hamerman, R. Janis, and M. Rojkind.** 1968. Immunologic and chemical similarities between the *streptococcus* and human connective tissue. *Trans Assoc Am Physicians* **81**:249-57.
419. **Saravani, G. A., and D. R. Martin.** 1990. Characterisation of opacity factor from group-A streptococci. *J Med Microbiol* **33**:55-60.
420. **Sawai, M. V., A. J. Waring, W. R. Kearney, P. B. McCray, Jr., W. R. Forsyth, R. I. Lehrer, and B. F. Tack.** 2002. Impact of single-residue mutations on the structure and function of ovispirin/novispirin antimicrobial peptides. *Protein Eng* **15**:225-32.
421. **Schaar, V., I. Uddback, T. Nordstrom, and K. Riesbeck.** 2013. Group A streptococci are protected from amoxicillin-mediated killing by vesicles containing beta-lactamase derived from *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother.*
422. **Schmidtchen, A., I. M. Frick, E. Andersson, H. Tapper, and L. Bjorck.** 2002. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol* **46**:157-68.
423. **Schmitz, F. J., A. Beyer, E. Charpentier, B. H. Normark, M. Schade, A. C. Fluit, D. Hafner, and R. Novak.** 2003. Toxin-gene profile heterogeneity among endemic invasive European group A streptococcal isolates. *J Infect Dis* **188**:1578-86.
424. **Schrager, H. M., S. Alberti, C. Cywes, G. J. Dougherty, and M. R. Wessels.** 1998. Hyaluronic acid capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A *Streptococcus* to CD44 on human keratinocytes. *J Clin Invest* **101**:1708-16.
425. **Schrager, H. M., J. G. Rheinwald, and M. R. Wessels.** 1996. Hyaluronic acid capsule and the role of streptococcal entry into keratinocytes in invasive skin infection. *J Clin Invest* **98**:1954-8.
426. **Sela, S., R. Neeman, N. Keller, and A. Barzilai.** 2000. Relationship between asymptomatic carriage of *Streptococcus pyogenes* and the ability of the strains to adhere to and be internalised by cultured epithelial cells. *J Med Microbiol* **49**:499-502.
427. **Shah, S. S., M. Hall, R. Srivastava, A. Subramony, and J. E. Levin.** 2009. Intravenous immunoglobulin in children with streptococcal toxic shock syndrome. *Clin Infect Dis* **49**:1369-76.
428. **Shaikh, N., E. Leonard, and J. M. Martin.** 2010. Prevalence of streptococcal pharyngitis and streptococcal carriage in children: a meta-analysis. *Pediatrics* **126**:e557-64.
429. **Shannon, O., E. Herten, A. Norrby-Teglund, M. Morgelin, U. Sjobring, and L. Bjorck.** 2007. Severe streptococcal infection is associated with M protein-induced platelet activation and thrombus formation. *Mol Microbiol* **65**:1147-57.
430. **Shelburne, S. A., 3rd, C. Granville, M. Tokuyama, I. Sitkiewicz, P. Patel, and J. M. Musser.** 2005. Growth characteristics of and virulence factor production by group A *Streptococcus* during cultivation in human saliva. *Infect Immun* **73**:4723-31.
431. **Shulman, S. T., A. L. Bisno, H. W. Clegg, M. A. Gerber, E. L. Kaplan, G. Lee, J. M. Martin, and C. Van Beneden.** 2012. Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **55**:1279-82.
432. **Sierig, G., C. Cywes, M. R. Wessels, and C. D. Ashbaugh.** 2003. Cytotoxic effects of streptolysin o and streptolysin s enhance the virulence of poorly encapsulated group a streptococci. *Infect Immun* **71**:446-55.
433. **Silva-Costa, C., F. R. Pinto, M. Ramirez, and J. Melo-Cristino.** 2008. Decrease in macrolide resistance and clonal instability among *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Clin Microbiol Infect* **14**:1152-9.

434. **Silva-Costa, C., M. Ramirez, and J. Melo-Cristino.** 2006. Identification of macrolide-resistant clones of *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Clin Microbiol Infect* **12**:513-8.
435. **Simon, P., M. P. Ramee, K. S. Ang, and G. Cam.** 1986. [Course of the annual incidence of primary glomerulopathies in a population of 400,000 inhabitants over a 10-year period (1976-1985)]. *Nephrologie* **7**:185-9.
436. **Single, L. A., and D. R. Martin.** 1992. Clonal differences within M-types of the group A *Streptococcus* revealed by pulsed field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* **70**:85-9.
437. **Sitkiewicz, I., M. J. Nagiec, P. Sumby, S. D. Butler, C. Cywes-Bentley, and J. M. Musser.** 2006. Emergence of a bacterial clone with enhanced virulence by acquisition of a phage encoding a secreted phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:16009-14.
438. **Smeesters, P. R., P. Mardulyn, A. Vergison, R. Leplae, and L. Van Melderren.** 2008. Genetic diversity of Group A *Streptococcus* M protein: implications for typing and vaccine development. *Vaccine* **26**:5835-42.
439. **Smeesters, P. R., D. J. McMillan, and K. S. Sriprakash.** 2010. The streptococcal M protein: a highly versatile molecule. *Trends Microbiol* **18**:275-82.
440. **Smeesters, P. R., A. Vergison, D. Campos, E. de Aguiar, V. Y. Miendje Deyi, and L. Van Melderren.** 2006. Differences between Belgian and Brazilian group A *Streptococcus* epidemiologic landscape. *PLoS One* **1**:e10.
441. **Smeesters, P. R., A. Vergison, D. C. Junior, and L. Van Melderren.** 2009. Emerging fluoroquinolone-non-susceptible group A streptococci in two different paediatric populations. *Int J Antimicrob Agents* **34**:44-9.
442. **Smith, T. D., V. Wilkinson, and E. L. Kaplan.** 1989. Group A *streptococcus*-associated upper respiratory tract infections in a day-care center. *Pediatrics* **83**:380-4.
443. **Smoot, J. C., K. D. Barbian, J. J. Van Gompel, L. M. Smoot, M. S. Chaussee, G. L. Sylva, D. E. Sturdevant, S. M. Ricklefs, S. F. Porcella, L. D. Parkins, S. B. Beres, D. S. Campbell, T. M. Smith, Q. Zhang, V. Kapur, J. A. Daly, L. G. Veasy, and J. M. Musser.** 2002. Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4668-73.
444. **Special Writing Group of the Committee on Rheumatic Fever Endocarditis and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the Young of the American Heart Association.** 1992. Guidelines for the diagnosis of rheumatic fever. Jones Criteria, 1992 update. *JAMA* **268**:2069-73.
445. **Sriskandan, S., and J. Cohen.** 1999. Gram-positive sepsis. Mechanisms and differences from gram-negative sepsis. *Infect Dis Clin North Am* **13**:397-412.
446. **Sriskandan, S., L. Faulkner, and P. Hopkins.** 2007. *Streptococcus pyogenes*: Insight into the function of the streptococcal superantigens. *Int J Biochem Cell Biol* **39**:12-9.
447. **Sriskandan, S., M. Ferguson, V. Elliot, L. Faulkner, and J. Cohen.** 2006. Human intravenous immunoglobulin for experimental streptococcal toxic shock: bacterial clearance and modulation of inflammation. *J Antimicrob Chemother* **58**:117-24.
448. **Staali, L., M. Morgelin, L. Bjorck, and H. Tapper.** 2003. *Streptococcus pyogenes* expressing M and M-like surface proteins are phagocytosed but survive inside human neutrophils. *Cell Microbiol* **5**:253-65.
449. **Starr, C. R., and N. C. Engleberg.** 2006. Role of hyaluronidase in subcutaneous spread and growth of group A *streptococcus*. *Infect Immun* **74**:40-8.
450. **Steer, A. C., M. H. Danchin, and J. R. Carapetis.** 2007. Group A streptococcal infections in children. *J Paediatr Child Health* **43**:203-13.

451. **Steer, A. C., A. Jenney, J. Kado, M. F. Good, M. Batzloff, L. Waqatakirewa, E. K. Mullholland, and J. R. Carapetis.** 2009. Prospective surveillance of invasive group A streptococcal disease, Fiji, 2005-2007. *Emerg Infect Dis* **15**:216-22.
452. **Steer, A. C., A. W. Jenney, J. Kado, M. R. Batzloff, S. La Vincente, L. Waqatakirewa, E. K. Mulholland, and J. R. Carapetis.** 2009. High burden of impetigo and scabies in a tropical country. *PLoS Negl Trop Dis* **3**:e467.
453. **Steer, A. C., I. Law, L. Matatolu, B. W. Beall, and J. R. Carapetis.** 2009. Global *emm* type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. *Lancet Infect Dis* **9**:611-6.
454. **Stegmayr, B., S. Bjorck, S. Holm, J. Nisell, A. Rydval, and B. Settergren.** 1992. Septic shock induced by group A streptococcal infection: clinical and therapeutic aspects. *Scand J Infect Dis* **24**:589-97.
455. **Stevens, D. L.** 1999. The flesh-eating bacterium: what's next? *J Infect Dis* **179 Suppl 2**:S366-74.
456. **Stevens, D. L.** 1992. Invasive group A *streptococcus* infections. *Clin Infect Dis* **14**:2-11.
457. **Stevens, D. L.** 1995. Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerg Infect Dis* **1**:69-78.
458. **Stevens, D. L., A. E. Gibbons, R. Bergstrom, and V. Winn.** 1988. The Eagle effect revisited: efficacy of clindamycin, erythromycin, and penicillin in the treatment of streptococcal myositis. *J Infect Dis* **158**:23-8.
459. **Stevens, D. L., M. H. Tanner, J. Winship, R. Swarts, K. M. Ries, P. M. Schlievert, and E. Kaplan.** 1989. Severe group A streptococcal infections associated with a toxic shock-like syndrome and scarlet fever toxin A. *N Engl J Med* **321**:1-7.
460. **Stevens, D. L., S. Yan, and A. E. Bryant.** 1993. Penicillin-binding protein expression at different growth stages determines penicillin efficacy *in vitro* and *in vivo*: an explanation for the inoculum effect. *J Infect Dis* **167**:1401-5.
461. **Stock, A. H., J. Uriel, and P. Grabar.** 1961. Esterase in extracellular concentrates of group A streptococci and the homologous antibody. *Nature* **192**:434-5.
462. **Stockbauer, K. E., D. Grigsby, X. Pan, Y. X. Fu, L. M. Mejia, A. Cravioto, and J. M. Musser.** 1998. Hypervariability generated by natural selection in an extracellular complement-inhibiting protein of serotype M1 strains of group A *Streptococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3128-33.
463. **Stollerman, G. H.** 1997. Rheumatic fever. *Lancet* **349**:935-42.
464. **Stollerman, G. H.** 2001. Rheumatic fever in the 21st century. *Clin Infect Dis* **33**:806-14.
465. **Stoolmiller, A. C., and A. Dorfman.** 1969. The biosynthesis of hyaluronic acid by *Streptococcus*. *J Biol Chem* **244**:236-46.
466. **Stromberg, A., V. Romanus, and L. G. Burman.** 1991. Outbreak of group A streptococcal bacteremia in Sweden: an epidemiologic and clinical study. *J Infect Dis* **164**:595-8.
467. **Sugareva, V., R. Arlt, T. Fiedler, C. Riani, A. Podbielski, and B. Kreikemeyer.** 2010. Serotype- and strain- dependent contribution of the sensor kinase CovS of the CovRS two-component system to *Streptococcus pyogenes* pathogenesis. *BMC Microbiol* **10**:34.
468. **Sumby, P., K. D. Barbian, D. J. Gardner, A. R. Whitney, D. M. Welty, R. D. Long, J. R. Bailey, M. J. Parnell, N. P. Hoe, G. G. Adams, F. R. Deleo, and J. M. Musser.** 2005. Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:1679-84.

469. **Sumby, P., S. F. Porcella, A. G. Madrigal, K. D. Barbian, K. Virtaneva, S. M. Ricklefs, D. E. Sturdevant, M. R. Graham, J. Vuopio-Varkila, N. P. Hoe, and J. M. Musser.** 2005. Evolutionary origin and emergence of a highly successful clone of serotype M1 group a *Streptococcus* involved multiple horizontal gene transfer events. *J Infect Dis* **192**:771-82.
470. **Sumby, P., A. R. Whitney, E. A. Graviss, F. R. DeLeo, and J. M. Musser.** 2006. Genome-wide analysis of group a streptococci reveals a mutation that modulates global phenotype and disease specificity. *PLoS Pathog* **2**:e5.
471. **Sun, H., U. Ringdahl, J. W. Homeister, W. P. Fay, N. C. Engleberg, A. Y. Yang, L. S. Rozek, X. Wang, U. Sjobring, and D. Ginsburg.** 2004. Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection. *Science* **305**:1283-6.
472. **Talay, S. R., P. Valentin-Weigand, P. G. Jerlstrom, K. N. Timmis, and G. S. Chhatwal.** 1992. Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. *Infect Immun* **60**:3837-44.
473. **Talkington, D. F., B. Schwartz, C. M. Black, J. K. Todd, J. Elliott, R. F. Breiman, and R. R. Facklam.** 1993. Association of phenotypic and genotypic characteristics of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates with clinical components of streptococcal toxic shock syndrome. *Infect Immun* **61**:3369-74.
474. **Tamura, F., R. Nakagawa, T. Akuta, S. Okamoto, S. Hamada, H. Maeda, S. Kawabata, and T. Akaike.** 2004. Proapoptotic effect of proteolytic activation of matrix metalloproteinases by *Streptococcus pyogenes* thiol proteinase (*Streptococcus pyrogenes* exotoxin B). *Infect Immun* **72**:4836-47.
475. **Tanz, R. R., S. T. Shulman, P. A. Sroka, S. Marubio, I. Brook, and R. Yogev.** 1990. Lack of influence of beta-lactamase-producing flora on recovery of group A streptococci after treatment of acute pharyngitis. *J Pediatr* **117**:859-63.
476. **Tatsuno, I., R. Okada, Y. Zhang, M. Isaka, and T. Hasegawa.** 2013. Partial loss of CovS function in *Streptococcus pyogenes* causes severe invasive disease. *BMC Res Notes* **6**:126.
477. **Terao, Y., S. Kawabata, E. Kunitomo, J. Murakami, I. Nakagawa, and S. Hamada.** 2001. Fba, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells, and the fba gene is positively transcribed under the Mga regulator. *Mol Microbiol* **42**:75-86.
478. **Terao, Y., Y. Mori, M. Yamaguchi, Y. Shimizu, K. Ooe, S. Hamada, and S. Kawabata.** 2008. Group A streptococcal cysteine protease degrades C3 (C3b) and contributes to evasion of innate immunity. *J Biol Chem* **283**:6253-60.
479. **The Working Group on Severe Streptococcal Infections.** 1993. Defining the group A streptococcal toxic shock syndrome. Rationale and consensus definition *JAMA* **269**:390-1.
480. **Thulin, P., L. Johansson, D. E. Low, B. S. Gan, M. Kotb, A. McGeer, and A. Norrby-Teglund.** 2006. Viable Group A Streptococci in Macrophages during Acute Soft Tissue Infection. *PLoS Med* **3**:e53.
481. **Tilanus, A. M., H. R. de Geus, B. J. Rijnders, R. S. Dwarkasing, B. van der Hoven, and J. Bakker.** 2010. Severe group A streptococcal toxic shock syndrome presenting as primary peritonitis: a case report and brief review of the literature. *Int J Infect Dis* **14 Suppl 3**:e208-12.
482. **Timmer, A. M., S. A. Kristian, V. Datta, A. Jeng, C. M. Gillen, M. J. Walker, B. Beall, and V. Nizet.** 2006. Serum opacity factor promotes group A streptococcal epithelial cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* **62**:15-25.



483. **Timmer, A. M., J. C. Timmer, M. A. Pence, L. C. Hsu, M. Ghochani, T. G. Frey, M. Karin, G. S. Salvesen, and V. Nizet.** 2009. Streptolysin O promotes group A *Streptococcus* immune evasion by accelerated macrophage apoptosis. *J Biol Chem* **284**:862-71.
484. **Todd, E. W.** 1938. Lethal toxins of hemolytic streptococci and their antibodies. *Br J Exp Pathol.* **19**:367–378.
485. **Tran-Winkler, H. J., J. F. Love, I. Gryllos, and M. R. Wessels.** 2011. Signal transduction through CsrRS confers an invasive phenotype in group A *Streptococcus*. *PLoS Pathog* **7**:e1002361.
486. **Trevino, J., Z. Liu, T. N. Cao, E. Ramirez-Pena, and P. Sumby.** 2013. RivR is a negative regulator of virulence factor expression in group A *Streptococcus*. *Infect Immun* **81**:364-72.
487. **Trevino, J., N. Perez, E. Ramirez-Pena, Z. Liu, S. A. Shelburne, 3rd, J. M. Musser, and P. Sumby.** 2009. CovS simultaneously activates and inhibits the CovR-mediated repression of distinct subsets of group A *Streptococcus* virulence factor-encoding genes. *Infect Immun* **77**:3141-9.
488. **Tyler, S. D., W. M. Johnson, J. C. Huang, F. E. Ashton, G. Wang, D. E. Low, and K. R. Rozee.** 1992. Streptococcal erythrogenic toxin genes: detection by polymerase chain reaction and association with disease in strains isolated in Canada from 1940 to 1991. *J Clin Microbiol* **30**:3127-31.
489. **Uchiyama, S., F. Andreoni, R. A. Schuepbach, V. Nizet, and A. S. Zinkernagel.** 2012. DNase Sda1 allows invasive MIT1 Group A *Streptococcus* to prevent TLR9-dependent recognition. *PLoS Pathog* **8**:e1002736.
490. **Ulrich, R. G.** 2008. Vaccine based on a ubiquitous cysteinyl protease and streptococcal pyrogenic exotoxin A protects against *Streptococcus pyogenes* sepsis and toxic shock. *J Immune Based Ther Vaccines* **6**:8.
491. **Unnikrishnan, M., D. M. Altmann, T. Proft, F. Wahid, J. Cohen, J. D. Fraser, and S. Sriskandan.** 2002. The bacterial superantigen streptococcal mitogenic exotoxin Z is the major immunoactive agent of *Streptococcus pyogenes*. *J Immunol* **169**:2561-9.
492. **Van Heirstraeten, L., G. Leten, C. Lammens, H. Goossens, and S. Malhotra-Kumar.** 2012. Increase in fluoroquinolone non-susceptibility among clinical *Streptococcus pyogenes* in Belgium during 2007-10. *J Antimicrob Chemother* **67**:2602-5.
493. **Veasy, L. G., S. E. Wiedmeier, G. S. Orsmond, H. D. Ruttenberg, M. M. Boucek, S. J. Roth, V. F. Tait, J. A. Thompson, J. A. Daly, E. L. Kaplan, and et al.** 1987. Resurgence of acute rheumatic fever in the intermountain area of the United States. *N Engl J Med* **316**:421-7.
494. **Virtaneva, K., S. F. Porcella, M. R. Graham, R. M. Ireland, C. A. Johnson, S. M. Ricklefs, I. Babar, L. D. Parkins, R. A. Romero, G. J. Corn, D. J. Gardner, J. R. Bailey, M. J. Parnell, and J. M. Musser.** 2005. Longitudinal analysis of the group A *Streptococcus* transcriptome in experimental pharyngitis in cynomolgus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:9014-9.
495. **Vlaminckx, B. J., E. M. Mascini, J. Schellekens, L. M. Schouls, A. Paauw, A. C. Fluit, R. Novak, J. Verhoef, and F. J. Schmitz.** 2003. Site-specific manifestations of invasive group a streptococcal disease: type distribution and corresponding patterns of virulence determinants. *J Clin Microbiol* **41**:4941-9.
496. **von Pawel-Rammingen, U., B. P. Johansson, and L. Bjorck.** 2002. IdeS, a novel streptococcal cysteine proteinase with unique specificity for immunoglobulin G. *EMBO J* **21**:1607-15.

497. Walker, M. J., A. Hollands, M. L. Sanderson-Smith, J. N. Cole, J. K. Kirk, A. Henningham, J. D. McArthur, K. Dinkla, R. K. Aziz, R. G. Kansal, A. J. Simpson, J. T. Buchanan, G. S. Chhatwal, M. Kotb, and V. Nizet. 2007. DNase Sda1 provides selection pressure for a switch to invasive group A streptococcal infection. *Nat Med* **13**:981-5.
498. Wang, B., S. Li, P. J. Southern, and P. P. Cleary. 2006. Streptococcal modulation of cellular invasion via TGF-beta1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:2380-5.
499. Wang, B., R. S. Yurecko, S. Dedhar, and P. P. Cleary. 2006. Integrin-linked kinase is an essential link between integrins and uptake of bacterial pathogens by epithelial cells. *Cell Microbiol* **8**:257-66.
500. Wang, H., R. Lottenberg, and M. D. Boyle. 1995. A role for fibrinogen in the streptokinase-dependent acquisition of plasmin(ogen) by group A streptococci. *J Infect Dis* **171**:85-92.
501. Wang, J. R., and M. W. Stinson. 1994. M protein mediates streptococcal adhesion to HEp-2 cells. *Infect Immun* **62**:442-8.
502. Wannamaker, L. W. 1970. Differences between streptococcal infections of the throat and of the skin. I. *N Engl J Med* **282**:23-31.
503. Waters, C. M., and B. L. Bassler. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**:319-46.
504. Watson, D. W. 1960. Host-parasite factors in group A streptococcal infections. Pyrogenic and other effects of immunologic distinct exotoxins related to scarlet fever toxins. *J Exp Med* **111**:255-84.
505. Wei, L., V. Pandiripally, E. Gregory, M. Clymer, and D. Cue. 2005. Impact of the SpeB protease on binding of the complement regulatory proteins factor H and factor H-like protein 1 by *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **73**:2040-50.
506. Weisblum, B. 1995. Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:797-805.
507. Wenig, K., L. Chatwell, U. von Pawel-Rammingen, L. Bjorck, R. Huber, and P. Sonderrmann. 2004. Structure of the streptococcal endopeptidase IdeS, a cysteine proteinase with strict specificity for IgG. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:17371-6.
508. Wessels, M. R., and M. S. Bronze. 1994. Critical role of the group A streptococcal capsule in pharyngeal colonization and infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:12238-42.
509. Wessels, M. R., J. B. Goldberg, A. E. Moses, and T. J. DiCesare. 1994. Effects on virulence of mutations in a locus essential for hyaluronic acid capsule expression in group A streptococci. *Infect Immun* **62**:433-41.
510. Wessels, M. R., A. E. Moses, J. B. Goldberg, and T. J. DiCesare. 1991. Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:8317-21.
511. West, A. H., and A. M. Stock. 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**:369-76.
512. Wexler, D. E., D. E. Chenoweth, and P. P. Cleary. 1985. Mechanism of action of the group A streptococcal C5a inactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:8144-8.
513. White, J., A. Herman, A. M. Pullen, R. Kubo, J. W. Kappler, and P. Marrack. 1989. The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* **56**:27-35.
514. Whitnack, E., and E. H. Beachey. 1985. Inhibition of complement-mediated opsonization and phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* by D fragments of fibrinogen and fibrin bound to cell surface M protein. *J Exp Med* **162**:1983-97.

515. **WHO.** 2004. Rheumatic fever and rheumatic heart disease. World Health Organ Tech Rep Ser **923**:1-122, back cover.
516. **Wolf, B. B., C. A. Gibson, V. Kapur, I. M. Hussaini, J. M. Musser, and S. L. Gonias.** 1994. Proteolytically active streptococcal pyrogenic exotoxin B cleaves monocytic cell urokinase receptor and releases an active fragment of the receptor from the cell surface. *J Biol Chem* **269**:30682-7.
517. **Wu, Q. L., Y. F. Fu, W. L. Zhou, J. X. Wang, Y. H. Feng, J. Liu, J. Y. Xu, P. L. He, R. Zhou, W. Tang, G. F. Wang, Y. Zhou, Y. F. Yang, J. Ding, X. Y. Li, X. R. Chen, C. Yuan, B. R. Lawson, and J. P. Zuo.** 2005. Inhibition of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase induces immunosuppression. *J Pharmacol Exp Ther* **313**:705-11.
518. **Yang, L., M. Thomas, A. Woodhouse, D. Martin, J. D. Fraser, and T. Proft.** 2005. Involvement of streptococcal mitogenic exotoxin Z in streptococcal toxic shock syndrome. *J Clin Microbiol* **43**:3570-3.
519. **Zachariadou, L., A. Stathi, P. T. Tassios, A. Pangalis, N. J. Legakis, and J. Papaparaskevas.** 2013. Differences in the epidemiology between paediatric and adult invasive *Streptococcus pyogenes* infections. *Epidemiol Infect*:1-8.
520. **Zinkernagel, A. S., P. Hruz, S. Uchiyama, M. von Kockritz-Blickwede, R. A. Schuepbach, T. Hayashi, D. A. Carson, and V. Nizet.** 2012. Importance of Toll-like receptor 9 in host defense against MIT1 group A *Streptococcus* infections. *J Innate Immun* **4**:213-8.
521. **Zinkernagel, A. S., A. M. Timmer, M. A. Pence, J. B. Locke, J. T. Buchanan, C. E. Turner, I. Mishalian, S. Sriskandan, E. Hanski, and V. Nizet.** 2008. The IL-8 protease SpyCEP/ScpC of group A *Streptococcus* promotes resistance to neutrophil killing. *Cell Host Microbe* **4**:170-8.
522. **Zurawski, C. A., M. Bardsley, B. Beall, J. A. Elliott, R. Facklam, B. Schwartz, and M. M. Farley.** 1998. Invasive group A streptococcal disease in metropolitan Atlanta: a population-based assessment. *Clin Infect Dis* **27**:150-7.

## **Annexes**

---

## **Article II**

---

Márcia Dinis, Céline Plainvert, Pavel Kovarik, Vanessa Lagal, Isabelle Tardieux, Agnès Fouet, Claire Poyart

*Résultats non publiés, article en cours de soumission*

**The innate immune response elicited by Group A Streptococcus is highly variable among clinical strains and correlates with the *emm* type.**

Márcia Dinis <sup>\*,†,‡,††</sup>, Céline Plainvert <sup>\*,†,‡,§,¶</sup>, Pavel Kovarik <sup>\*\*</sup>, Vanessa Lagal <sup>\*,†,‡</sup>, Isabelle Tardieux <sup>\*,†,‡</sup>,  
Agnès Fouet <sup>\*,†,‡,‡‡</sup>, Claire Poyart <sup>\*,†,‡,§,¶,||,‡‡</sup>

<sup>\*</sup>INSERM U 1016, Institut Cochin, Unité FRM "Barrières and Pathogènes" F-75014 Paris, France,

<sup>†</sup>CNRS UMR 8104, F-75014 Paris, France,

<sup>‡</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, F-75014 Paris, France,

<sup>§</sup>Centre National de Référence des Streptocoques, F-75014 Paris, France,

<sup>¶</sup>Groupe hospitalier Cochin-Hôtel Dieu-Broca, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, F-75014 Paris, France

<sup>||</sup>Institut Pasteur, Unité de Biologie de Bactérie Pathogène a Gram Positif, F-74016 Paris, France

<sup>#</sup>CNRS 2172, Paris, France

<sup>\*\*</sup>Max F. Perutz Laboratories, University of Vienna, Dr. Bohr-Gasse 9, A-1030 Vienna, Austria

<sup>‡‡</sup> These authors share the senior authorship

<sup>††</sup> Present address: Institut Pasteur, Unité de Biologie de Bactérie Pathogène a Gram Positif, F-75015 Paris, France

***Corresponding author:***

E-mail: [claire.poyart@cch.aphp.fr](mailto:claire.poyart@cch.aphp.fr)

Phone: +33 1 58 41 15 60 - Fax: +33 1 58 41 15 48

**Running title:** GAS-macrophage interaction depends on the *emm* type

## ABSTRACT

*Streptococcus pyogenes*, GAS, infections remain a significant health care problem due to high morbidity and mortality associated with GAS diseases, along with their increasing worldwide prevalence. Macrophages play a key role in the control and clearance of GAS infections. Moreover, pro-inflammatory cytokines production and GAS persistence and invasion are related. In this study we investigated the correlation between the *S. pyogenes* clinical isolates genotypes, their known clinical history, and their ability to modulate innate immune response. We constituted a collection of 60 independent strains representative of the *emm* types currently prevalent in France and responsible of invasive (59.02%) and non-invasive (40.98%) clinical manifestations. We tested phagocytosis and survival in mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs) and quantified the pro-inflammatory mediators (IL-6, TNF- $\alpha$ ) and type I interferon (INF- $\beta$ ) production. Invasive *emm3* and *emm89* strains were more phagocytosed than their non-invasive counterparts and *emm89* strains more than the other strains. There were no significant differences, in terms of survival, between invasive and non-invasive strains within the same *emm* type, but there were differences depending on the strain *emm* type. Furthermore, the *emm3* strains were more damaging to macrophages than the other strains. The level of inflammatory mediators produced was also *emm* type-dependent and mostly invasiveness status independent. The *emm1* strains were able to induce the highest levels of both pro-inflammatory cytokines, whereas the *emm89* strains induced the earliest production of INF- $\beta$ . Finally, even within *emm* types, there was a variability of the innate immune responses induced, but survival and inflammatory mediator production were not linked.

## Introduction

Group A Streptococcus (GAS, *Streptococcus pyogenes*) is among the most ubiquitous and versatile human bacterial pathogen and it has major healthcare and economic impacts [1,2]. This Gram-positive bacterium can cause a broad range of infectious diseases, from self-limiting suppurative infection of the upper respiratory tract (pharyngitis) and skin (impetigo) to deeper and life threatening invasive infections such as toxic shock-like syndrome (STSS), necrotizing fasciitis (NF), with an estimated 500,000 deaths yearly [1,2].

Since the late 1980's a marked increase of GAS invasive infections has been reported world-wide [3]. Traditionally, GAS have been classified into serological types using M protein serotyping and T protein agglutination assays. Currently, the *emm* sequence typing, sequencing the 5' end of the *emm* gene, encoding the hypervariable amino-terminus region of the the M protein, is the most widely used typing-method for GAS strains [4]. To date more than 200 different *emm* gene types have been defined [5]. The most prevalent *emm* types associated with invasive infections are *emm1*, *emm3*, *emm28*, *emm89*, but different percentage distributions may be observed worldwide [6,7]. Correlation between *emm* type and tissue tropism have been reported but not between *emm* type and disease severity, with the exception of *emm1* and *emm3* strains, that are associated with NF and STSS [7,8,9].

GAS has been described as an extracellular pathogen that can survive and persist circumventing the host defense mechanisms. GAS has evolved a broad array of virulence factors to outwit the activities of phagocytic cells [10,11] and it has developed a number of strategies to avoid or induce an overreaction of the host immune system [12,13]. Surface components of GAS including a family of M-proteins, the hyaluronic acid capsule, fibronectin and collagen-binding proteins allow the microorganism to adhere, colonise and invade human skin and mucosal tissue under varying environmental conditions [2,14,15]. The M protein, a fimbrial surface protein, is extremely variable



and five classes have been defined [16]. It has an anti-phagocytic activity and it can, depending on its class, bind to diverse host molecules, among which complement proteins preventing the alternative complement pathway activation, the bacterium evading killing by the polymorphonuclear leucocytes [10,17]. The hyaluronic acid capsule confers invasiveness *in vivo*, by interfering with binding of antibodies leading to phagocytosis resistance [18]. GAS also secretes virulence factors. The SpeB cysteine protease is a crucial virulence factor, which is able to modulate GAS surface proteins function in colonization and significantly contributes to tissue destruction in necrotizing fasciitis. SpeB can cleave host extracellular matrix proteins, as well as immune system components, and activate matrix metalloproteinases to promote further tissue damage and the release of proapoptotic factors [19,20]. SLO is a human-specific cytolysin with a range of properties, including the ability to form pores and to prevent the internalization of GAS by lysosomes, thus enhancing the intracellular survival of GAS within epithelial cells [21]. The streptococcal pyrogenic exotoxins (SpeA, SpeC, SpeG to SpeM), streptococcal superantigen A (SSA), and streptococcal mitogenic exotoxin Z (SmeZ) have been identified as superantigens; they are released as toxins that can activate a large proportion of T-cell population, eliciting inflammatory response [2,12,22]. The excessive uncoordinated release of cytokines such as IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN, overrides the body, resulting in rash, fever, organ failure, coma and death. Epidemiological studies have tentatively searched for links between *emm* types, superantigen profiles and strain invasiveness reporting different conclusions [23,24].

The primary line of innate immune defense against most bacterial pathogens consists of resident macrophages and polymorphonuclear neutrophils (PMN's). It has been demonstrated that macrophages have a profound influence in the early host immune defense against GAS [25,26,27]. Yet, their role in the early steps of GAS infection remains unclear; they can kill GAS or the bacteria can survive and even multiply in the macrophage.

The nature of cytokine response induced early in infection might affect the recruitment and activation of phagocytic cells capable of eliminating the invading microorganism. It has been previously described that *S. pyogenes* induces an overwhelming amount of pro-inflammatory mediators that have been correlated with GAS survival, persistence and modulation of innate immune response. GAS survival in murine bone marrow macrophages (BMDMs) is related to the production of TNF- $\alpha$  and IL-6, which is independent of TLR2, TLR4 and TLR9 presence [28]. Until recently type I Interferon was considered to be most important in the immune response to intracellular pathogens [29]. Surprisingly, BMDMs infection with *S. pyogenes*, which displays mostly an extracellular life style, induces the production IFN- $\beta$  [28]. Mice deficient in type I INF signaling were more susceptible to invasive *S. pyogenes* infection, and the IFN- $\beta$  production was independent of TLR3, TLR7, TLR9, NOD1 and NOD2 receptors [30].

The high variability of the clinical manifestations is due on the one hand to the diversity of the GAS strains and the other hand to the influence of the host immunogenetic background [2,31,32]. Yet, no studies addressing the role of the high genetic variability of GAS in resistance to or stimulation of the innate immune system have been reported.

In the present study, we investigated the possible correlation between GAS clinical isolates genetic background, their ability to modulate BMDMs response and the disease they induced. For this purpose, we defined a strain collection of independent invasive and non-invasive clinical isolates representative of the most prevalent *emm* types currently isolated in France. We infected *in vitro* BMDMs with these strains, quantified phagocytosis, bacterial survival and pro-inflammatory (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) cytokines and anti-inflammatory IFN- $\beta$  secretion.

## Material and Methods

### *Characterization of GAS strains*

GAS clinical isolates were collected by the CNR-Strep (Table S1). The invasive status was defined as the isolation of bacteria from a usually sterile site (e.g. blood, cerebrospinal fluid, bone or joint fluid), or from samples obtained from a non-sterile site in combination with clinical signs of necrotizing fasciitis or streptococcal toxic shock syndrome (STSS). Bacteraemia was considered to be without focus when no focal symptoms could be identified. Colonization strains were obtained from pharyngeal carrier obtained from random cases with no clinical symptoms associated. GAS M1 Inv1 (ATCC 700294) a clinical strain originally isolated from an infected wound and previously studied was used as control [28]. *emm* sequence type was determined by sequencing the variable 5'-end of the *emm* gene and comparing sequences with database of the Center for Disease Control and Prevention [4] (<http://www.cdc.gov/ncdidod/biotech/strep/doc.htm>). PCR reactions were performed to detect the presence of toxin or superantigen genes, *speA 1-5*, *speB*, *speC*, *speJ* and *ssa* as described [7,33].

### *Bacterial growth conditions*

GAS strains were grown at 37°C without agitation in Todd-Hewitt broth (THB) or in DMEM medium at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Bacteria were collected in mid-log phase, washed twice with sterile phosphate-buffered saline (PBS), and diluted to the required inoculum and the number of viable bacteria was determined by counting the colony forming units (CFUs) after plating dilutions on TH agar (THA).

### *Macrophage cultures, infection assays, and immunofluorescence confocal imaging*

Primary bone marrow-derived macrophages (BMDMs) from 6-10 weeks-old female C57Bl/6 mice (Charles River Laboratories), were cultivated in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum in the presence of GM-CSF (10ng/mL) and antibiotics, 30 U/mL penicillin and 30 µg/mL streptomycin

as described [28]. After 10 days, twenty-four well plates were seeded with  $5 \times 10^5$  BMDM's per well and 24 hours later, mid-logarithmic phase bacterial cultures were added at a multiplicity of infection (MOI) of 100 [28]. After 30 min of incubation at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, the non-adherent extracellular bacteria were eliminated removing the culture medium and three washing with sterile PBS. The adherent extracellular bacteria were subsequently killed by incubation, with fresh medium containing 30 U/mL penicillin/ and 30 µg/mL streptomycin. At time 0 (T0 which corresponded to 30 min after addition of antibiotics) and at specific time points after, supernatants were collected, centrifuged at 10,000 rpm at 4°C and frozen at -20°C for cytokine quantification and macrophages were lysed with 1 mL sterile distilled water. Serial dilutions of cellular lysates were plated on THA plates and the number of CFUs was determined after 24-48 hours growth at 37°C. For all experiments, 3 independent assays in triplicate were carried out for each bacterial strain.

BMDMs, grown as described above were infected with CFSE (1 µM, 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester, Sigma) stained GAS (MOI=100). At T1, cells were fixed with 0.6% PFA (Paraformaldehyde) for 1h at 4°C and after, blocked with 1% BSA in PBS. Extracellular bacteria were labeled with the primary anti-*S. pyogenes* rabbit antibody (kind gift from I. Julkunen), followed by incubation with Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (Lifetechnology). Afterwards, cells were permeabilized with Triton 0.2% for 10 min and incubated with Alexa Fluor 660 phalloidin. The internalized bacteria percentage was calculated by the subtraction of external bacteria (red) from the total number of CFSE-stained bacteria (green), and dividing by the number of CFSE-stained bacteria. Images were acquired on a confocal Nikon Ti eclipse microscope (z-stacks of 0.3 µm, 60 x immersion objective). Stacks were analyzed with Metamorph (using the 4D viewer application) and ImageJ softwares.

### *Neutral red uptake assay*

The neutral red (NR) uptake assay provides a quantitative estimation of the number of viable cells in a culture [34]. Briefly, after infection cells were washed with warm PBS and 500  $\mu$ L of NR-medium solution (40  $\mu$ g/mL in DMEM medium) was added and the cells were further incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 2 hours. The NR-medium solution was then removed; cells were washed with PBS and 250  $\mu$ l neutral red de-staining solution (acetic acid 1% / ethanol 50%) was added. The plates were rapidly shaken until the neutral red has been extracted from the cells and has formed a homogeneous solution. The OD of neutral red extract was measured at 540 nm in a microtiter plate reader spectrophotometer.

### *Apoptosis quantification by TUNEL assay*

BMDs were infected at a MOI of 100, or left untreated (medium, negative control), or treated with 10 or 50  $\mu$ M of staurosporin (positive control) for 2 hours. Cells were then fixed and stained using the DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega) following the manufacturer's instructions. Following in situ TUNEL staining, the slides were visualized in a Zeiss Axiovert 200 microscope and percentage of cells that incorporate fluorescein-dUTP (TUNEL positive cells) was quantified. Three independent assays in triplicate were carried out for each bacterial strain.

### *Cytokine quantification*

The levels of IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\beta$  were determined, by ELISA, in the supernatants of GAS infected, LPS-stimulated (10  $\mu$ g/mL, positive control) and unstimulated (negative control) BMDMs. IL-6 and TNF- $\alpha$  were assayed using DuoSet ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN). The amount of IFN- $\beta$  was measured using VeriKine Mouse Interferon Beta Kit (PBL Biomedical laboratories), according to manufacturers' instructions. For all experiments, 3 independent assays in triplicate were carried out for each bacterial strain.

### *Statistical analysis*

Data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California). The significance of differences between the values was determined by Mann-Whitney test. Significance levels were set at \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.005$ .

### *Ethics statement*

All of the animal experiments described in this study were conducted in accordance with guidelines of Cochin Institute, in compliance with the European animal welfare regulation ([http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/home\\_en.html](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.html)) and were approved by the Institut Cochin animal care and use committee.

## Results

### *Selection and genotypic characterization of a relevant collection of GAS clinical isolates*

Our first goal was to select a representative and relevant strain sampling from the CNR-Strep collection. Sixty-one non-redundant GAS from different geographical areas and different periods responsible for different type of infections: invasive with or without STSS (Inv; n=36, 59.02 %) and non-invasive (pharyngitis, cutaneous infections) (NInv; n=25, 40.98 %), from adults and children (Table S1) were selected. GAS strains belonged to the most prevalent *emm* types recovered in France, but also in other European countries and Northern America. The *M* type distribution of the 60 GAS is as follows: *M1* (n= 15; 25%), *M3* (n= 10; 16.7%), *M4* (n=9; 15%), *M28* (n=12; 20%) and *M89* (n=12; 20%) (Table S1).

The toxin gene profile of these strains was determined (Table S1). The presence of *speA*, *speB*, *speC* and *ssa* is sought systematically when strains are received by the CNR-Strep. Because it has been reported that the allele of *speA* and the presence of *speJ* correlates with the invasive status [23], we performed complementary PCR to assay these. The toxin gene profiles of the 60 selected strains were comparable to those described in epidemiological studies [7,24,35]. As expected *speB* gene was detected in all GAS strains whatever the *emm* type. All *emm1* strains contained *speJ*, harbor *speA* except GAS ATCC 700294 M1 Inv1, a strain added as control. *speA1-3* alleles were found in all *emm1* strains, with the exception of the M1 NInv1 strain which harbors the *speA5* allele. Among the 60 isolates, those from the *emm1* group are the only ones to display such uniformity for these two toxin genes and this is invasiveness status independent. Furthermore, strains M1 Inv8, M1 Inv9, M1 NInv5 and M1 Inv1 also harbor *speC*. All *emm3* strains have exactly the same profile, possessing *speA* and *ssa*, although *speA1-3* and *speA4* alleles are present. The *emm4* strains possess *ssa* and, except for M4 Inv3, M4 NInv1 and M4 NInv2, *speC*, suggesting that in the *emm4* group, *speC* may be more present among invasive strains. All *emm28* strains carry the *speC* gene and half of

them, equally distributed among the invasive and non-invasive strains, also harbor *speJ*. The *emm89* strains have, with the exception of M89 Inv2, M89 Inv5 and M89 NInv2, *speC*, equally distributed among invasive and non-invasive strains. These results confirmed that the toxin gene profile is quite similar within each *emm* type, but differs between *emm* types. Interestingly, the toxin gene profile strain is independent of the clinical manifestation.

*GAS phagocytosis and survival in macrophages is highly variable depending upon emm type and invasiveness status of the strain.*

In order to study if phagocytosis of GAS clinical isolates by macrophages varies and if this is dependent on the *emm* type or on strain invasiveness status, BMDMs were infected with each of the 60 selected GAS strains and the phagocytosis of each strain was compared by determining the percentage of bacterial CFUs recovered after 30 min post-antibiotics treatment relative to the initial inoculum (Fig. 1A, Table S2). It is noteworthy that the percentage of GAS phagocytosis varied significantly depending on the *emm* type and within some *emm* types according to the invasiveness status. It concerned especially *emm89* invasive strains which were significantly more phagocytosed compared to invasive strains of *emm1* ( $p < 0.0022$ ), *M4* ( $p = 0.0043$ ) and *emm28* ( $p = 0.0007$ ) strains. The phagocytosis of *emm3*, *emm4* and *emm28* invasive strains was highly variable in contrast to that of *emm89* and *emm1* invasive strains. For example, *emm3* uptake percentages varied from less than 3 % to more than 38%. Furthermore, non-invasive *emm3* strains were phagocytosed at similar levels (percentages ranging from 4 to 9 %) in contrast to *emm3* invasive strains. Moreover and remarkably, invasive *emm3* and *emm89* strains were significantly more phagocytosed than non-invasive strains of the same *emm* type (Fig.1A and data not shown). Altogether, these results clearly demonstrate that GAS phagocytosis is highly variable depending upon *emm* type and invasiveness status of the strain. *emm1* and *emm3* strains that are considered among the most virulent because often associated with STSS or NF, appear to be less phagocytosed than the other *emm* types investigated.



We then tested whether survival of GAS clinical isolates in BMDMs was also dependent on the strain *emm* type or clinical manifestation (Fig. 1B). Differences in bacterial survival appeared through the time course of the experiment. In contrast to what we observed concerning macrophage bacterial uptake, there was, inside any given *emm* type, no significant survival difference between invasive (black symbols) and non-invasive (white symbols) strains. However, the heterogeneity in the survival was still highly dependent on the *emm* type. Interestingly, all *emm3* strains, except one, which yielded a very low CFU count at T2, reacted similarly, being undetectable as soon as 2 h post-infection. The other singularity came from the *emm89* strains, which persisted significantly longer than all the other strains. *emm1* type strains also responded rather homogeneously and all but one were still viable at T4. GAS from the *emm4* and *emm28* types yielded scattered results; many strains had disappeared by T4 while others yielded high CFU counts at T6.

Thus, in contrast to macrophage uptake, once GAS are phagocytosed, the invasiveness status has no consequence on their survival in BMDM, in contrast to the *emm* type that plays a major role.

#### *emm3* GAS strains induce early macrophage apoptosis

Since all but one *emm3* strains were undetectable as early as 2 hours post-infection, we wondered whether these strains were more sensitive to macrophage killing, than other *emm* GAS strains, or were more toxic to macrophages and were, consequently, killed by the externally-added antibiotics. We first checked that the *emm3* GAS were actually intracellular by fluorescent microscopy (Fig. 2). To discriminate between extracellular *versus* intracellular bacteria, the *emm1* invasive control strain and an *emm3* invasive strain were labeled with CFSE prior phagocytosis, hence all bacteria are green. After phagocytosis and fixation in conditions that do not permeabilize the macrophages, bacteria were labeled with polyclonal anti-GAS antibodies and Alexa Fluor 594 secondary antibodies, hence extracellular bacteria are identified by dual yellow, or red due to an excess of antibodies, signals (Fig. 2A). Bacteria were found both intra- and extracellularly (Fig. 2A). The cellular location was confirmed by confocal microscopy, analyzing different z planes and a 3D

reconstruction from the entire stack (Fig. 2B). In addition to a differential staining, internal and external bacteria were not observed in the same planes with internal bacteria localized in deeper planes as shown in the 3D reconstruction (Fig. 2B). To note, there were some difficulty to clearly correlate the extracellular status (well defined with the red surface marker, red arrow) and the higher z position. This phenomenon may be due to bacteria size and stack thickness but also to the fact that the macrophage is not flat but presents membrane folds. Furthermore, intracellular *emm3* bacteria yielded a faint surface signal, suggesting a slight defect in macrophage membrane integrity.

To test whether intracellular *emm3* GAS were killed by antibiotics because they compromised the macrophage, we repeated the same infection protocol with the same *emm3* and *emm1* strains, but added, after the initial washing step in presence of antibiotics (T0), either medium alone or medium with antibiotics; we then determined the CFU counts at T0, T1, T2 and T4 post-infection (Fig. 3). In parallel we tested the strains growth in cell culture medium. The CFU numbers were constant ruling out the possibility of bacterial growth during the assay (data not shown). The number of the *emm1* GAS CFUs were similar at each time point, whether antibiotics were added or not, throughout the course of the experiment, indicating that the experiment can be done without antibiotics. *emm1* CFU counts slowly decreased with time confirming a bacterial killing by BMDMs. In contrast, whereas the CFU counts of all *emm3* strains, invasive or non-invasive also slowly decreased in absence of added antibiotics, they decreased sharply, as soon as one hour post-infection, in presence antibiotics. The slow decrease in absence of antibiotics indicated that the *emm3* GAS are also killed by the BMDMs. The absence of CFUs from T1 onward in presence of antibiotics indicated that *emm3* GAS are killed intracellularly by the antibiotics. This suggests that intracellular presence of *emm3* bacteria yielded BMDMs that are permeable to antibiotics, *i.e.* damaged macrophages. We therefore assessed BMDMs viability by measuring the ability of viable cells to retain the supravital dye neutral red (Fig. 3B). Neutral red was incompletely retained by *emm3*-infected BMDMs as early as T0. The neutral red leakage was time dependent and increased with time with the *emm3* strains independently of the

invasiveness status of the strains. In contrast, the amount of intracellular neutral red barely decreased in the *emm1*-infected BMDMs. Altogether these results indicate that *emm3* GAS-infected BMDMs are compromised and this cytotoxicity occurred very quickly, being already measurable at T0. To investigate if the macrophages permeabilization induced by *emm3* strains was associated with apoptosis, BMDMs were again infected with an *emm3* invasive strain and the *emm1* control invasive strain, left untreated or treated with 10 or 50  $\mu$ M staurosporin for 2 hours (Fig. 3C). After treatment, the apoptosis induction was determined by using a fluorometric TUNEL assay. The cells infected with *emm3* GAS yielded a similar percentage of Tunnel positive cells as the staurosporin 10  $\mu$ M positive control, a significantly higher one than that with the *emm1* control strain. Altogether, these results indicated that *emm3* strains that are rapidly cleared are, in fact, killed by the extracellular antibiotics because they induce rapid macrophage apoptosis.

*The immune mediator secretion is also correlated to GAS M type*

GAS induces pro-inflammatory mediator secretion [36]. We tested whether there is a correlation between inflammatory mediator secretion and the GAS *emm* type or clinical manifestation. The culture supernatants of GAS infected, LPS stimulated- (positive control) and unstimulated- (negative control) BMDMs were collected at different time points (Fig. 4). All groups of strains were able to induce the production of inflammatory mediators IL-6 and TNF- $\alpha$ . The levels of IL-6 production, were, except in presence of *emm3* strains, independent of the invasiveness status of the strains; the *emm3* non-invasive strains yielded, at T2 and T4, a higher secretion of IL-6 than the invasive ones. The TNF- $\alpha$  production levels were, except for *emm89* infected BMDMs, also independent of the invasiveness status of the strains. BMDMs infected; the *emm89* invasive strains secreted higher levels of TNF- $\alpha$  than those infected with the non-invasive *emm89* strains. Noticeably, the pro-inflammatory mediator production levels were all dependent on the strain *emm* type. The *emm1* type strains induced higher levels of IL-6 secretion than strains from any other *emm* type from T4 onward.

The amounts of secreted IL-6 were decreasing from *emm3*- to *emm28*-, *emm89*- and finally *emm4*-infected BMDMs, the latter yielding the lowest amount throughout time. A similar picture was obtained with TNF- $\alpha$  secretion, except that *emm3*-infected BMDMs secreted significantly less TNF- $\alpha$  than the *emm1* and *emm28*-infected BMDMs. The secreted IL-6 levels increased approximately three-fold and two- to three-fold in all infected BMDMs between T2 and T4, and T4 and T6, respectively, except with the *emm3* strain-infected BMDMs, where this was true only between T2 and T4. The secreted TNF- $\alpha$  levels slightly increased throughout time for all strains groups.

That *emm3* strain-infected BMDMs secreted immune modulators during the entire course of the experiment is counter-intuitive since the BMDMs had undergone apoptosis at T2. A hypothesis is that not all BMDMs were infected and non-infected BMDM could secrete immune modulators. The ratio of infected BMDMs was determined by flow cytometry using CFSE-labeled *emm1* and *emm3* strains and F4/80;PE-labeled BMDMs (Fig. 5A). Dot plots yielded double positive cells (CFSE and F4/80) with both *emm* types and indicated that only a fraction of the BMDMs were infected at T0, T1 and T2 (Fig. 5B and data not shown). The time course experiment (Fig. 5C) indicated that throughout time, the percentage of infected BMDM is approximately the same with GAS strains from both *emm* types, with at T0, 77.63 and 75.24 %; at T1, 85.45 and 83.30% and at T2, 91.47 and 84.19% for *emm1* and *emm3*, respectively. These results indicated that not all BMDMs were infected enabling the synthesis of immune modulators by non-compromised macrophages. These could be stimulated by the infected-BMDMs responses.

Analysis at the individual strain level indicated that *emm89* GAS throughout the experiment and the *emm1* at T2 yielded the less scattered values of all (Fig. S1, Table S3). Strains that were “high-producer”, compared to the mean value within their *emm* type, of one cytokine were not necessarily “high producer” of the other: there was no link between the relative levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  induced productions. No correlation existed between CFU counts and the induced production level of IL-6 and TNF- $\alpha$ , with one exception, M28 Inv6 (Table S2, Table S3). Strain M28 Inv6,

which was the only *emm28* strain to be cleared at T2, induced one of the lowest IL-6 and also TNF- $\alpha$  production. Finally, one strain, M1 NInv5, which was not cleared, elicited a lower production than all other *emm1* strains of both IL-6 and TNF-  $\alpha$  throughout the course of this experiment.

The ability of GAS *emm1* to induce IFN- $\beta$  production and the role in host protection as been recently reported [28,30]. We thus investigated IFN- $\beta$  production by BMDMs infected by the clinical isolates from our collection (Fig. 4). As with the pro-inflammatory cytokine production, the mean values of IFN- $\beta$  secretion elicited by invasive and non-invasive strains within each *emm* type were similar, with the exception at T6 of the *emm1*- and *emm3*- infected BMDMs; in both cases, the invasive strains elicited the highest production. The IFN- $\beta$  production kinetics differed depending on the *emm* type. The *emm89* strain-infected BMDMs had an early production of IFN- $\beta$ , which was the highest of all infected BMDMs at T2, which then decreased, whereas for all other strains the production was barely detectable before T4 or T6. From T4 onwards, the *emm1* type strains induced the highest production level.

Analysis at the individual strain level indicated (Fig. S1, Table S3) that the amount of IFN- $\beta$  induced by each strain, except the *emm89* strains, increased with time. In contrast the level of secreted IFN- $\beta$  decreased with all but one *emm89* strains. Again, the M28 Inv6 strain elicited one the lowest IFN- $\beta$  production throughout time.

The levels of pro-inflammatory cytokines and type I interferon produced is clearly dependent on the strain *emm* type but seldom dependent on the invasive status of the strains.

## DISCUSSION

The interaction between *S. pyogenes* and innate immune response has been studied *in vitro* and *in vivo* [10,11,25,26,37,38,39,40,41,42]. Whereas one analysis in human patients involved biopsies from 17 patients and strains from at least five *M* types, *in vitro* studies of phagocytosis by various immune cells, bacterial survival within these cells and immune mediators production as well as *in vivo* studies using mouse models have, most of the time, been carried out employing one strain from a given *emm* type. Genomic analysis of multiple strains have been carried out to link presence of genes and tissue tropism or disease severity, but no *in vitro* experiments were reported in these studies [9,23,24]. Our aim was to compare *in vitro* the early immune response elicited by multiple strains from many *emm* types and different invasiveness status.

The *emm* type had more influence on each of the characteristics we analyzed than the invasiveness status. A possible explanation is that they are correlated to the toxin profile. Indeed, the toxin profile of our strains showed high conservation within each *emm* type, and variation in between *emm* types. Similar results were obtained while studying the presence of 9 and 11 superantigens and 11 superantigens and different alleles of *speA*, in 87, 107 and 291 isolates, respectively [23,24,35]. In one study, no single superantigen could be associated to disease manifestation [24]. However, in that carried out on 291 clinical isolates (194 colonization and 97 from invasive strains), the *speA1-speA3* alleles, as well as the *speJ* gene were found more frequently in invasive than colonization strains [23]. Such is not the case in our present study; neither *speA* allele nor the presence of *speJ* could be linked to the clinical manifestation. The *emm*-typing is an extremely powerful epidemiological tool and the various types thus defined display, on average, different characteristics. GAS evolves through the acquisition of genetic material, mainly phages, (horizontal transfer) and recombination [16]. One hypothesis accounting for the restriction of the superantigen profile among different *emm* type is that the M proteins could selectively influence the entry of bacteriophages [35]. Yet, all strains from a given *emm* type are not identical. The variation we observed within each *emm* type

could be the consequence of other surface proteins influencing the genetic material acquisition. Interestingly, the strain variability, which occurred within *emm* types, for all the characteristics we assayed is independent of their invasiveness status.

The role of macrophages in GAS diseases is ambivalent. It kills the bacteria but it can also be used as a Trojan horse [26,27,43]. The first step which can be beneficial to the host when bacteria are lysed but can, in contrast, be beneficial to the bacteria when they survive intracellularly is phagocytosis. This is the only characteristic that depended both on the genetic background and the invasiveness status of the strains, within two *emm* types, namely *emm1* and *emm89*. In both cases, the invasive strains were more phagocytosed than the non-invasive strains. *emm1* invasive strains have been shown to persist and even multiply in the macrophages [27]; a more efficient phagocytosis may therefore enhance the invasion capacity. The *emm89* invasive strains were better phagocytosed than their non-invasive counterparts and than all the other invasive strains. All *emm89* strains also survived intracellularly better than all others, suggesting the use of the macrophage for persistence. It would be interesting to study whether *emm89* strains elicit particularly persistent or recurring GAS infections. Our observation suggests that they could be involved in antibiotic treatment failure.

Our results indicate that the *emm3*-type strains induced macrophage apoptosis very soon after infection; it was measurable as soon as two hours post infection, at a time point where the *emm1* control strain had not induced apoptosis. GAS-induced macrophage apoptosis has already been described with an *emm1* strain and SLO was shown to be responsible [44]. The mechanism by which the *emm3* strains induce apoptosis may be different since *covRS* wild-type or mutant strains in our collection, CovRS controlling the accumulation of SLO, displayed the same phenotype (data not shown). GAS also induces dendritic cell apoptosis, SpeB and SLO being involved [45]. However, SpeB may not be responsible for the fast macrophage apoptosis, since CovRS controls the expression of the *speB* gene. The mechanism involved in this fast apoptosis warrants further studies. Certain

virulence factors inhibit anti-apoptotic signaling pathways (for review, [46]). *emm3* strains may be actively synthesizing such factors in a CovRS-independent manner.

Among the non-*emm3* strains, bacterial survival was variable; the *emm89* strains, on the whole, survived better than strains from the other *emm* types. Survival or death of intracellular bacteria may be a consequence of the entry pathway [26]. The entry pathway, permitting GAS survival, and bacterial factor(s) promoting it are currently unknown. The M1 protein is involved in survival interfering with trafficking in the phagosomal-lysosomal pathway, which results in impaired fusion with lysosomal vesicles [27]; SLO, together with NAD-glycohydrolase, protect *S. pyogenes* from xenophagic killing [21]. The M89 protein may be more efficient than M1 in interfering with the phagosomal-lysosomal pathway. Alternatively, *emm89* strains may produce other factors that interfere through different pathways with intracellular survival. It will also be interesting to compare the mechanism involved in strains from poor survivor *emm* types that nonetheless survive to that of *emm89* strains, to determine whether the same bacterial factors are involved and whether more than one pathway exists. Interestingly, the *emm89* strains induced a more rapid secretion of IFN- $\beta$  as well as a weaker IL-6 and TNF- $\alpha$  than strains from all other *emm* types. The M89 protein could, like M1 but more efficiently, induce a suppression of inflammatory signals [27]. Alternatively, other factors present in these strains could synergize the M protein effect.

In our experiments, the survival property of the strains was not linked to the invasive status of the strains. *In vivo*, the recruitment of other phagocytic cells may interfere with invasion, acting on bacteria that escape from the macrophages. Indeed, non-invasive *emm3* strain-infected BMDMs secreted more IL-6 at early times than the invasive strain-infected ones, whereas invasive *emm89* strains induced a higher TNF- $\alpha$  production than their non-invasive counterparts throughout the experiment and, at a later time (T6), invasive *emm1* and *emm3* strains induced more IFN- $\beta$  secretion than the non-invasive strains. These differences may modulate phagocytic cell recruitment. No difference was observed with *emm4* and *emm28* strain-infected macrophages. Other non-assayed



cytokine may intervene or cascades induced in other phagocytic cells may have a more preeminent role. Another possibility is that invasive strains only have that status because of the host they were infecting. Studies demonstrated that the same streptococcal strain can cause infections with diverse severity in different individuals, emphasizing the influence of the host genetic factors in the outcome of infections [47,48].

Innate immune modulators were found in *emm3*-infected BMDMs supernatants, even at late time points (T6), although macrophages were compromised as soon as T2. However, not all BMDMs were infected, the non-infected ones could possibly secrete these modulators in response to signals initiating from infected BMDMs [49].

During the course of this work, we have detected atypical strains that persisted longer or disappeared faster than their counterparts from the same *emm* types. Our initial cytokine production study did not explain these differences. A thorough analysis of the innate-immune response elicited by these strains as well as of their *in vivo* properties in animal models, with the strains with mean survival values as controls, should yield information on the molecular mechanisms involved in *S. pyogenes* pathogenicity.

## **Acknowledgments**

We are grateful to Emanuelle Charpentier for the gift of the strain M1Inv1 and to Ilkaa I. Julkunen for the gift of anti-GAS antibodies.

## **Disclosures.**

The authors have no financial conflict of interest. C. Poyart has received reimbursement for attending meetings from, BioMerieux, Bio-Rad, Cepheid, Novartis, and has received research funding from Institut Merieux, Wyeth, Oxoid, Siemens.

## **Note**

**Financial support.** This work was supported by ERA Pathogenomic (Contract N° R08204KS3) INSERM, CNRS, Université Paris Descartes, Institut de Veille Sanitaire. M.D. was a recipient of a post-doctoral fellowship from ERA Pathogenomic (Grant N° ANR-08-MIEN-015).

## References

1. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M (2005) The global burden of group A streptococcal diseases. *The Lancet Infectious Diseases* 5: 685-694.
2. Olsen RJ, Shelburne SA, Musser JM (2009) Molecular mechanisms underlying group A streptococcal pathogenesis. *Cellular Microbiology* 11: 1-12.
3. Olsen RJ, Musser JM (2010) Molecular pathogenesis of necrotizing fasciitis. *Annu Rev Pathol* 5: 1-31.
4. Beall B, Facklam R, Thompson T (1996) Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 953-958.
5. Cole JN, Barnett TC, Nizet V, Walker MJ (2011) Molecular insight into invasive group A streptococcal disease. *Nat Rev Micro* 9: 724-736.
6. Steer AC, Law I, Matatolu L, Beall BW, Carapetis JR (2009) Global emm type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. *The Lancet Infectious Diseases* 9: 611-616.
7. Plainvert C, Doloy A, Loubinoux J, Lepoutre A, Collobert G, et al. (2011) Invasive group A streptococcal infections in adults, France (2006–2010). *Clinical Microbiology and Infection: no-no*.
8. O'Brien KL, Beall B, Barrett NL, Cieslak PR, Reingold A, et al. (2002) Epidemiology of invasive group a *Streptococcus* disease in the United States, 1995-1999. *Clin Infect Dis* 35: 268-276.
9. Bessen DE, Kumar N, Hall GS, Riley DR, Luo F, et al. (2011) Whole-Genome Association Study on Tissue Tropism Phenotypes in Group A Streptococcus. *Journal of Bacteriology* 193: 6651-6663.
10. Medina E, Goldmann O, Toppel AW, Chhatwal GS (2003) Survival of *Streptococcus pyogenes* within host phagocytic cells: a pathogenic mechanism for persistence and systemic invasion. *J Infect Dis* 187: 597-603.
11. Medina E, Rohde M, Chhatwal GS (2003) Intracellular survival of *Streptococcus pyogenes* in polymorphonuclear cells results in increased bacterial virulence. *Infect Immun* 71: 5376-5380.
12. Bisno AL, Brito MO, Collins CM (2003) Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect Dis* 3: 191-200.
13. Chhatwal GS, McMillan DJ (2005) Uncovering the mysteries of invasive streptococcal diseases. *Trends Mol Med* 11: 152-155.
14. Victor N (2007) Understanding how leading bacterial pathogens subvert innate immunity to reveal novel therapeutic targets. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120: 13-22.
15. Tart AH, Walker MJ, Musser JM (2007) New understanding of the group A Streptococcus pathogenesis cycle. *Trends Microbiol* 15: 318-325.
16. Smeesters PR, McMillan DJ, Sriprakash KS (2010) The streptococcal M protein: a highly versatile molecule. *Trends in Microbiology* 18: 275-282.
17. Gustafsson MCU, Lannergård J, Nilsson OR, Kristensen BM, Olsen JE, et al. (2013) Factor H Binds to the Hypervariable Region of Many *Streptococcus pyogenes* M Proteins but Does Not Promote Phagocytosis Resistance or Acute Virulence. *PLoS Pathog* 9: e1003323.
18. Stollerman GH, Dale JB (2008) The Importance of the Group A Streptococcus Capsule in the Pathogenesis of Human Infections: A Historical Perspective. *Clinical Infectious Diseases* 46: 1038-1045.
19. Kapur V, Topouzis S, Majesky MW, Li L-L, Hamrick MR, et al. (1993) A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microbial Pathogenesis* 15: 327-346.

20. Nelson Daniel C, Garbe J, Collin M (2011) Cysteine proteinase SpeB from *Streptococcus pyogenes* – a potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins. *Biological Chemistry*. pp. 1077.
21. O'Seaghda M, Wessels MR (2013) Streptolysin O and its Co-Toxin NAD-glycohydrolase Protect Group A *Streptococcus* from Xenophagic Killing. *PLoS Pathog* 9: e1003394.
22. Fraser JD, Proft T (2008) The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunological Reviews* 225: 226-243.
23. Lintges M, van der Linden M, Hilgers R-D, Arlt S, Al-Lahham A, et al. (2010) Superantigen Genes Are More Important than the emm Type for the Invasiveness of Group A *Streptococcus* Infection. *Journal of Infectious Diseases* 202: 20-28.
24. Rantala S, Vähäkuopus S, Siljander T, Vuopio J, Huhtala H, et al. (2012) *Streptococcus pyogenes* bacteraemia, emm types and superantigen profiles. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31: 859-865.
25. Goldmann O, Rohde M, Chhatwal GS, Medina E (2004) Role of Macrophages in Host Resistance to Group A Streptococci. *Infection and Immunity* 72: 2956-2963.
26. Thulin P, Johansson L, Low DE, Gan BS, Kotb M, et al. (2006) Viable Group A Streptococci in Macrophages during Acute Soft Tissue Infection. *PLoS Med* 3: e53.
27. Hertzén E, Johansson L, Wallin R, Schmidt H, Kroll M, et al. (2010) M1 Protein-Dependent Intracellular Trafficking Promotes Persistence and Replication of *Streptococcus pyogenes* in Macrophages. *Journal of Innate Immunity* 2: 534-545.
28. Gratz N, Siller M, Schaljo B, Pirzada ZA, Gattermeier I, et al. (2008) Group A Streptococcus Activates Type I Interferon Production and MyD88-dependent Signaling without Involvement of TLR2, TLR4, and TLR9. *Journal of Biological Chemistry* 283: 19879-19887.
29. Trinchieri G (2010) Type I interferon: friend or foe? *The Journal of Experimental Medicine* 207: 2053-2063.
30. Gratz N, Hartweger H, Matt U, Kratochvill F, Janos M, et al. (2011) Type I Interferon Production Induced by *Streptococcus pyogenes* Derived Nucleic Acids Is Required for Host Protection. *PLoS Pathog* 7: e1001345.
31. Medina E, Goldmann O, Rohde M, Lengeling A, Chhatwal GS (2001) Genetic control of susceptibility to group A streptococcal infection in mice. *J Infect Dis* 184: 846-852.
32. Kotb M, Norrby-Teglund A, McGeer A, El-Sherbini H, Dorak MT, et al. (2002) An immunogenetic and molecular basis for differences in outcomes of invasive group A streptococcal infections. *Nat Med* 8: 1398-1404.
33. Lintges M, Arlt S, Uciechowski P, Plümäkers B, Reinert RR, et al. (2007) A new closed-tube multiplex real-time PCR to detect eleven superantigens of *Streptococcus pyogenes* identifies a strain without superantigen activity. *International Journal of Medical Microbiology* 297: 471-478.
34. Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protocols* 3: 1125-1131.
35. Commons R, Rogers S, Gooding T, Danchin M, Carapetis J, et al. (2008) Superantigen genes in group A streptococcal isolates and their relationship with emm types. *J Med Microbiol* 57: 1238-1246.
36. Sriskandan S, Faulkner L, Hopkins P (2007) *Streptococcus pyogenes*: Insight into the function of the streptococcal superantigens. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 12-19.
37. Dinkla K, Sastalla I, Godehardt AW, Janze N, Chhatwal GS, et al. (2007) Upregulation of capsule enables *Streptococcus pyogenes* to evade immune recognition by antigen-specific antibodies directed to the G-related alpha2-macroglobulin-binding protein GRAB located on the bacterial surface. *Microbes Infect* 9: 922-931.

38. Goldmann O, Lehne S, Medina E (2010) Age-related susceptibility to *Streptococcus pyogenes* infection in mice: underlying immune dysfunction and strategy to enhance immunity. *J Pathol* 220: 521-529.
39. Goldmann O, Sastalla I, Wos-Oxley M, Rohde M, Medina E (2009) *Streptococcus pyogenes* induces oncosis in macrophages through the activation of an inflammatory programmed cell death pathway. *Cell Microbiol* 11: 138-155.
40. Loof TG, Goldmann O, Medina E (2008) Immune Recognition of *Streptococcus pyogenes* by Dendritic Cells. *Infection and Immunity* 76: 2785-2792.
41. Loof TG, Rohde M, Chhatwal GS, Jung S, Medina E (2007) The Contribution of Dendritic Cells to Host Defenses against *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Infectious Diseases* 196: 1794-1803.
42. Medina E, Anders D, Chhatwal GS (2002) Induction of NF-kappaB nuclear translocation in human respiratory epithelial cells by group A streptococci. *Microb Pathog* 33: 307-313.
43. Goldmann O, Chhatwal GS, Medina E (2004) Role of host genetic factors in susceptibility to group A streptococcal infections. *Indian J Med Res* 119 Suppl: 141-143.
44. Timmer AM, Timmer JC, Pence MA, Hsu L-C, Ghochani M, et al. (2009) Streptolysin O Promotes Group A *Streptococcus* Immune Evasion by Accelerated Macrophage Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 284: 862-871.
45. Cortés G, Wessels MR (2009) Inhibition of Dendritic Cell Maturation by Group A *Streptococcus*. *Journal of Infectious Diseases* 200: 1152-1161.
46. Rosenberger CM, Finlay BB (2003) Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 385-396.
47. Medina E, Lengeling A (2005) Genetic regulation of host responses to group A streptococcus in mice. *Brief Funct Genomic Proteomic* 4: 248-257.
48. Norrby-Teglund A, Chatellier S, Low DE, McGeer A, Green K, et al. (2000) Host variation in cytokine responses to superantigens determine the severity of invasive group A streptococcal infection. *European Journal of Immunology* 30: 3247-3255.
49. Lacy P, Stow JL (2011) Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood* 118: 9-18.

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1.** Phagocytosis and survival of GAS clinical isolates in BMDMs. Cells were infected with GAS as described in Material and Methods. **(A)** Percentage of phagocytosis of invasive (black symbols) and non-invasive (white symbols) GAS strains of different *emm* types. The results are expressed as the percentage of bacterial CFUs recovered after 30 min post-antibiotics treatment relative to the initial inoculum. **(B)** Bacterial survival experiments were carried out as described in the Material and Methods and expressed as the log<sub>10</sub> of the CFUs/mL of culture. The results represent the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments, with significance levels indicated between given strains from the same *emm* type or inbetween *emm* types for the phagocytosis experiments and in comparison with the *emm1* strains for the survival assays (\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.005$ ).

**FIGURE 2.** Fluorescent confocal microscopy of BMDMs infected (MOI 100) with CFSE- stained M1 or M3 GAS strains (green). After one hour post-infection, cells were fixed and the extracellular bacteria were labeled with anti-GAS antibodies (GAR) (red). F-actin was labeled with  $\beta$ -phalloidin (blue). **(A)** Confocal microscopy images of BMDMs infected with M1 (upper panel) and M3 (lower panel) strains **(B)** Zoomed images of the white frame areas of Fig. 3A, successive planes (z) are represented, and 3D reconstruction (right image). Green and red arrows indicate intra- and extracellular bacteria, respectively.

**FIGURE 3.** *emm3* strains compromise macrophages. **(A)** BMDMs are permabilized by *emm3* GAS. Cells were infected with GAS as described and after washing, either medium with antibiotics (ATB) (black) or medium alone (dash) was added to cells. M1 Inv is represented in black, M3 Inv in dark grey and M3 NInv in light grey. The results represent the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments. **(B)** BMDMS viability is altered by *emm3* strains. The BMDMs were infected using MOI=100 for 30

min at 37°C; afterwards cells were washed and incubated with medium plus antibiotics. At each time point the neutral red medium was added, and after 2 h incubation at 37°C the plates were washed and the dye was extracted with acidified ethanol solution. A decrease in color was evident and quantified at 540 nm. The percentage of viable cells was calculated, the mean value from wells without cells was subtracted from the other wells, and the values of treated cultures were referred to control uninfected cultures. Values represent the mean  $\pm$  SD of percentage of NR uptake at different time points of two wells per treatment and correspond to one representative experiment of three independent experiments. (C) *emm3* GAS induce macrophages apoptosis. Cells were infected as described, or left untreated [medium (M), negative control], or treated with 10 (S10) or 50 (S50)  $\mu$ M of staurosporin (positive control) for 2 hours. Afterwards, cells were fixed and stained for apoptosis using the DeadEnd Fluorometric TUNEL System (black bars, right axis) and DAPI (white bars, left axis) for nucleus staining and total number of cells quantification.

**FIGURE 4.** GAS clinical isolates induced pro-inflammatory mediator and IFN- $\beta$  secretion by infected BMDMs. Graphics represent IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\beta$  quantification in the cell culture supernatant at T2h (A), T4h (B) and T6h (C) after infection by the different *emm* type strains. The mean values immune mediator productions induced by all (black bars), all invasive (grey bars) and all non-invasive (white bars) of each *emm* type are shown. The results represent the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments; with significance levels indicated between *emm1* and other *emm* types by stars above the corresponding black bar and within *emm* types by stars above a line overlapping the corresponding grey and white bars (\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.005$ ).

**FIGURE 5** Not all BMDMs are infected. The percentage of infected macrophages was detected by flow cytometry analysis. (A) Typical example of dot plots, showing macrophages expressing cell surface marker F4/80 (PE) infected by CFSE labeled bacteria. BMDMs were uninfected and treated

with medium (Medium) or infected during 1 hour with M1 Inv1 and M1 Inv3 strains, respectively. Numbers inside the dot plots indicate the mean values of the percentage of infected cells (CFSE<sup>+</sup> and F4/80<sup>+</sup> cells) among the total number of BMDMs (F4/80<sup>+</sup> cells) determined on three wells per experimental conditions. **(B)** Percentage of infected cells (CFSE and F4/80 double positive cells) vs total BMDMs (F4/80 positive cells) infected with M1 Inv1 (grey bars) or M3 Inv3 (black bars) strains at different time points, T0, T1 or T2 hours, after infection. Results shown indicate the mean value  $\pm$  SD of three wells per treatment and correspond to one representative of two independent experiments.

**FIGURE S1** GAS clinical isolates induced pro-inflammatory mediator and IFN- $\beta$  secretion by infected BMDMs. Graphics represent IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\beta$  quantification in the cell culture supernatant at T2h **(A)**, T4h **(B)** and T6h **(C)** after infection by the different *emm* type strains. Each strain is represented, the invasive ones by filled circles and the non-invasive ones by open triangles. The results represent the mean of 3 independent experiments.



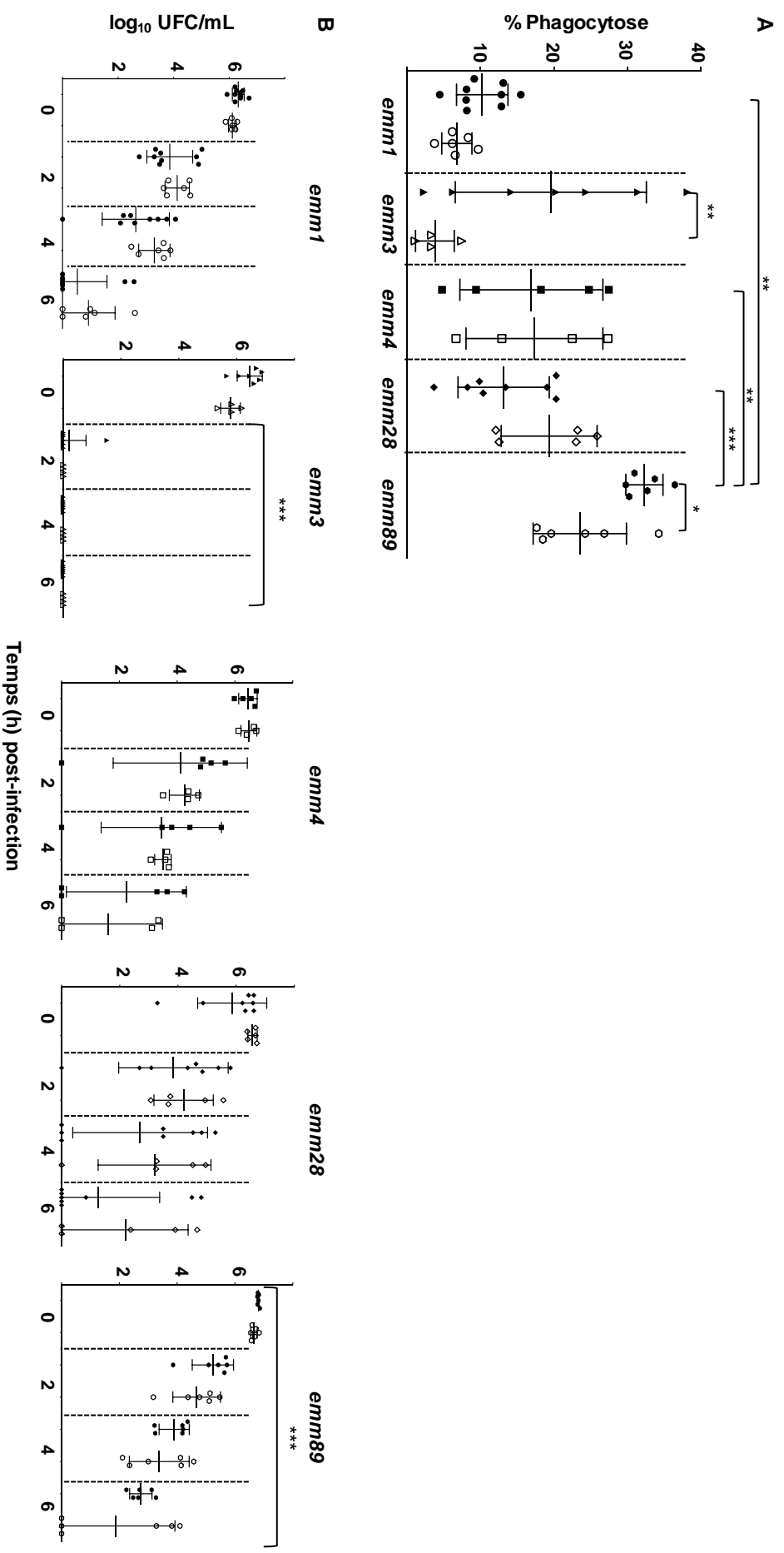
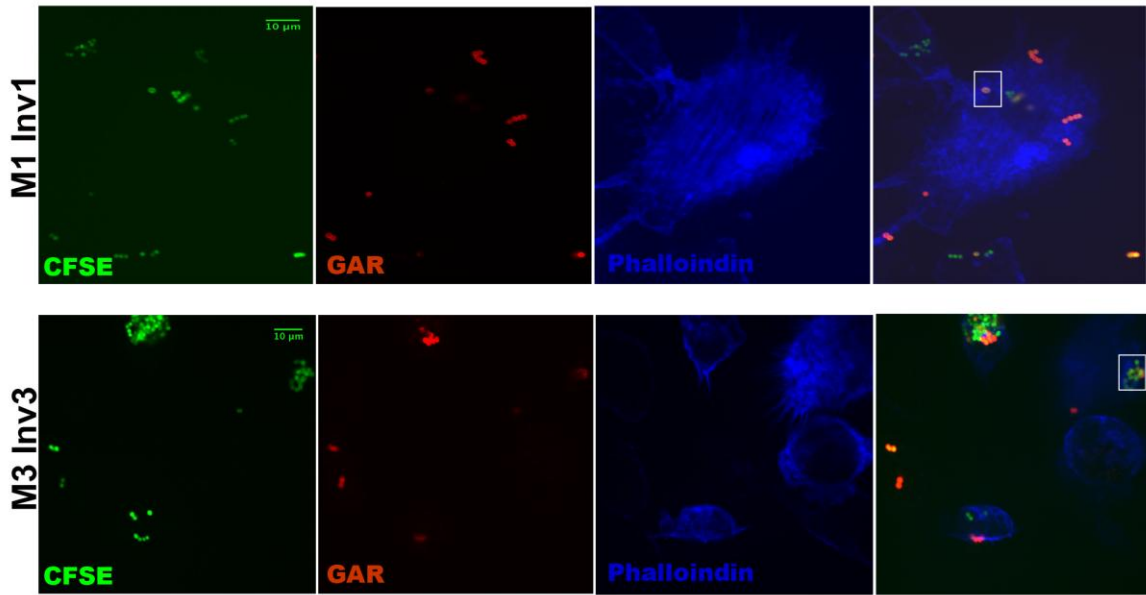
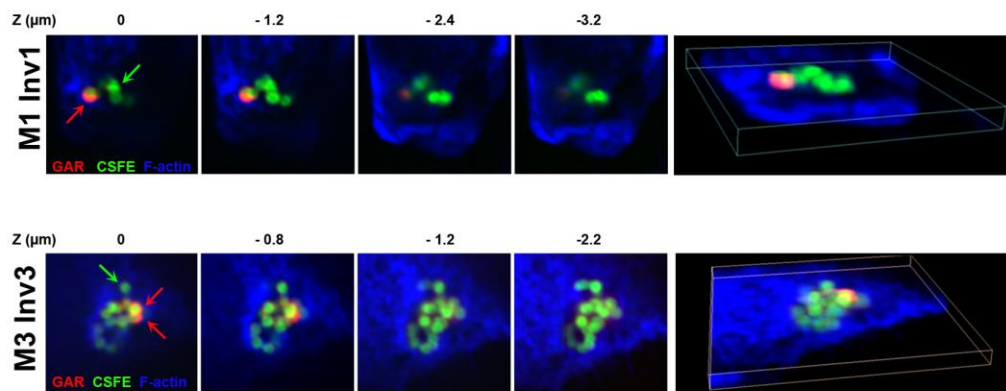


Figure 1

**A****B****Figure 2**

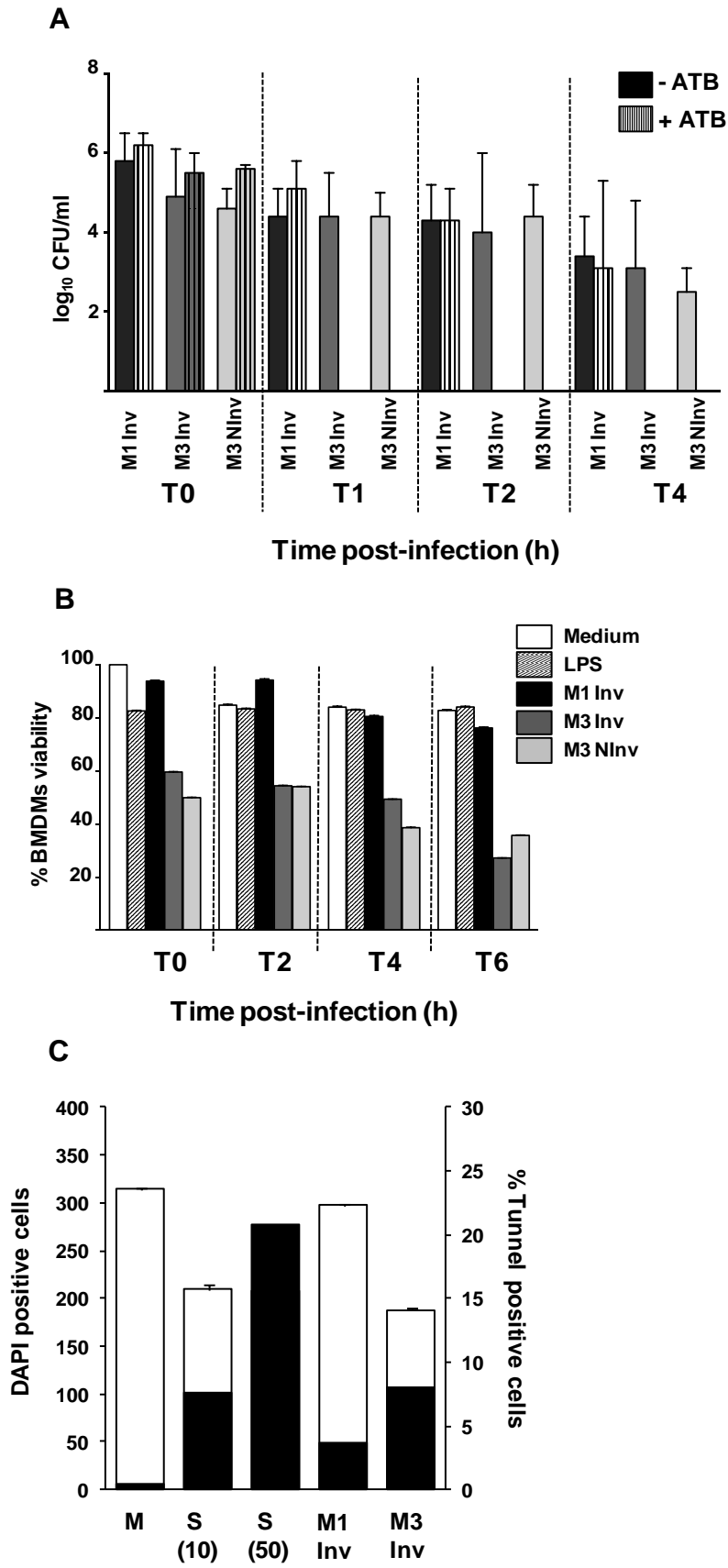


Figure 3

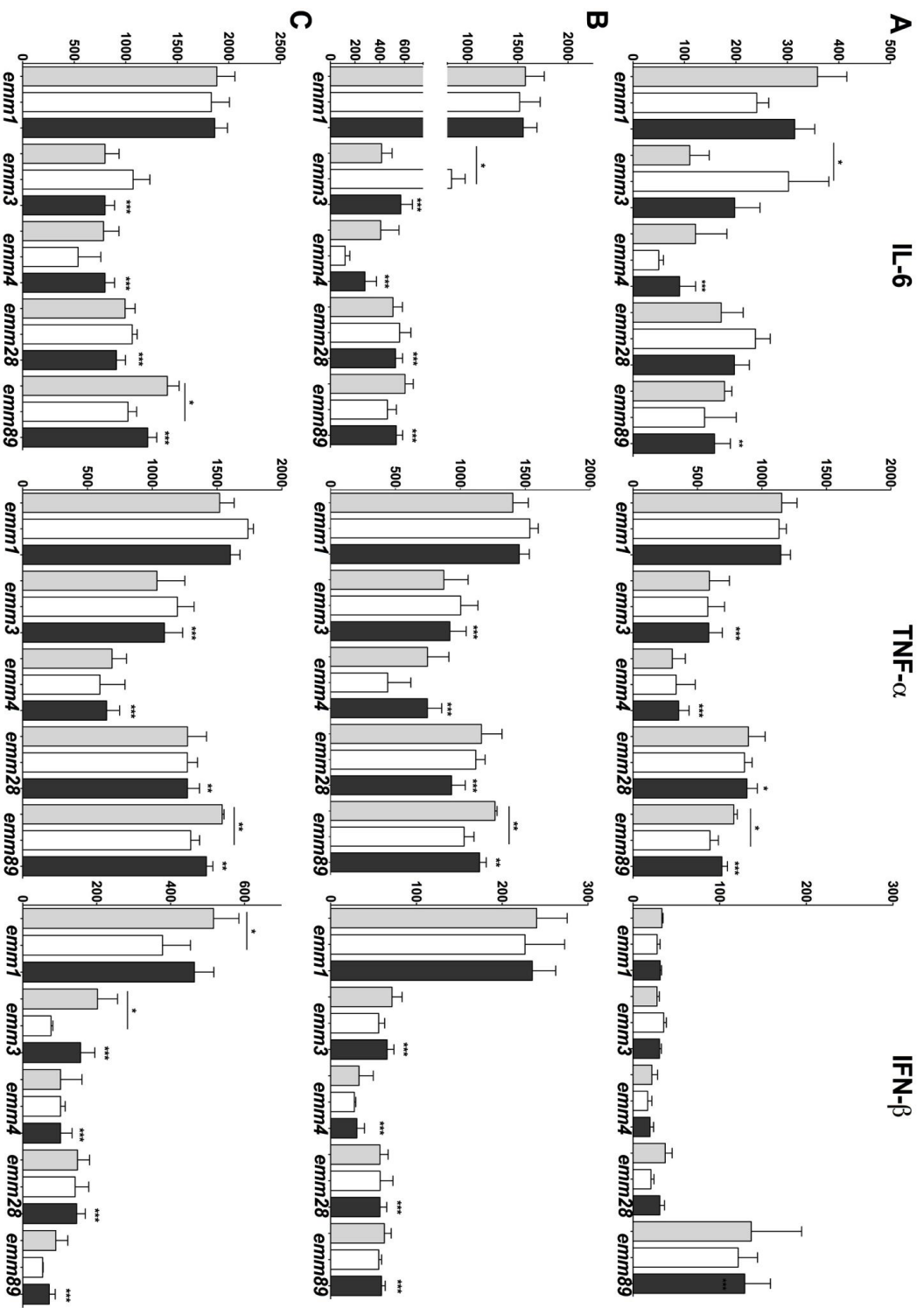


Figure 4

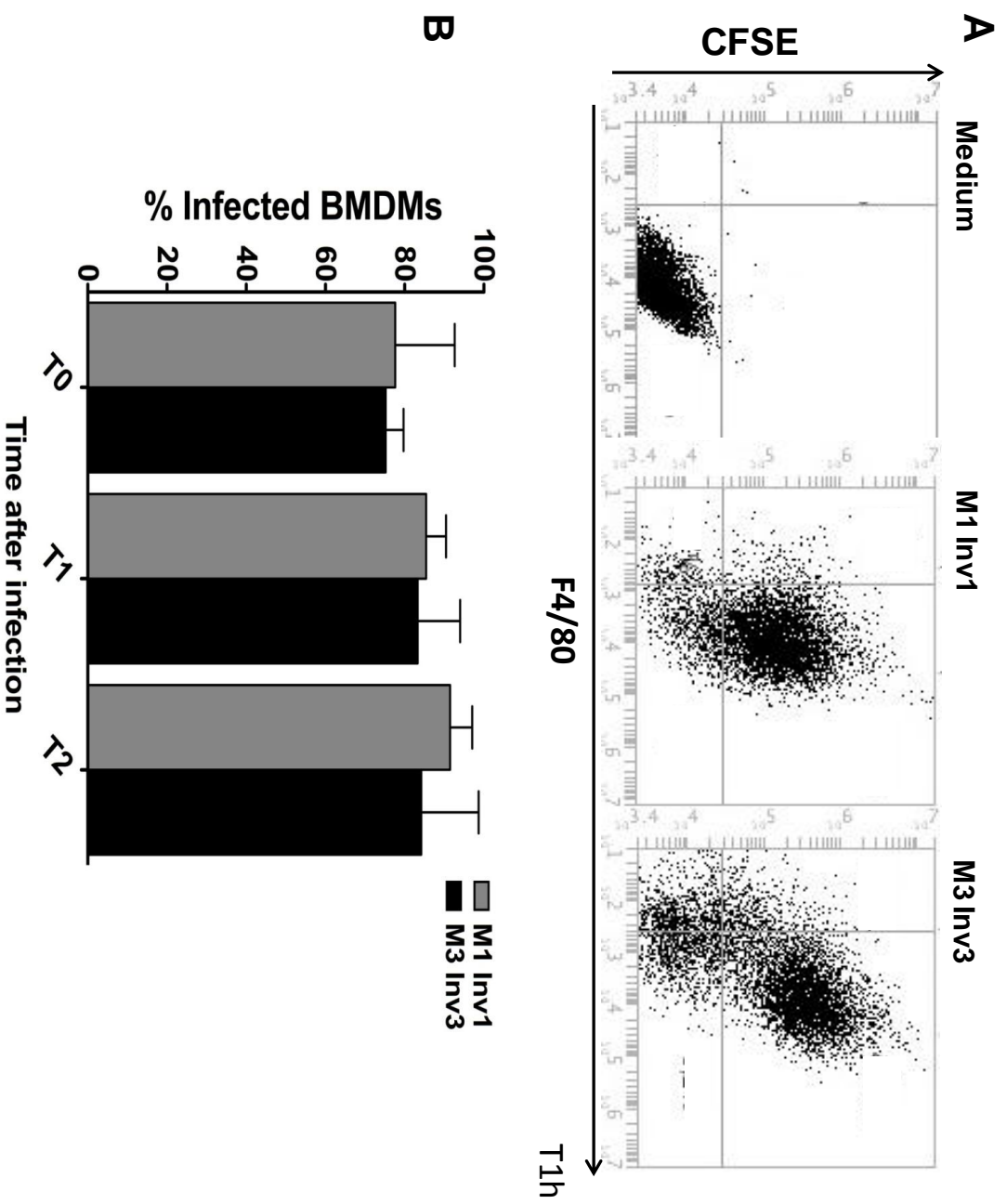


Figure 5

**Table S1** – Strain collection

<b>Reference number</b>	<b><i>emm</i> type</b>	<b>Strain<sup>a</sup></b>	<b>Diagnostic<sup>b</sup></b>	<b>Toxin genes</b>
EC700 <sup>c</sup>	<i>emm1</i>	M1 Inv1	Infected wound	<i>speB, speC, speJ</i>
20030096	<i>emm1</i>	M1 Inv2	NF+STSS	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20030192	<i>emm1</i>	M1 Inv3	NF+STSS	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20040420	<i>emm1</i>	M1 Inv4	STSS	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20040427	<i>emm1</i>	M1 Inv5	NF	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20040562	<i>emm1</i>	M1 Inv6	NF+STSS	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20050062	<i>emm1</i>	M1 Inv7	NF+STSS	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20070592	<i>emm1</i>	M1 Inv8	NF+STSS	<i>speA1-3, speB, speC, speJ</i>
20070779	<i>emm1</i>	M1 Inv9	NF+STSS	<i>speA1-3, speB, speC, speJ</i>
20070902	<i>emm1</i>	M1 Inv10	Bacteremia +STSS	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20040036	<i>emm1</i>	M1 NInv1	Pharyngeal carrier	<i>speA5, speB, speJ</i>
20050138	<i>emm1</i>	M1 NInv2	Pharyngeal carrier	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20050374	<i>emm1</i>	M1 NInv3	Pharyngeal carrier	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20070445	<i>emm1</i>	M1 NInv4	Vaginal colonization	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20080126	<i>emm1</i>	M1 NInv5	Pharyngeal carrier	<i>speA1-3, speB, speC, speJ</i>
20080415	<i>emm1</i>	M1 NInv6	Pharyngeal carrier	<i>speA1-3, speB, speJ</i>
20030233	<i>emm3</i>	M3 Inv1	NF+ STSS	<i>speA1-3, speB, ssa</i>
20040357	<i>emm3</i>	M3 Inv2	NF+STSS	<i>speA4, speB, ssa</i>
20040439	<i>emm3</i>	M3 Inv3	Septic arthritis+STSS	<i>speA1-3, speB, ssa</i>
20050264	<i>emm3</i>	M3 Inv4	Bacteremia+STSS	<i>speA1-3, speB, ssa</i>
20060065	<i>emm3</i>	M3 Inv5	Septic arthritis+STSS	<i>speA1-3, speB, ssa</i>
20070945	<i>emm3</i>	M3 Inv6	NF+STSS	<i>speA1-3, speB, ssa</i>
20080115	<i>emm3</i>	M3 Inv7	Pleuro-pneumopathy+STSS	<i>speA1-3, speB, ssa</i>
20040252	<i>emm3</i>	M3 NInv1	Scarlet fever	<i>speA1-3, speB, ssa</i>

<b>Reference number</b>	<b><i>emm</i> type</b>	<b>Strain<sup>a</sup></b>	<b>Diagnostic<sup>b</sup></b>	<b>Toxin genes</b>
20040261	<i>emm3</i>	M3 NInv2	Nasal carrier	<i>speA4, speB, ssa</i>
20040325	<i>emm3</i>	M3 NInv3	Scarlet fever	<i>speA4, speB, ssa</i>
20050045	<i>emm3</i>	M3 NInv4	Colonization	<i>speA1-3, speB, ssa</i>
20030145	<i>emm4</i>	M4 Inv1	NF+STSS	<i>speB, speC, ssa</i>
20050105	<i>emm4</i>	M4 Inv2	NF+STSS	<i>speB, speC, ssa</i>
20060307	<i>emm4</i>	M4 Inv3	Bacteremia+STSS	<i>speB, ssa</i>
20070799	<i>emm4</i>	M4 Inv4	NF+STSS	<i>speB, speC, ssa</i>
20080507	<i>emm4</i>	M4 Inv5	Septic arthritis	<i>speB, speC, ssa</i>
20040260	<i>emm4</i>	M4 NInv1	Pharyngeal carrier	<i>speB, ssa</i>
20050050	<i>emm4</i>	M4 NInv12	Pharyngeal carrier	<i>speB, ssa</i>
20050478	<i>emm4</i>	M4 NInv3	Pharyngeal carrier	<i>speB, speC, ssa</i>
20070934	<i>emm4</i>	M4 NInv4	Pharyngeal carrier	<i>speB, speC, ssa</i>
20060057	<i>emm28</i>	M28 Inv1	Arthritis+STSS	<i>speB, speC</i>
20060831	<i>emm28</i>	M28 Inv2	NF+STSS	<i>speB, speC</i>
20070586	<i>emm28</i>	M28 Inv3	Bacteremia	<i>speB, speC</i>
20070662	<i>emm28</i>	M28 Inv4	Bacteremia	<i>speB, speC, speJ</i>
20070748	<i>emm28</i>	M28 Inv5	Pleuro-pneumopathology	<i>speB, speC, speJ</i>
20070963	<i>emm28</i>	M28 Inv6	NF+STSS	<i>speB, speC, speJ</i>
20071009	<i>emm28</i>	M28 Inv7	NF+STSS	<i>speB, speC, speJ</i>
20080319	<i>emm28</i>	M28 Inv8	NF+STSS	<i>speB, speC</i>
20040035	<i>emm28,3</i>	M28 NInv1	Pharyngitis	<i>speB, speC</i>
20040037	<i>emm28</i>	M28 NInv2	Conjunctivitis	<i>speB, speC</i>
20060811	<i>emm28</i>	M28 NInv3	Colonization	<i>speB, speC</i>
20080184	<i>emm28</i>	M28 NInv4	Pharyngeal carrier	<i>speB, speC, speJ</i>
20080408	<i>emm28</i>	M28 NInv5	Colonization	<i>speB, speC, speJ</i>

<b>Reference number</b>	<b><i>emm</i> type</b>	<b>Strain<sup>a</sup></b>	<b>Diagnostic<sup>b</sup></b>	<b>Toxin genes</b>
20030451	<i>emm89</i>	M89 Inv1	NF+STSS	<i>speB, speC</i>
20050003	<i>emm89</i>	M89 Inv2	NF+Endocarditis	<i>speB</i>
20060051	<i>emm89</i>	M89 Inv3	NF	<i>speB, speC</i>
20070057	<i>emm89</i>	M89 Inv4	NF+STSS	<i>speB, speC</i>
20070249	<i>emm89</i>	M89 Inv5	NF+STSS	<i>speB</i>
20070884	<i>emm89</i>	M89 Inv6	NF+STSS	<i>speB, speC</i>
20070937	<i>emm89</i>	M89 NInv1	Pharyngeal carrier	<i>speB, speC</i>
20080105	<i>emm89</i>	M89 NInv2	Superinfection	<i>speB</i>
20080199	<i>emm89</i>	M89 NInv3	Superinfection	<i>speB, speC</i>
20080274	<i>emm89</i>	M89 NInv4	Pharyngeal carrier	<i>speB, speC</i>
20080311	<i>emm89</i>	M89 NInv5	Pharyngeal carrier	<i>speB, speC</i>
20080412	<i>emm89</i>	M89 NInv6	Pharyngeal carrier	<i>speB, speC</i>

<sup>a</sup> Invasive (Inv); Non-invasive (NInv)

<sup>b</sup> Necrotizing fasciitis (NF); Streptococcal Toxic Shock Syndrome (STSS)

<sup>c</sup> obtained from E. Charpentier



**Table S2** – Phagocytosis and intracellular survival

<b>Strain</b>	<b>Log cfus/ mL</b>			
	<b>T0</b>	<b>T2</b>	<b>T4</b>	<b>T6</b>
<b>M1 Inv1</b>	6.716	5.483	4.149	2.122
<b>M1 Inv2</b>	6.262	3.302	2.452	0.000
<b>M1 Inv3</b>	6.491	4.823	3.755	2.575
<b>M1 Inv4</b>	6.410	3.495	3.438	0.000
<b>M1 Inv5</b>	6.419	5.019	4.069	2.245
<b>M1 Inv6</b>	6.210	3.349	3.145	0.000
<b>M1 Inv7</b>	6.411	2.763	2.088	0.000
<b>M1 Inv8</b>	5.924	3.534	0.000	0.000
<b>M1 Inv9</b>	6.212	4.896	2.600	0.000
<b>M1 Inv10</b>	6.208	3.567	2.191	0.000
<b>M1 NInv1</b>	6.288	4.375	3.885	2.605
<b>M1 NInv2</b>	6.091	4.602	3.637	1.000
<b>M1 NInv3</b>	6.222	4.575	3.649	0.000
<b>M1 NInv4</b>	5.873	3.759	3.452	0.000
<b>M1 NInv5</b>	6.117	3.645	2.739	0.837
<b>M1 NInv6</b>	6.091	3.808	2.477	1.159
<b>M3 Inv1</b>	6.688	0.000	0.000	0.000
<b>M3 Inv2</b>	5.663	0.000	0.000	0.000
<b>M3 Inv3</b>	6.096	1.516	0.000	0.000
<b>M3 Inv4</b>	6.608	0.000	0.000	0.000
<b>M3 Inv5</b>	6.883	0.000	0.000	0.000
<b>M3 Inv6</b>	6.453	0.000	0.000	0.000
<b>M3 Inv7</b>	6.799	0.000	0.000	0.000
<b>M3 NInv1</b>	5.343	0.000	0.000	0.000
<b>M3 NInv2</b>	5.822	0.000	0.000	0.000

<b>Log cfus/ mL</b>				
<b>Strain</b>	<b>T0</b>	<b>T2</b>	<b>T4</b>	<b>T6</b>
<b>M3 NInv3</b>	5.823	0.000	0.000	0.000
<b>M3 NInv4</b>	6.172	0.000	0.000	0.000
<b>M4 Inv1</b>	6.562	5.665	5.528	4.253
<b>M4 Inv2</b>	5.979	0.000	0.000	0.000
<b>M4 Inv3</b>	6.274	4.810	3.477	0.000
<b>M4 Inv4</b>	6.695	5.176	4.439	3.653
<b>M4 Inv5</b>	6.740	4.889	3.813	3.301
<b>M4 NInv1</b>	6.412	4.370	3.588	0.000
<b>M4 NInv2</b>	6.125	3.511	3.088	0.000
<b>M4 NInv3</b>	6.738	4.732	3.710	3.128
<b>M4 NInv4</b>	6.653	4.389	3.647	3.349
<b>M28 Inv1</b>	6.217	4.335	3.493	0.000
<b>M28 Inv2</b>	6.581	4.842	3.492	0.000
<b>M28 Inv3</b>	6.609	5.391	4.815	4.481
<b>M28 Inv4</b>	4.864	4.620	4.518	0.837
<b>M28 Inv5</b>	6.609	5.804	5.288	4.802
<b>M28 Inv6</b>	3.295	0.000	0.000	0.000
<b>M28 Inv7</b>	6.317	2.679	0.000	0.000
<b>M28 Inv8</b>	6.429	3.085	0.000	0.000
<b>M28 NInv1</b>	6.663	5.562	4.953	4.661
<b>M28 NInv2</b>	6.399	4.933	4.511	3.908
<b>M28 NInv3</b>	6.383	3.069	0.000	0.000
<b>M28 NInv4</b>	6.667	3.737	3.248	0.000
<b>M28 NInv5</b>	6.714	3.671	3.268	2.374
<b>M89 Inv1</b>	6.829	5.724	4.183	3.267
<b>M89 Inv2</b>	6.782	5.637	4.181	3.118

---

<b>Log cfus/ mL</b>				
<b>Strain</b>	<b>T0</b>	<b>T2</b>	<b>T4</b>	<b>T6</b>
<b>M89 Inv3</b>	6.816	5.423	4.204	2.653
<b>M89 Inv4</b>	6.775	5.090	4.362	2.699
<b>M89 Inv5</b>	6.792	3.860	3.243	2.243
<b>M89 Inv6</b>	6.863	5.686	3.217	2.477
<b>M89 NInv1</b>	6.568	5.111	2.352	0.000
<b>M89 NInv2</b>	6.548	5.478	4.115	3.814
<b>M89 NInv3</b>	6.730	5.138	4.574	4.097
<b>M89 NInv4</b>	6.594	4.774	4.138	3.279
<b>M89 NInv5</b>	6.686	3.176	2.109	0.000
<b>M89 NInv6</b>	6.836	4.376	3.000	0.000

---

**Table S3** – Innate immune modulators production in the BMDDMs cultures.

Strain	BMDDMs supernatants cytokines (pg/ mL)								
	T2			T4			T6		
	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\beta$
M1 Inv1	463.773	1480.000	30.000	1800.000	1730.000	200.000	2220.000	1715.000	500.000
M1 Inv2	560.000	1510.000	40.000	1978.462	1680.000	340.652	2400.000	1700.000	806.257
M1 Inv3	516.039	1000.000	30.000	1603.444	1200.000	200.000	1998.562	1300.000	500.000
M1 Inv4	400.000	1300.000	30.000	2100.000	1600.000	400.000	2200.000	1650.000	800.000
M1 Inv5	56.576	258.486	35.404	155.734	448.542	57.218	466.506	589.958	168.205
M1 Inv6	502.821	1445.500	36.686	1969.282	1619.241	404.852	2154.641	1650.000	753.257
M1 Inv7	458.115	1389.167	40.000	2055.769	1545.417	250.000	2165.000	1612.500	500.000
M1 Inv8	122.308	976.464	31.968	1031.538	1434.573	220.738	1587.308	1794.641	342.533
M1 Inv9	161.859	1041.068	30.429	1478.248	1286.230	128.359	1842.821	1499.974	291.601
M1 Inv10	343.090	1142.130	30.000	1579.872	1506.315	200.000	1800.000	1688.000	500.000
M1 NInv1	240.880	952.713	15.000	1648.516	1300.000	427.881	2000.000	1700.000	696.881
M1 NInv2	330.000	1340.000	30.000	1962.115	1700.000	200.000	2276.346	1750.000	375.000

Strain	T2			T4			T6		
	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\beta$
M1 NInv3	190.000	1000.000	27.500	2000.000	1700.000	250.000	2100.000	1850.000	381.000
M1 NInv4	275.385	1158.472	27.000	1700.000	1588.333	200.000	1950.000	1850.000	350.000
M1 NInv5	177.788	1147.762	27.168	805.842	1500.000	200.000	1100.000	1700.000	350.000
M1 NInv6	230.000	1200.000	41.000	1000.000	1423.321	82.000	1555.481	1582.885	115.873
M3 Inv1	80.372	209.220	38.873	555.349	745.363	50.945	800.778	994.444	60.000
M3 Inv2	72.200	934.652	19.392	468.846	1400.937	84.392	1061.200	1593.333	225.988
M3 Inv3	290.975	1058.943	27.196	756.653	1297.265	70.249	1044.574	1535.084	216.500
M3 Inv4	93.567	935.667	29.233	436.667	1283.333	103.333	960.000	1550.000	260.000
M3 Inv5	27.067	34.064	23.397	50.628	84.171	11.572	117.447	151.948	17.082
M3 Inv6	98.616	695.675	22.532	386.330	879.780	88.555	1089.054	960.473	456.436
M3 Inv7	143.353	279.413	34.070	251.877	419.076	91.286	520.229	472.444	178.749
M3 NInv1	392.135	665.487	39.872	888.834	913.209	74.323	972.222	1050.000	90.000
M3 NInv2	405.739	639.092	40.921	1131.431	1167.898	58.624	1341.111	1288.889	77.478
M3 NInv3	87.572	208.399	28.356	474.983	670.298	48.853	653.600	928.778	68.756
M3 NInv4	482.841	811.681	32.724	873.928	1259.281	41.960	1319.244	1507.789	69.056

Strain	T2			T4			T6		
	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\beta$
M4 Inv1	86.300	558.100	47.000	312.100	658.000	99.700	1000.000	688.000	330.000
M4 Inv2	28.100	110.000	23.000	124.000	253.000	16.000	287.700	474.000	30.500
M4 Inv3	33.500	388.700	13.380	154.200	612.400	16.000	582.300	681.800	40.700
M4 Inv4	100.700	439.000	12.000	526.400	1000.000	14.500	1000.000	1100.000	86.200
M4 Inv5	359.300	30.500	14.000	924.000	1207.000	19.000	1050.000	505.000	24.000
M4 NInv1	69.400	701.700	25.000	212.000	894.700	28.000	1120.000	1014.000	120.000
M4 NInv2	55.200	195.600	23.800	141.500	397.600	29.000	512.600	566.800	127.000
M4 NInv3	25.300	16.000	15.000	28.400	30.700	30.700	49.700	87.200	85.000
M4 NInv4	50.800	425.400	4.420	97.100	440.000	22.900	469.400	718.000	77.310
M28 Inv1	96.580	980.488	70.000	656.255	1423.235	83.400	1196.832	1517.895	105.870
M28 Inv2	57.729	1134.743	68.305	364.567	1408.484	80.976	1102.841	1516.232	150.024
M28 Inv3	258.110	501.902	48.425	617.549	600.871	95.639	741.671	628.758	165.497
M28 Inv4	371.721	1049.642	28.837	714.402	1212.459	46.255	1113.933	1316.709	101.851
M28 Inv5	300.000	829.812	27.317	764.076	1282.839	36.392	1111.097	1353.679	104.291
M28 Inv6	89.500	248.064	20.841	167.147	337.064	22.641	410.023	616.864	28.498

Strain	T2			T4			T6		
	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\beta$
M28 Inv7	72.400	1006.740	11.000	289.833	1507.982	30.000	1116.267	1613.614	185.000
M28 Inv8	126.300	1413.246	23.505	486.500	1532.263	64.000	1158.000	1616.725	343.400
M28 NInv1	200.361	976.139	11.952	249.377	1070.542	30.405	976.837	1215.792	185.071
M28 NInv2	234.664	1006.723	15.400	802.364	1300.573	92.200	1035.928	1408.879	238.600
M28 NInv3	252.970	802.853	18.767	543.420	896.410	96.263	1001.900	1000.000	172.400
M28 NInv4	336.721	858.539	29.558	655.200	1241.042	36.827	1250.604	1430.389	55.754
M28 NInv5	165.048	685.412	28.205	553.685	1089.009	32.935	1049.706	1301.359	56.534
M89 Inv1	200.945	865.863	119.7	484.427	1278.631	67.532	1000.000	1580.908	62.427
M89 Inv2	140.767	748.131	71.2	458.690	1201.492	46.439	1264.185	1505.158	47.550
M89 Inv3	191.275	768.158	422.9	472.014	1268.186	51.967	1566.104	1569.325	51.700
M89 Inv4	215.096	865.853	85.7	863.455	1312.236	100.000	1453.096	1546.703	250.000
M89 Inv5	191.202	742.464	48.5	702.529	1297.686	54.730	1819.642	1544.381	61.870
M89 Inv6	128.779	700.992	71.6	651.066	1243.631	55.028	1313.339	1489.431	62.857
M89 NInv1	94.596	689.575	57.5	388.233	1128.770	52.201	1324.079	1534.047	54.464
M89 NInv2	443.488	615.816	193.6	667.645	1113.165	54.387	1075.684	1412.018	53.239

Strain	T2			T4			T6		
	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\beta$
M89 NInv3	88.898	538.581	104.1	483.389	874.326	69.569	901.901	1196.557	58.945
M89 NInv4	52.009	569.481	69.9	566.674	1143.581	53.872	972.701	1321.280	52.046
M89 NInv5	43.920	346.908	172.3	150.244	724.975	44.656	729.600	1053.047	49.723
M89 NInv6	110.797	826.015	131.2	517.517	1191.065	61.323	1130.425	1264.542	54.151



## **Article III**

---

Céline Plainvert, Márcia Dinis, Anne Bouvet, Emanuel Hanski, Agnès Fouet, Claire Poyart

*Résultats non publiés, article en cours de soumission*

1 Presence of the *sil* locus is correlated to the genetic background but not to the  
2 invasive status of *Streptococcus pyogenes* clinical strains

3

4 Céline Plainvert<sup>a,b,c,d</sup>, Marcia Dinis<sup>a,b,c</sup>, Anne Bouvet<sup>c,d</sup>, Emanuel Hanski<sup>e</sup>, Agnès Fouet<sup>a,b,c,#</sup>,  
5 Claire Poyart<sup>a,b,c,d,#</sup>

6 <sup>a</sup> INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France

7 <sup>b</sup> CNRS (UMR 8104), Paris, France

8 <sup>c</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

9 <sup>d</sup> Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Service de Bactériologie, Centre National de Référence  
10 des Streptocoques, Groupe Hospitalier Paris Centre Cochin-Hôtel Dieu-Broca, Paris, France

11 <sup>e</sup>Department of Microbiology and Molecular Genetics, The Institute for Medical Research-Israel-  
12 Canada (IMRIC), The Hebrew University, Faculty of Medicine, Jerusalem, Israel.

13

14 Running Head: Prevalence of the *sil* locus in *S. pyogenes*

15

16 #Address correspondence to Agnès Fouet, [agnes.fouet@inserm.fr](mailto:agnes.fouet@inserm.fr); ClairePoyart,

17 [claire.poyart@cch.aphp.fr](mailto:claire.poyart@cch.aphp.fr)

18

19 **ABSTRACT**

20 *Streptococcus pyogenes* (group A *Streptococcus*, GAS) causes a wide variety of diseases ranging  
21 from mild non-invasive to severe invasive infections. Mutations in regulatory components have  
22 been implicated in the switch from colonization to invasive phenotypes. Inactivation of the *sil*  
23 locus, composed of six genes encoding a quorum sensing complex, gives rise to a highly invasive  
24 strain. However, studies conducted on limited collections of GAS strains suggested that *sil*  
25 prevalence is around 15 %; furthermore, whereas correlation between *sil* presence and genetic  
26 background was suggested, no link between the presence of a functional *sil* and the invasive status  
27 was assessed. We established a collection of 637 non-redundant strains covering all *emm* types  
28 present in France and of known clinical history, 68%, 22% and 10% were from invasive, non-  
29 invasive infections and asymptomatic carriage, respectively. Among the 637 strains, 206 were *sil*  
30 positive. The prevalence of the *sil* locus varied according to the *emm* genotype, being present in  
31 more than 85 % of the *emm4*, *emm18*, *emm32*, *emm60*, *emm87* and *emm90* strains and absent from  
32 all *emm1*, *emm28* and *emm89* strains. A random selection based on 2009 French epidemiological  
33 data indicated that 16% of GAS strains are *sil* positive. Furthermore, due to mutations leading to  
34 truncated proteins, only 9 % of GAS strains harbor a *sil* functional system. No correlation was  
35 observed between the presence or absence of a functional *sil* locus and the strain invasiveness  
36 status.

37

38 *Streptococcus pyogenes* (group A *Streptococcus*, GAS) causes a wide variety of diseases ranging  
39 from mild pharyngitis or impetigo to more severe invasive infections including streptococcal toxic  
40 shock syndrome (STSS) and necrotizing fasciitis (NF) [1]. Moreover this exclusively human  
41 pathogen is responsible of many asymptomatic upper respiratory tract carriage [2]. However, the  
42 origin of the switch from carriage to pathogen status remains mostly unknown. Increased frequency  
43 of invasive GAS infections has been reported since the last 1980s resulting in a reinforcement of  
44 epidemiological surveillance [3]. Sequencing of the variable extremity of *emm* gene is at the basis  
45 of epidemiological surveys of GAS infections [4]. The *emm* gene encodes the surface M protein,  
46 one of the main GAS virulence factors, and more than 225 different *emm* genotypes have been  
47 described [5, 6]. The global distribution of *emm* genotypes is variable according to continents but  
48 also in time [7, 8]. Moreover variations are observed between countries of the same continent  
49 reflecting ongoing epidemic waves, herd immunity or population immunity [9-12].

50 Hidalgo-Grass et al., identified the streptococcal invasion locus (*sil*) using the polymorphic-tag-  
51 lengths-transposon-mutagenesis (PTTM) method in an *emm14* GAS strain, JS95, isolated from a  
52 patient with NF [13]. The *sil* locus controls GAS spread into deeper tissues in a mouse model of  
53 human soft-tissue infection and may be involved in DNA transfer [13]. This locus contains six  
54 genes: *silA/B* and *silD/E* encoding respectively a two-component system (TCS) and an ABC  
55 transporter. The two remaining genes *silC* and *silCR*, which are located between these two units,  
56 overlap. *silCR* encodes a 41 amino-acid propeptide, which after cleavage yields a 17 aminoacid  
57 pheromone, SilCR. SilD/E cleave and then export the signaling immature pre-peptide SilCR. Upon  
58 reaching a threshold concentration, the mature SilCR binds to the TCS. This in turn activates the  
59 transcription of *silCR* (autoregulation) and *silD/E* and represses that of *silC* [14]. The *silC* gene  
60 product, of unknown function, is involved in mouse virulence [13]. SilCR is involved in the down-  
61 regulation of the expression of the gene encoding the CXC chemokine protease ScpC, which  
62 impairs the recruitment and the activation of neutrophils to the soft-tissue infection site [15, 16].  
63 Furthermore, and in contrast to subcutaneous injection of GAS strains, subcutaneous co-injection of

64 the mature SilCR peptide and GAS strains into mouse, yielded strong neutrophil recruitment that  
65 prevented systemic GAS dissemination [16]. However, this result may be GAS strain dependent  
66 [17]. In the highly invasive strain JS95, the *sil* locus is inactive due to a point mutation in the start  
67 codon of *silCR* (ATA instead of ATG) [13, 18].

68 A study conducted in Japan on non-invasive strains showed a prevalence of 12% for the *sil* locus  
69 [19]. In China, a prevalence of 13% for the *sil* locus was found both in invasive and non-invasive  
70 strains [20]. In France, Bidet et al., studying GAS strains causing pediatric invasive infections,  
71 detected the *sil* locus in 16% of the strains [21]. Moreover, sequencing the *sil* locus of three *emm4*  
72 strains, they identified a frameshift in *silD* generated by the replacement of CTCAAA by TTTAG at  
73 position 436 to 441 [21]. Consecutively, we wondered if the presence of a functional *sil* locus may  
74 be different in isolates from asymptomatic carriage, non-invasive infections or invasive infections.

75 As the previous studies were carried out on small numbers of strains, we conducted a study (i) to  
76 assess the prevalence of *sil* locus in a larger collection of GAS strains, (ii) to determine whether its  
77 presence is related to the *emm* type, (iii) to define whether the *sil* locus was predominantly detected  
78 in invasive, non-invasive or colonization GAS strains and (iv) to assess whether the *sil* locus is  
79 functional or mutated in the *sil* locus positive strains, hence to determine the prevalence of a  
80 functional *sil* in GAS strains of various invasive status.

81

## 82 **Materials and Methods**

### 83 *Strains and clinical data*

84 A total of 637 non-redundant GAS strains isolated from clinical samples collected between 2003  
85 and 2009 were selected from the collection of the French National Reference Center for  
86 Streptococci (CNR-Strep, <https://www.cnr-strep.fr>). Strains were selected according to their *emm*  
87 genotype to have the greatest variety of strains. In the initial collection, all strains from infrequent  
88 *emm* genotypes (6 strains or less in that period) were included; yet, to reflect the French  
89 epidemiology a higher number of strains of the 12 most prevalent *emm* genotypes were selected [9-  
90 11]. Furthermore, due to initial results obtained with the *emm4, 25, 32, 43, 53, 58, 60, 63, 64, 71,*  
91 *74, 87, 90, 93, 94, 101* and *102*, genotypes, all strains from these genotypes were included in the  
92 collection. Clinical characteristics were obtained from questionnaires sent, with the isolates, on a  
93 voluntary basis by a stable network of 233 laboratories located throughout the 22 French  
94 administrative regions. Data collected included sex and date of birth of the patient, date and origin  
95 of the sample, geographical area and clinical manifestations.

96

### 97 *Case definition*

98 GAS invasive infection was defined as the isolation of bacteria from a usually sterile site (e.g.,  
99 blood, cerebrospinal fluid, bone or joint fluid), or from samples obtained from non-sterile site in  
100 combination with clinical signs of NF or STSS. STSS was defined according to the US Working  
101 Group on Severe Streptococcal Infections definitions [22]. Bacteraemia was considered to be  
102 without focus when no focal symptoms could be identified. GAS colonization strains were sent to  
103 the CNR-Strep as part of the investigations conducted around clusters.

104

### 105 *Strain identification and growth conditions*

106 GAS isolates were confirmed to be *S. pyogenes* using morphological and growth characteristics  
107 including  $\beta$  hemolysis on horse blood agar, production of pyrrolydonyl arylamidase and presence of  
108 Lancefield group A antigen. Strains were cultured on horse blood agar plates and were stored in 2%  
109 glycerol Todd Hewitt broth at -80°C.

110

#### 111 ***emm* sequence typing**

112 The *emm* genotype was determined by sequencing the variable 5'-end of the *emm* gene and  
113 comparing sequences with the database of the Center for Disease Control and Prevention  
114 ([www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/doc.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/doc.htm)) [4].

115

#### 116 ***Detection of the sil* locus**

117 PCR detection of the *sil* locus was performed as previously described, using two sets of primers  
118 SD-sil-f1 and SD-sil-r1 or SD-sil-f2 and SD-sil-r2 (Table 1), amplifying respectively a fragment of  
119 638 bp or 1562 bp encompassing *silB* and *silD* [14].

120

#### 121 ***Sequence analysis***

122 For all *sil* locus positive strains, silC1-F and silC5-R primers (Table 1) were used to amplify an 860  
123 bp fragment encompassing *silC* and *silCR*. PCR products were sequenced in order to identify  
124 mutations in this fragment, including the previously described *silCR* start codon mutation [13, 18].

125 DNA fragment amplified using the primers silC3-F and silC4-R (Table 1) were sequenced to detect  
126 mutations in *silD*, including the already described frameshift mutation [21]. Sequencing of PCR  
127 products was performed by Eurofins (Paris, France). Sequence analysis and multiple alignments  
128 were performed using respectively BioEdit software and CLUSTAL W.

129

130 *Statistical analysis*

131 The chi square test was used for statistical analysis with a *P* value <0.05 considered significant.

132



## 133 **Results**

### 134 *Clinical and epidemiological data*

135 The 637 non-redundant GAS strains selected were isolated between 2003 and 2009 from all regions  
136 of France (median = 86 strains per year; range 40 to 164). Among these 637 GAS strains, 435  
137 (68%) were from invasive infections, 138 (22%) from non-invasive infections and the 64 remaining  
138 strains were asymptomatic colonization strains (10%) (Table 2). Most invasive strains were either  
139 from skin or soft tissue infections (n = 141; 32%) including 91 cases of NF, or from bacteremia  
140 without focus (n = 132; 31%). A STSS was described in 23% of cases, mostly associated with NF  
141 (p<0.001) (data not shown). Among the 138 non-invasive strains, 66 were from superficial  
142 cutaneous infections (45%) and 20 from pharyngitis (14%) (Table 2). Asymptomatic colonization  
143 strains were mostly isolated from pharynx (68%) (Table 2). The sex ratio male/female was 1 and  
144 the distribution according to age groups, infants (<1 - 17 years) and adults (18 - 97 years), was  
145 respectively 103 and 534 strains. Among these 637 GAS strains, 87 different *emm* genotypes were  
146 identified but no *emm14* strain was found (Table 3). For any given *emm* type, when all strains tested  
147 were *sil*<sup>+</sup> (see below), all strains of that *emm* type collected by the CNR during the 2003 – 2009  
148 period were included in the study (Table 3).

149

### 150 *sil locus prevalence*

151 *sil* locus prevalence was determined performing PCR detection on the 637 strains. The *sil* locus was  
152 detected in 206 GAS strains from 42 different *emm* genotypes (Tables 2, 3). Noteworthy, the  
153 prevalence of *sil* locus varied according to the genotype *emm* (Table 3). The *sil* locus was detected  
154 in 95% (n = 93) of *emm4* GAS strains as well as in more than 85% of strains belonging to, among  
155 the genotypes involving at least 5 strains, genotypes *emm18*, *emm32*, *emm60*, *emm87*, *emm90* and  
156 *emm102*. Furthermore, *sil* locus was absent from all *emm1* (n = 60), *emm28* (n = 58) or *emm89*  
157 (n = 45) strains, representing the three most frequent genotypes involved in invasive infections in

158 France [9-11]. The *sil* locus was detected in 151 (35%) invasive strains, 43 (31%) non-invasive  
159 strains and 12 (19%) asymptomatic colonization strains of our collection (Table 2, 3). We analyzed  
160 a putative link between the presence of *sil* and the clinical manifestations. Among the invasive  
161 strains the percentage of *sil*-harboring strains varied from 25% (peritonitis) to 44% (other skin and  
162 soft tissues and infections). Among the non-invasive strains, the dispersion was greater with 10%  
163 and 56% strains isolated during pharyngitis and scarlet fever, respectively, harboring the *sil* locus;  
164 the presence of *sil* appears associated with scarlet fever ( $p < 0.05$ ). To note, the two pharyngitis *sil*<sup>+</sup>  
165 strains were *emm87* strains and the scarlet fever *sil*<sup>+</sup> strains belonged to *emm4* (n = 8) and *emm87*  
166 (n = 1) genotypes. Finally, among the *emm4* strains, a genotype that is far more prevalent in  
167 children (second or third most common) than in adults (6<sup>th</sup> encountered *emm* type), 96%, 95% and  
168 92% strains harboring the *sil* locus were invasive, non-invasive and asymptomatic colonization  
169 strains, respectively. There were no significant differences between the presence or absence of the  
170 *sil* locus depending on the invasiveness status of the *emm4* strains. Furthermore, no correlation  
171 between age group and presence of *sil* locus was noticed (data not shown).

172 Taking into account the frequency of the different *emm* genotypes in France in 2009 [9], *sil* locus  
173 prevalence was estimated at 16% overall with, 18%, 16% and 8% in invasive, non-invasive and  
174 asymptomatic colonization strains, respectively (Table 2). Thus, a trend for a lower frequency of the  
175 presence of the *sil* locus in asymptomatic colonization strains emerges, but, due to the low number  
176 of the latter (1), it is not statistically significant.

177

### 178 ***Sequence analysis***

179 To seek an eventual mutation in *silCR* translational start codon as that previously described in the  
180 JS95 (*emm14*) strain, we sequenced *silCR*, from the 206 *sil* locus positive strains [13, 18]. Among  
181 these strains, no mutation in the *silCR* start codon was observed; a functional translational start  
182 codon was present in *silCR* of all strains (Fig. 1). Furthermore, among these 206 strains the *silC* and  
183 *silCR*, except for the start codon, sequences were identical to those of the JS95 strain except for six

184 strains (Fig. 1). In four strains, the guanine at position 17 in *silCR* / cytosine at position 66 in *silC*,  
185 was substituted by an adenine/thymidine leading to the replacement of a threonine by an isoleucine  
186 in SilCR and a valine by an isoleucine in SilC. Among these four strains, three are *emm74* strains  
187 including two invasive and one non-invasive strains and one invasive *emm4* strain. Several SNPs  
188 were identified in *silCR* and *silC* of an *emm4* strain (Fig. 1), that lead to a single aminoacid change  
189 in SilCR, but to several aminoacid replacements in SilC; the isoleucine at position 22 of SilCR was  
190 replaced by an arginine and, in SilC, lysine at position 5, isoleucine at position 10 and asparagine at  
191 position 36, were replaced by an asparagine, a leucine and an aspartic acid, respectively. This strain  
192 harboring several SNPs was isolated from an asymptomatic pharyngeal colonization. Finally, in a  
193 non-invasive *emm41* strain, the replacement of the adenine position 10 of *silCR* / thymine position  
194 83 of *silC* by a thymine / adenine resulted in a stop codon in both SilC and SilCR (Fig. 1). It was  
195 the only strain among the 206 characterized, which presented truncated SilCR and SilC. This strain  
196 was isolated from a superficial cutaneous infection.

197 Consequently, in all *sil*<sup>+</sup> strains, but one with a stop codon and a second one with non-conservative  
198 changes, SilC and SilCR are predicted functional. This contrasts with the situation in JS95, the  
199 strain in which the *sil* locus was originally described [13, 18].

200

201 The *silD* gene was sequenced to search for the frameshift mutations, previously described in *emm4*  
202 and *emm18* strains, or other mutations [21]. In only 55 (27%) strains, was the *silD* sequence  
203 identical to that of JS95 (Fig. 2). In 78 strains (38%) a substitution of CTCAAA at position 436 to  
204 441 by TTTTAG gave rise to the replacement of a leucine at position 146 of SilD by a  
205 phenylalanine and to a stop codon in position 441 of *silD*. In 12 strains, a 515 bp deletion was found  
206 from adenine at position 235 to thymine at position 749, yielding a truncated SilD protein. Three  
207 strains displayed the deletion of an adenine at position 479 generating the frameshift mutation  
208 previously described in the reference strain MGAS8232 (*emm18*) [23]. In one strain, a stop codon  
209 was generated by the replacement of cytosine at position 883 by a thymine. Altogether, 94 of the

210 206 *sil*<sup>+</sup> strains (45.5%) encode a truncated SilD. Finally, in 57 strains (28%) SNPs were observed  
211 amounting to 29 different SNP patterns ranging from one single aminoacid substitution to 14  
212 aminoacid substitutions, of which 19 patterns displayed more than three SNPs. SNPs affected *silD*  
213 from many *emm* genotypes as only 17 among the 42 genotypes analyzed were not concerned.

214 Seventy-six *emm4* strains (82%) from the 93 *emm4 sil*<sup>+</sup> strains of our collection, as well as the  
215 reference MGAS10750 strain, harbored the CTCAAA at position 436 to 441 to TTTTAG  
216 substitution, 11 strains (12%) the 516 bp deletion and only three strains (3%) SNPs (Fig. 2, Table  
217 3). Thus, among the 93 *emm4 sil*<sup>+</sup> strains, only three (3%) possessed a *silD* sequence identical to  
218 that of JS95 and three displayed SNPs. Among the 87 strains harboring a non-functional *sil* locus,  
219 60 are from invasive infections, 16 from non-invasive infections and 11 from asymptomatic  
220 colonization. The three displaying SNPs are all invasive strains (Table 3) and among the three with  
221 a wild-type *silD*, two are from non-invasive and one from an invasive infection.

222 In contrast, considering all strains, except the *emm4* strains, harboring a *sil* locus, the *sil* locus  
223 functionality was predicted conserved in 105 strains (93%) (Table 3); the two non-*emm4* strains  
224 with a truncated, 146-aa long, SilD are an *emm102* non-invasive strain and an *emm113* invasive  
225 strain and the non-*emm4* strain harboring the 516 bp deletion is an *emm3* strain. The strains with the  
226 frameshift mutation previously described in an *emm18* strain [21] are two *emm18* strains and one  
227 *emm179*. Finally, the strain with the stop codon at position 883 is an invasive *emm102* strain. The  
228 105 non-*emm4* strains with a potentially functional *sil* locus were isolated from 81 invasive  
229 infections, 23 non-invasive infections and only one asymptomatic colonization.

230 Taking into account the frequency of the different *emm* genotypes in France 2009 [9], the *sil* locus  
231 was estimated to be present and potentially functional in 8% of the invasive and 14% of the non-  
232 invasive strains but absent from all asymptomatic colonization strains.

233

## 234 **Discussion**

235 In this study we characterized the prevalence of the *sil* locus and sequenced the three genes in  
236 which mutations had been described so far, namely *silC*, *silCR* and *silD*, in a large collection of  
237 clinical GAS strains.

238 Our data show that the presence of the *sil* locus is correlated to the *emm* genotype of the strain and  
239 that its prevalence was overwhelming in given *emm* types. This is in accordance with previous  
240 studies, to which we add new *sil* harboring *emm* types (Table 3) [19-21]. A recent study highlighted  
241 the overwhelming prevalence of *sil* locus in the GAS close genetic relative, *Streptococcus*  
242 *dysgalactiae* subsp *equisimilis* a group G *Streptococcus* (GGS) (100%) [13, 18]. GGS are regarded  
243 as commensal, but can also cause human invasive infections manifestations, close to those elicited  
244 by GAS [24].

245 However, within the *emm4* genotype, the presence of the *sil* locus did not correlate with the  
246 presence of a functional *sil* locus. Only 6 (6%) *emm4* strains, half from invasive and half from non-  
247 invasive infections, had a potentially functional *sil* locus as defined by the absence of deletion,  
248 frameshift, or mutation leading to a stop codon in *silCR*, *silC* and *silD* sequences. Whereas, in  
249 several genotypes, SNPs were the most frequent mutations observed, only 3% of *emm4* strains  
250 displayed SNPs. Furthermore, that 82% of the *emm4 silD* mutant strains shared the same 516 bp  
251 deletion, leading to a truncated 146 aa-long SilD, suggested that this mutation is clonal. To note,  
252 none of our *emm4* strains, nor the MAGS10750 reference strain, displayed the frameshift mutation  
253 previously described in three *emm4* strains [21]. Interestingly, of the six GGS strains in which *silD*  
254 was sequenced, only one possessed an intact SilD [13, 18].

255 Sequencing of *silCR* allowed us to identify only a single strain mutated in this gene; the mutation  
256 been in the *silC* – *silCR* overlapping segment, it yielded mutations in both in SilCR and SilC. The  
257 *silCR* translation initiation codon is mutated in the thoroughly studied *sil* locus from the JS95 strain,  
258 an *emm14* strain. None of the strains of our collection shared this mutation. However, no *emm14*  
259 strain was present in our collection, which contained a very large number of different genotypes.

260 Indeed, whereas *emm14* genotype is among the five most frequent *emm* type in Israel, it is seldom  
261 encountered in Europe, Northern America, and Japan [9-11, 25, 26]. Moreover, in the Pacific region  
262 *emm14* genotype represents only the 25<sup>th</sup> most common genotype amounting to 2% of the strains  
263 [8]. This translation stop codon mutation may be restricted to *emm14* strains. Furthermore, a  
264 systematic sequencing of the *silCR* gene in *emm14* strains is necessary to determine whether the  
265 described mutation is an exception or the rule among the *emm14* strains [13, 18].

266 No correlation could be drawn between the presence of a potentially active *sil* locus and clinical  
267 manifestations or invasive status of the stains. However, interestingly, very few asymptomatic  
268 carriage strains possessed a functional *sil* locus and when the prevalence of the *emm* types was  
269 taken into account, we found no asymptomatic *sil*<sup>+</sup> strain.

270 The Sil quorum sensing regulatory system does not need all its components to be synthesized in all  
271 strains. Strains that harbor mutations in *silCR* or / and *silD* can respond via SilAB to SilCR [13, 18].  
272 Furthermore, strains that are devoid of the *sil* locus have been shown to respond to the SilCR 17  
273 amino-acid peptide [17]. Yet for strains to make use of this system, it is necessary that some possess  
274 and express a fully functional Sil machinery. Whether this is the case only during infections or also  
275 during asymptomatic carriage awaits further studies.

276

277 **ACKNOWLEDGMENTS**

278 This work was supported by Programme franco-israélien, CNOUS. We thank the correspondents of  
279 the CNR-Strep for sending the strains and filling the questionnaires.

280

## 281 REFERENCES

- 282 1. Cunningham, M.W., *Pathogenesis of group A streptococcal infections*. Clin Microbiol Rev,  
283 2000. **13**(3): p. 470-511.
- 284 2. Shaikh, N., E. Leonard, and J.M. Martin, *Prevalence of streptococcal pharyngitis and*  
285 *streptococcal carriage in children: a meta-analysis*. Pediatrics, 2010. **126**(3): p. e557-64.
- 286 3. Carapetis, J.R., et al., *The global burden of group A streptococcal diseases*. Lancet Infect  
287 Dis, 2005. **5**(11): p. 685-94.
- 288 4. Beall, B., R. Facklam, and T. Thompson, *Sequencing emm-specific PCR products for*  
289 *routine and accurate typing of group A streptococci*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(4): p. 953-  
290 8.
- 291 5. Bisno, A.L., M.O. Brito, and C.M. Collins, *Molecular basis of group A streptococcal*  
292 *virulence*. Lancet Infect Dis, 2003. **3**(4): p. 191-200.
- 293 6. Li, Z., et al., *Array of M protein gene subtypes in 1064 recent invasive group A*  
294 *streptococcus isolates recovered from the active bacterial core surveillance*. J Infect Dis,  
295 2003. **188**(10): p. 1587-92.
- 296 7. O'Brien, K.L., et al., *Epidemiology of invasive group a Streptococcus disease in the United*  
297 *States, 1995-1999*. Clin Infect Dis, 2002. **35**(3): p. 268-76.
- 298 8. Steer, A.C., et al., *Global emm type distribution of group A streptococci: systematic review*  
299 *and implications for vaccine development*. Lancet Infect Dis, 2009. **9**(10): p. 611-6.
- 300 9. Plainvert, C., et al., *Invasive group A streptococcal infections in adults, France (2006-*  
301 *2010)*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18**(7): p. 702-710.
- 302 10. Lepoutre, A., et al., *Epidemiology of invasive Streptococcus pyogenes infections in France*  
303 *in 2007*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(12): p. 4094-100.
- 304 11. Lamagni, T.L., et al., *Epidemiology of severe Streptococcus pyogenes disease in Europe*. J  
305 Clin Microbiol, 2008. **46**(7): p. 2359-67.
- 306 12. Luca-Harari, B., et al., *Clinical and microbiological characteristics of severe Streptococcus*  
307 *pyogenes disease in Europe*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(4): p. 1155-65.
- 308 13. Hidalgo-Grass, C., et al., *A locus of group A Streptococcus involved in invasive disease and*  
309 *DNA transfer*. Mol Microbiol, 2002. **46**(1): p. 87-99.
- 310 14. Eran, Y., et al., *Transcriptional regulation of the sil locus by the SilCR signalling peptide*  
311 *and its implications on group A streptococcus virulence*. Mol Microbiol, 2007. **63**(4): p.  
312 1209-22.
- 313 15. Hidalgo-Grass, C., et al., *A streptococcal protease that degrades CXC chemokines and*  
314 *impairs bacterial clearance from infected tissues*. EMBO J, 2006. **25**(19): p. 4628-37.
- 315 16. Hidalgo-Grass, C., et al., *Effect of a bacterial pheromone peptide on host chemokine*  
316 *degradation in group A streptococcal necrotising soft-tissue infections*. Lancet, 2004.  
317 **363**(9410): p. 696-703.
- 318 17. Salim, K.Y., et al., *Regulation of saga, siaA and scpC by SilCR, a putative signaling peptide*  
319 *of Streptococcus pyogenes*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **289**(2): p. 119-25.
- 320 18. Belotserkovsky, I., et al., *Functional analysis of the quorum-sensing streptococcal invasion*  
321 *locus (sil)*. PLoS Pathog, 2009. **5**(11): p. e1000651.
- 322 19. Billal, D.S., et al., *Prevalence of Streptococcus invasive locus (sil) and its relationship with*  
323 *macrolide resistance among group A Streptococcus strains*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(4):  
324 p. 1563-4.
- 325 20. Jing, H.B., et al., *Epidemiological analysis of group A streptococci recovered from patients*  
326 *in China*. J Med Microbiol, 2006. **55**(Pt 8): p. 1101-7.
- 327 21. Bidet, P., et al., *Molecular epidemiology of the sil streptococcal invasive locus in group A*  
328 *streptococci causing invasive infections in French children*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(6):  
329 p. 2002-4.
- 330 22. Infections, T.W.G.o.S.S., *Defining the group A streptococcal toxic shock syndrome.*  
331 *Rationale and consensus definition*. JAMA, 1993. **269**(3): p. 390-1.



- 332 23. Smoot, J.C., et al., *Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18*  
333 *group A Streptococcus strains associated with acute rheumatic fever outbreaks*. Proc Natl  
334 Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4668-73.
- 335 24. Brandt, C.M. and B. Spellerberg, *Human infections due to Streptococcus dysgalactiae*  
336 *subspecies equisimilis*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(5): p. 766-72.
- 337 25. Moses, A.E., et al., *emm typing of M nontypeable invasive group A streptococcal isolates in*  
338 *Israel*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(10): p. 4655-9.
- 339 26. Ikebe, T., et al., *Distribution of emm genotypes among group A Streptococcus isolates from*  
340 *patients with severe invasive streptococcal infections in Japan, 2001-2005*. Epidemiol  
341 Infect, 2007. **135**(7): p. 1227-9.
- 342
- 343
- 344

345 Table 1. Primers

<i>Name</i>	<i>Sequence (5' to 3')</i>	<i>Reference</i>
SD-sil-f1	GGAGTTGGTTTATCAAATGTCAG	[14]
SD-sil-r1	ATCTGCCACAAAGACTGATCAAG	[14]
SD-sil-f2	TTATTGGATCGGAACTTACGC	[14]
SD-sil-r2	TGCTTCCCAACAACCTTACCAC	[14]
silC1-F	GGCTAAACCTGCTAAAGACTCTTG	This study
silC5-R	TCTCTTCCAGACACTAGTCATAGG	This study
silC3-F	AGCTGAATATTGGCTTGCTC	This study
silC4-R	CGCGGACCAATCAAGTCATTGT	This study

346

347

348

349  
350

Table 2. Clinical characteristics of the 637 GAS strains and prevalence of the *sil* locus

Isolate type	Clinical manifestations	No. of strains	No. of <i>sil</i> locus positive strains (%)	Potential functional <i>sil</i> locus (%) <sup>e</sup>
<b>Invasive</b>				
	Necrotizing fasciitis	91	32 (35%)	20 (22%)
	Others skin and soft tissue infections	50	22 (44%)	12 (24%)
	Bacteremia without focus	132	50 (38%)	25 (19%)
	Gynecological infections	66	20 (30%)	13 (20%)
	Joint and bone infections	36	11 (31%)	6 (17%)
	Pleuropulmonary infections	35	9 (26%)	4 (11%)
	Meningitis	12	4 (33%)	3 (25%)
	Peritonitis	8	2 (25%)	1 (13%)
	Others <sup>b</sup>	5	1 (20%)	1 (20%)
	Total	435	151 (35%)	85 (20%)
Representative Total <sup>a</sup>		324	57 (18%)	28 (8%)
<b>Non invasive</b>				
	Superficial cutaneous infections	66	20 (30%)	12 (18%)
	Pharyngitis	20	2 (10%)	2 (10%)
	Scarlet fever	16	9 (56%)	1 (6%)
	Abscesses	11	4 (36%)	4 (36%)
	Vaginitis	9	3 (33%)	1 (11%)
	Endophthalmia	7	2 (29%)	2 (29%)
	Otitis	4	3 (75%)	3 (75%)
	Others <sup>c</sup>	5	0 (0%)	
	Total	138	43 (31%)	25 (18%)
Representative Total <sup>a</sup>		76	12 (16%)	11 (14%)
<b>Asymptomatic colonization</b>				
	Pharynx	46	10 (22%)	0 (0%)
	Noze	7	1 (14%)	0 (0%)
	Skin	6	1 (17%)	1 (17%)
	Others <sup>d</sup>	5	0 (0%)	0 (0%)
	Total	64	12 (19%)	1 (2%)
Representative Total <sup>a</sup>		12	1 (8%)	0

351 <sup>a</sup> taking into account strains from the most prevalent *emm* types in France; %ages are to the number of strains  
352 with the given clinical manifestation or invasiveness status. <sup>b</sup> 2 endocarditis, 2 post-mortem samples and one  
353 myocarditis; <sup>c</sup> 3 ethmoïditis and 2 urinary infections; <sup>d</sup> 3 newborn colonizations and 2 vaginal colonization; <sup>e</sup>  
354 absence of deletion, frameshift, or mutation leading to a stop codon in *silCR*, *silC* and *silD* sequences; %age  
355 is relative to the number of strains.

356 Table 3. Prevalence of *sil* locus and of a predicted functional *sil* locus among the 87 different *emm* types  
 357 according to the invasiveness of the 637 GAS strains

<i>emm</i> type	No. of strains	Invasive strains			Non-invasive strains			Asymptomatic colonization strains		
		<i>sil</i> <sup>b</sup>	<i>sil</i> <sup>c</sup>	Potential functional <i>sil</i> locus <sup>d</sup>	<i>sil</i> <sup>-</sup>	<i>sil</i> <sup>+</sup>	Potential functional <i>sil</i> locus	<i>sil</i> <sup>-</sup>	<i>sil</i> <sup>+</sup>	Potential functional <i>sil</i> locus
<i>emm1</i>	60	42	0		7	0		11	0	
<i>emm2</i>	15	9	0		5	0		1	0	
<i>emm3</i>	25	17	1	0	3	0		4	0	
<i>emm4</i>	98	3	64	4	1	18	2	1	11	0
<i>emm5</i>	7	4	0		2	0		1	0	
<i>emm6</i>	19	11	0		5	0		3	0	
<i>emm8</i>	2	2	0		0	0		0	0	
<i>emm9</i>	6	3	1	1	2	0		0	0	
<i>emm11</i>	13	6	0		3	0		4	0	
<i>emm12</i>	24	14	0		6	0		4	0	
<i>emm18</i>	5	0	5	3	0	0		0	0	
<i>emm22</i>	7	4	0		3	0		0	0	
<i>emm24</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm25</i>	3	1	2	2	0	0		0	0	
<i>emm27</i>	2	2	0		0	0		0	0	
<i>emm28</i>	58	39	0		14	0		5	0	
<i>emm29</i>	1	0	1	1	0	0		0	0	
<i>emm30</i>	1	0	0		0	1	1	0	0	
<i>emm32</i>	7	0	5	5	0	2	2	0	0	
<i>emm33</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm41</i>	4	0	3	3	0	1	0	0	0	
<i>emm42</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm43</i>	2	0	1	1	0	1	1	0	0	
<i>emm44</i>	4	2	0		2	0		0	0	
<i>emm48</i>	1	0	0		0	1	1	0	0	
<i>emm49</i>	6	5	0		1	0		0	0	
<i>emm50</i>	2	1	1	1	0	0		0	0	
<i>emm53</i>	3	0	2	2	0	1	1	0	0	
<i>emm55</i>	1	0	0		1	0		0	0	
<i>emm58</i>	7	2	1	1	3	1	1	0	0	
<i>emm59</i>	5	2	0		3	0		0	0	
<i>emm60</i>	11	1	5	5	0	5	5	0	0	
<i>emm63</i>	3	2	0		1	0		0	0	
<i>emm64</i>	4	2	0		1	0		1	0	
<i>emm65</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm66</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm68</i>	3	2	0		0	0		1	0	
<i>emm69</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm71</i>	3	0	2	2	0	1	1	0	0	
<i>emm73</i>	2	2	0		0	0		0	0	
<i>emm74</i>	3	0	2	2	0	1	1	0	0	
<i>emm75</i>	9	5	0		0	0		4	0	
<i>emm76</i>	5	2	0		3	0		0	0	
<i>emm77</i>	22	13	3	3	2	3	3	1	0	
<i>emm78</i>	4	2	0		1	0		1	0	
<i>emm81</i>	12	9	1	1	2	0		0	0	
<i>emm82</i>	8	7	1	1	0	0		0	0	
<i>emm83</i>	15	12	0		3	0		0	0	
<i>emm85</i>	2	1	1	1	0	0		0	0	

<i>emm</i> type	No. of strains	Invasive strains			Non-invasive strains			Asymptomatic colonization strains		
		<i>sil</i> <sup>b</sup>	<i>sil</i> <sup>c</sup>	Potential functional <i>sil</i> locus <sup>d</sup>	<i>sil</i> <sup>-</sup>	<i>sil</i> <sup>+</sup>	Potential functional <i>sil</i> locus	<i>sil</i> <sup>-</sup>	<i>sil</i> <sup>+</sup>	Potential functional <i>sil</i> locus
<i>emm87</i>	20	1	14	14	0	4	4	0	1	1
<i>emm88</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm89</i>	45	23	0		11	0		11	0	
<i>emm90</i>	7	0	7	7	0	0		0	0	
<i>emm92</i>	2	1	0		1	0		0	0	
<i>emm93</i>	2	0	2	2	0	0		0	0	
<i>emm94</i>	3	0	3	3	0	0		0	0	
<i>emm100</i>	1	0	0		0	1	1	0	0	
<i>emm101</i>	3	0	3	3	0	0		0	0	
<i>emm102</i>	7	1	4	3	0	2	1	0	0	
<i>emm103</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm104</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm106</i>	3	2	0		1	0		0	0	
<i>emm108</i>	1	0	1	1	0	0		0	0	
<i>emm110</i>	3	1	1	1	1	0		0	0	
<i>emm112</i>	2	1	1	1	0	0		0	0	
<i>emm113</i>	2	1	1	0	0	0		0	0	
<i>emm116</i>	3	2	0		1	0		0	0	
<i>emm117</i>	2	0	2	2	0	0		0	0	
<i>emm118</i>	4	2	2	2	0	0		0	0	
<i>emm122</i>	1	0	1	1	0	0		0	0	
<i>emm124</i>	2	2	0		0	0		0	0	
<i>emm142</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm147</i>	1	0	1	1	0	0		0	0	
<i>emm158</i>	1	0	1	1	0	0		0	0	
<i>emm168</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm172</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm174</i>	1	0	1	1	0	0		0	0	
<i>emm176</i>	3	0	0		3	0		0	0	
<i>emm179</i>	1	0	1	0	0	0		0	0	
<i>emm180</i>	2	2	0		0	0		0	0	
<i>emm182</i>	2	2	0		0	0		0	0	
<i>emm183</i>	1	0	1	1	0	0		0	0	
<i>emm187</i>	1	1	0		0	0		0	0	
<i>emm192</i>	1	0	0		1	0		0	0	
<i>emm217</i>	2	1	1	1	0	0		0	0	
<i>emm230</i>	1	0	1	1	0	0		0	0	
<i>stG1750</i>	1	1	0		0	0		0	0	
Total (%)	637	284	151	85 (30%)	88	43	25 (28%)	52	12	1 (< 1%)
Representative	430	267	57	28 (8%)	64	12	11 (14%)	11	1	0
Total (%)										

358 <sup>a</sup>taking into account strains from the most prevalent *emm* types in France. <sup>b</sup> *sil* locus absent; <sup>c</sup> *sil* locus  
359 present; <sup>d</sup> absence of deletion, frameshift, or mutation leading to a stop codon in *silCR*, *silC* and *silD*  
360 sequences. %ages are to the number of strains, *sil*<sup>+</sup> and *sil*<sup>-</sup>, with the given invasiveness status.  
361

362 Figure legend

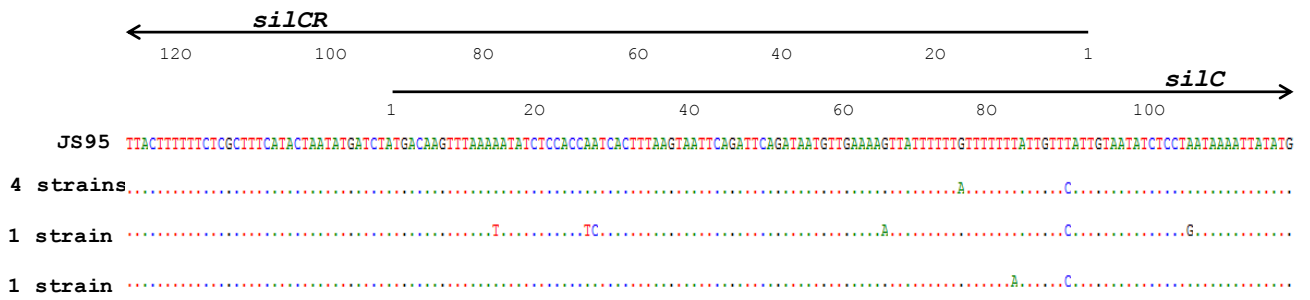
363 **Fig. 1.** Mutation occurrences in *silCR* and *silC*. Both genes are symbolized by lines. Below the  
364 sequence of the JS95 genes are indicated all the mutations found during this study as well as their  
365 occurrences, on the left.

366

367 **Fig. 2.** Mutation occurrences in *SilD*. *SilD* sequence is symbolized by a line. Fragments of the JS95  
368 *SilD* sequence are shown, separated by double oblique lines. The mutations leading to premature  
369 translation arrest or to deletions are indicated below the sequence as well as their occurrences on the  
370 left.

371

372



373

374 Figure 1

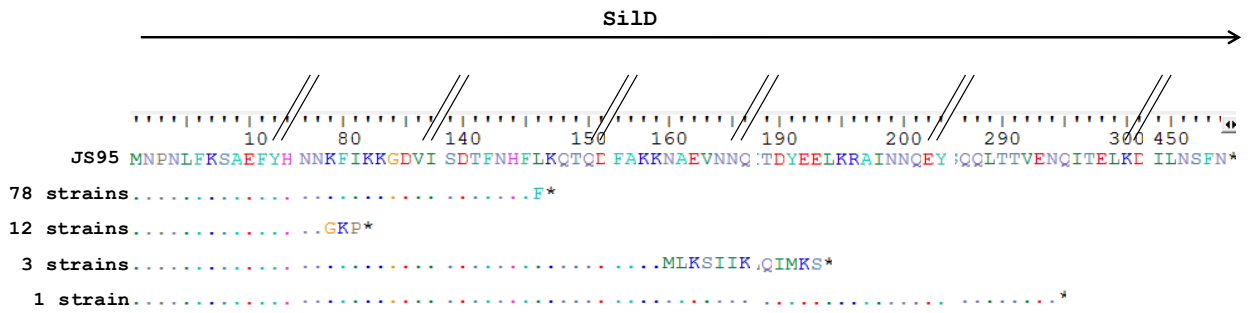
375

376

377

378

379



380

381 Figure 2

382

## **Article IV**

---

Céline Plainvert, Isabelle Rosinski-Chupin, Gérald Touak, Elisabeth Sauvage, Claire Poyart,  
Philippe Glaser, Agnès Fouet

*Résultats non publiés, article en cours de soumission*



1 A novel *covS* mutation favors *Streptococcus pyogenes* colonization phenotype

2

3 Céline Plainvert<sup>a,b,c,d</sup>, Isabelle Rosinski-Chupin<sup>e,f</sup>, Gérald Touak<sup>d</sup>, Elisabeth Sauvage<sup>e,f</sup>, Claire

4 Poyart<sup>a,b,c,d,#</sup>, Philippe Glaser<sup>e,f,\*</sup>, Agnès Fouet<sup>a,b,c,\*</sup>

5

6 <sup>a</sup> INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France

7 <sup>b</sup> CNRS (UMR 8104), Paris, France

8 <sup>c</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

9 <sup>d</sup> Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Service de Bactériologie, Centre National de

10 Référence des Streptocoques, Groupe Hospitalier Paris Centre Cochin-Hôtel Dieu-Broca,

11 Paris, France

12 <sup>e</sup> Institut Pasteur [Biologie des Bactéries pathogènes à Gram-positif](#)

13 <sup>f</sup> CNRS UMR 3525, Paris, France

14

15 Running Head: A novel *covS* mutation in a *S. pyogenes* carriage strain

16

17 \* PG and AF share the senior authership

18

19 #Address correspondence to Claire Poyart, [claire.poyart@cch.aphp.fr](mailto:claire.poyart@cch.aphp.fr)

20

21 **ABSTRACT**

22 *Streptococcus pyogenes* (group A *Streptococcus*, GAS) causes a wide variety of diseases  
23 ranging from mild non-invasive to severe invasive infections. Mutations in CovRS, a two-  
24 component system that controls the expression of 15% of the genome, have been implicated  
25 in the switch from colonization to invasive phenotypes. To identify other possible causes of  
26 this switch, we determined the genomic sequence of twelve strains from six pairs composed  
27 each of an invasive and a carriage strain. Two pairs displayed mutations in *covS*, encoding the  
28 sensor histidine kinase. In the first pair, the mutation, harbored by the invasive strain, lead to a  
29 truncated non-functional CovS protein, whereas in the second pair the carriage strain  
30 possessed a point mutation in *covS*, leading to the replacement of tyrosine in position 39 by a  
31 histidine. Transcription profiling and protein accumulation analyses indicated that the  
32 CovSY39H protein affected the expression of the CovR regulon in a unique fashion. The  
33 differences between wild-type (WT2) and mutant (CovS2) strain gene expression was  
34 opposite to that classically described. Furthermore, the CovS2 strain barely responded to the  
35 addition of the CovS-signaling compounds, Mg<sup>2+</sup> and LL-37, suggesting that CovSY39H  
36 remains under an active conformation. The WT2 strain survives better than the CovS2 strain  
37 in murine macrophages. Finally, in a murine model of invasive infection the CovS strain is  
38 less virulent than the wild-type strain. Altogether these data suggest that the *covSY39H*  
39 mutation gives rise to a strain exhibiting a colonization phenotype.

40

41

42 *Streptococcus pyogenes* (group A streptococcus, GAS) is an important human pathogen  
43 responsible for a large variety of clinical manifestations ranging from mild superficial  
44 infections to more life-threatening invasive infections including necrotizing fasciitis (NF) or  
45 streptococcal toxic shock syndrome (STSS) [1]. The molecular mechanisms that enable GAS  
46 to cause such a large range of diseases are unknown although both bacterial and host-specific  
47 components are considered to be involved [2]. No specific GAS attribute has been associated  
48 with a type of infection although a link between genetic background and tissue tropism has  
49 been demonstrated [3, 4]. In fact, it is rather how GAS can regulate the expression of a variety  
50 of gene products involved in GAS survival in the human host, by adapting to constraints  
51 encountered during the infection process, that may change depending on the anatomic  
52 compartment, on environmental factors and in response to host defense mechanisms, that will  
53 influence the type of infection [5].

54 The CovRS system (control of virulence, initially termed CsrRS [6]) is the best-studied  
55 system among the 13 two-component signal transduction systems (TCS) identified in the  
56 GAS genome. The CovRS system is responsible for regulating directly or indirectly  
57 approximately 15% of the GAS genome, mainly as a repressor [7-10]. Comparison with TCSs  
58 in other species, genetic evidences and *in vitro* studies have indicated that CovS is a sensor  
59 histidine kinase whose phosphorylation state is influenced by environmental signals including  
60 extracellular  $Mg^{2+}$ , LL-37, elevated temperature, acidic pH and high osmolarity [11-15] while  
61 CovR is a transcriptional regulator whose activity on promoters is controlled by its  
62 phosphorylation state [16-19]. Interestingly,  $Mg^{2+}$  and LL-37 have opposite effects on the  
63 expression of the CovRS-controlled genes, the addition of LL-37 mimicking *covS* mutations  
64 [11-15]. Although, phosphorylation of CovR by CovS has not yet been proven, the ratio of  
65 phosphorylated CovR/unphosphorylated CovR is reduced in *covS* mutant strains [8]; CovR  
66 can also be phosphorylated by exogenous acetyl-phosphate [16-20]. Furthermore, in addition

67 to its kinase activity, CovS can dephosphorylate CovR [11]. Among the genes controlled by  
68 CovRS, various groups have been identified. A group of CovRS-repressed genes includes,  
69 among others, *speA*, that encodes a superantigen, and the *has* operon, encoding the  
70 biosynthetic enzymes of the antiphagocytic poly-saccharidic capsule, that is involved in *in*  
71 *vitro* binding to the receptor CD44, preventing GAS invasion in pharyngeal epithelial cells,  
72 and with increased virulence in a mice model [6]. In both *covS* and *covR* mutant strains, these  
73 genes are over-expressed [8]. Another group of genes, sometimes described as activated by  
74 CovRS, includes *speB*, encoding the extracellular cysteine protease SpeB, a major virulence  
75 factor of *S. pyogenes*, involved in several stages of GAS infections including dissemination,  
76 modulation of immune response and inflammation [21-27], and *grab* an  $\alpha$ 2-macroglobulin  
77 binding protein [10, 28-31]. The exact molecular mechanism by which the CovRS TCS  
78 controls these genes has not yet been determined; they are under-expressed in *covS* mutant  
79 strains and in the *covRR119H* mutant strain, but over-expressed in a *covR* deleted strain [10,  
80 28-31]. Finally, *in vivo* selection of *covRS* mutants leads to strains with enhanced virulence  
81 both in humans and in animal models highlighting the major impact of the CovRS system on  
82 GAS virulence [10, 32-34]. This selection is due, at least in part to the over-expression of  
83 *sdA* encoding the DNase SdA1 [29].

84 Increased frequency of invasive GAS infections has been reported since the last 1980s  
85 resulting in a reinforcement of epidemiological surveillance [35]. Sequencing of the variable  
86 extremity of the *emm* gene, encoding the surface protein M, one of GAS main virulence  
87 factors, is at the basis of epidemiological surveys of GAS infections and more than 225  
88 different *emm* genotypes have been described [36-38]. In France, the epidemiology of GAS  
89 invasive infections is performed by the French national reference center for streptococci  
90 (CNR-Strep, [www.cnr-strep.fr](http://www.cnr-strep.fr)) that collects and analyses invasive GAS strains sent on  
91 voluntary basis by laboratories located throughout the 22 French administrative regions. The

92 GAS colonization strains isolated as part of the investigations conducted around clusters are  
93 also sent to and appraised by the CNR-Strep.

94 In order to identify factors responsible for the non-invasive to invasive switch, we  
95 sought genetic differences between invasive and colonization GAS strains. Twelve strains  
96 from six pairs of GAS strains, each constituted by an invasive and an asymptomatic  
97 colonization GAS strain, have been sequenced. Here, we report the characterization of strains  
98 from two clusters in which one strain harbored a mutation in *covS*. Phenotypes of strains from  
99 both clusters and transcription profiles, cell interaction and *in vivo* virulence for strains from  
100 one cluster have been assessed and differences between wild-type (wt) and related *covS*  
101 mutant strains were observed.

102

103 **MATERIALS AND METHODS**

104 **Bacterial strains and culture conditions.** All clinical GAS strains listed in Table 1  
105 were sent on a voluntary basis to the CNR-Strep by laboratories located throughout the 22  
106 French administrative regions. Clinical characteristics were obtained from questionnaires sent  
107 with the isolates. Data collected included sex and date of birth of the patient, date and origin  
108 of the sample, geographical area and clinical manifestations. Strains were stored in 2%  
109 glycerol Todd Hewitt broth (TH) at -80°C. GAS strains were cultured in static TH broth  
110 supplemented with 0.2% yeast extract (THY) at 37°C without agitation. When necessary, 15  
111 mM, except when otherwise specified, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> or 100 nM LL-37 (Sigma) solutions and  
112 human plasma were added to THY.

113 **GAS strains sequencing.** Complete genome sequencing was carried out using the  
114 Illumina technology, with read length of 100 nt and a more than 200 fold-coverage. Libraries  
115 were constructed by using the Illumina TrueSeq kit following the manufacturer's instructions.  
116 Illumina short reads were assembled by using the Velvet software [39]. The contigs of strain  
117 CovS2 and of strain WT1 were ordered by aligning them to the complete genome sequence of  
118 GAS strain 315 (NC\_004070.1) using the Mauve software [40]. These two assemblies were  
119 used as reference sequences. The reads of strain CovS2 and WT2 and of strains WT1 and  
120 CovS1 were aligned to the corresponding reference sequence by using the Burrows-Wheeler  
121 Aligner (BWA) [41]. SNP calling was made using SAMtools MPILEUP and varFilter [42].  
122 All putative SNP were visually verified by using Tablet [43]. Alignment of the reference  
123 genome reads allowed the identification of errors in the Velvet assembly. The contigs of  
124 strain WT2 and CovS1 were compared to the respective reference sequence by using Mauve  
125 [40] in order to identify larger deletions and insertions.

126 **Growth kinetics.** Single colonies from Columbia agar plates containing 5% of horse  
127 blood (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) were inoculated into THY and incubated over-

128 night at 37°C without agitation. Overnight cultures were diluted 1:100 in fresh THY and 200  
129 µL were distributed in quadruplet in 96-well plates. The 96-well plates were incubated at  
130 37°C in a Thermo Scientific Multiskan™ GO microplate spectrophotometer. Optical density  
131 at 600 nm (OD<sub>600</sub>) was measured every 10 minutes. The same protocol was used for cultures  
132 carried out with THY supplemented in MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, LL-37 or human plasma, the preculture  
133 medium being also supplemented.

134 **SpeB accumulation assay.** Overnight cultures in static THY, supplemented or not with  
135 MgCl<sub>2</sub> or LL-37 medium, were diluted 1:30 in the appropriate growth medium and incubated  
136 at 37°C and OD<sub>600</sub> followed. Supernatant proteins were precipitated in presence of 0.6 N TCA  
137 (2,2,2-trichloroacetic acid) for one hour at 0°C. After centrifugation, pellets were resuspended  
138 with 50 mM Tris pH 8.0 and total proteins were quantified using the BCA assay kit (Thermo-  
139 Fisher). Defined amounts of total proteins were loaded on a nitrocellulose membrane.  
140 Detection of SpeB was performed using an over-night 4°C incubation with a specific anti-  
141 SpeB rabbit antibody (Abcam). Horseradish peroxidase (HRP)-coupled goat anti-rabbit  
142 secondary antibody (Zymed) was added and detection was performed with enhanced  
143 chemiluminescence (ECL Reagent, GE healthcare). Immunoblot assays were analyzed using  
144 the ImageJ software.

145 **Capsular hyaluronic acid assay.** Cultures were carried out as described for the SpeB  
146 assay. Ten mL culture pellets were washed twice with water and resuspended in 0.5 mL  
147 water. Capsule was released by shaking with 1 mL of chloroform and assayed as described by  
148 Schragger *et al.* [44]. Briefly, after centrifugation, the hyaluronic acid (HA) content in the  
149 aqueous phase was determined by measuring absorbance at 640 nm after a one hour  
150 incubation in the dark with 2 mL of a solution containing 20 mg of 1-ethyl-2-[3-(1-  
151 ethylnaphtho-[1,2-d]thiazolin-2-ylidene)-2-methylpropenyl]naphtho-[1,2-d]thiazolium bromide  
152 (Stains-all; Sigma-Aldrich) and 60 µL of glacial acetic acid in 100 mL of 50% formamide.

153 Absorbance values were compared with a standard curve generated using known  
154 concentrations of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* (Sigma-Aldrich). The amount of  
155 capsular HA produced was expressed as femtograms (fg) per colony-forming unit (CFU).

156 **RNA isolation and Illumina RNA-seq sequencing.** *S. pyogenes* WT2 and CovS2 strains  
157 were cultured at 37°C in THY broth supplemented or not with LL-37 or MgCl<sub>2</sub>, and cells  
158 were harvested at late exponential growth phase (OD<sub>600</sub> 0.7-0.8) as described in [15]. Total  
159 RNA was extracted as described [45] from three independent cultures for each condition.  
160 Residual DNA was removed using DNase (Turbo DNA-free kit Ambion). RNA integrity was  
161 analyzed using an Agilent Bioanalyzer (Agilent Biotechnologies). 23S and 16s rRNA were  
162 depleted from the samples using the MICROBExpress Bacterial mRNA enrichment kit  
163 (Invitrogen) and depletion was controlled on Agilent Bioanalyzer (Agilent Biotechnologies).  
164 For each library, the equivalent of 1 µg total RNA was treated with 5 U Tobacco Acid  
165 Phosphatase (Epicentre) during one hour to convert 5' end tri-phosphates to mono-phosphates.  
166 After extraction with 25:24:1 phenol:chloroform:isoamyl alcohol and ethanol precipitation,  
167 RNA was fragmented using a fragmentation reagent (Ambion) 5 min at 70°C. Strand specific  
168 RNA-seq libraries were prepared using Illumina Directional mRNA-Seq protocol (RNA  
169 ligation protocol). Sequencing indexes were introduced during the PCR step and final PCR  
170 products were purified twice with 1.3 volumes of AMPure beads to generate libraries ranging  
171 in size from 100 to 200 bp (insert size 30-130 bp). Multiplexed libraries (6 samples per lane)  
172 were sequenced on the Hi-Seq 2000 platform (Illumina) generating 6,300,000 to 40,000,000  
173 50-bp-long reads per sample.

174 **RNA-Seq data analysis.** We generated a reference sequence by combining the genome  
175 assembly of strain A20 and SNPs determined for strain WT2, see Results section, and this  
176 reference sequence was further used to map sequencing reads using bowtie-0.12.7 [46] after  
177 trimming of adapter sequences using cutadapt-1.2.1 (<http://code.google.com/p/cutadapt/>). Up



178 to two mismatches (with a seed sequence of 21) were allowed. Reads having more than one  
179 best-scoring position, including reads mapped to rRNAs, were discarded. The number of  
180 overlapping mapped reads was counted for every ORF in each sample using GenomicFeatures  
181 and GenomicRanges R packages. One replicate from strain CovS2 for each condition, THY,  
182 MgCl<sub>2</sub> and LL-37, were eliminated from further analysis because of a too low number of  
183 mapped reads or very divergent behavior during prior data analyses. Only genes with at least  
184 one count per million (cpm) in at least three samples were taken into account in further  
185 analyses. Normalization and differential expression analysis were performed using the  
186 Cox\_Reid profile-adjusted likelihood method for dispersion estimation implemented in EdgeR  
187 version 3.2.4 [47] using R version 3.0.1. The DeSEQ package analysis was also used for these  
188 analysis [48]. *p* values were calculated and adjusted for multiple testing using the false  
189 discovery rate controlling procedure [49].

190 **First-strand cDNA synthesis and quantitative PCR (qPCR).** Five µg of total RNA  
191 was used for first-strand cDNA synthesis using SuperScript<sup>TM</sup> II reverse transcriptase and  
192 random primers according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Life technologies).  
193 Quantitative PCR was carried out with SYBR Green PCR kits (Applied Biosystems, Life  
194 technologies) using six pairs of primers (Table 2). Relative quantification of specific gene  
195 expression was calculated with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method using *gyrA* as the housekeeping reference  
196 gene and expressed in Log<sub>2</sub>-fold change. Each assay was performed in triplicate on each of  
197 the 15 samples.

198 **Adhesion assays.** Human epithelial cell lines, pulmonary A549, keratinocytes HaCaT,  
199 epidermoid HEp-2 and endometrial Hec-1A, were used to evaluate bacterial adhesion. Cell  
200 lines were propagated as monolayers in DMEM medium (high glucose) supplemented with 2  
201 mM L-glutamine and 10% fetal calf serum at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> enriched atmosphere. For  
202 adherence assays, cells were plated at 3 x 10<sup>5</sup> cells/well in a tissue culture-treated 24-well

203 plate and incubated at 37°C for 48 hours. Then  $5 \times 10^5$  CFU of exponential phase GAS  
204 (multiplicity of infection, MOI = 1) in fresh DMEM medium (high glucose) supplemented  
205 with 2 mM L-glutamine were added to each well. The plate was centrifuged at 6600 RPM for  
206 10 minutes and incubated at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> enriched atmosphere for one hour. Cells  
207 were washed three times with PBS to remove unattached bacteria, and lysed with cold sterile  
208 H<sub>2</sub>O. Dilutions were plated on TH agar plates and incubated overnight at 37°C for  
209 enumeration of CFUs. Values are expressed as the percentage of adhesive bacteria relative to  
210 the total bacteria count observed after an hour of incubation.

211 **Macrophage phagocytosis and survival assays.** Murine macrophage cell-line  
212 RAW264.7 was used to perform phagocytosis and survival assays. Twenty-four well plates  
213 were seeded with  $5 \times 10^5$  RAW264.7 per well, in DMEM medium (high glucose)  
214 supplemented with 10% fetal calf serum at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> enriched atmosphere. After  
215 24 hours, mid-logarithmic phase bacterial cultures, resuspended in DMEM medium (high  
216 glucose) supplemented with 2 mM L-glutamine, were added at a multiplicity of infection  
217 (MOI) of 10. The plates were centrifuged at 6600 RPM for 10 min.

218 For phagocytosis assay the plates were incubated for one hour on ice. The non-adherent  
219 extracellular bacteria were eliminated by three PBS washes. One mL of DMEM medium  
220 (high glucose) supplemented with 2 mM L-glutamine was added in each well and the plates  
221 were further incubated for 45 min [50]. Adhesive extracellular bacteria were subsequently  
222 killed by incubation with fresh medium containing 30 U/mL penicillin and 30 mg/mL  
223 streptomycin for 30 min at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Intracellular GAS were then recovered and  
224 enumerated by quantitative culture. Phagocytosis was expressed as the percentage of  
225 intracellular bacteria relative to the adhesive bacteria.

226 For the survival assays, the infected cells were, after the initial centrifugation step,  
227 incubated for 45 minutes at 37°C, then washed three times with PBS and treated with

228 penicillin-streptomycin for 30 min [50]. At time 0 (T0 corresponding to 30 min after addition  
229 of antibiotics) and at specific time points thereafter, intracellular GAS were recovered and  
230 serial dilutions were plated. Results were expressed as the percentage of intracellular GAS  
231 relative to T0. For all experiments, 3 independent assays in triplicate were carried out.

232 **Animal experiments.** The procedures were in agreement with the guidelines of the  
233 European Commission for the handling of laboratory animals, directive 86/609/EEC  
234 ([http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/home\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm)) and were approved by  
235 the Université Paris Descartes ethic committee. Female CD1 mice (6 weeks old, Charles  
236 River laboratories, France) were injected intravenously in the tail with  $5 \times 10^7$  cfus from  
237 exponentially growing bacteria. Animal survival was followed for ten days. The Gehan-  
238 Breslow-Wilcoxon test was used to analyze the data.

239

240 **RESULTS**

241 **An invasive and a pharyngeal strain, of independent clusters, harbor a mutation in *covS*.**

242 Twelve strains belonging to six clusters were sequenced and their draft genomes compared  
243 within the clusters. In two clusters the *covS* genes differed from one another (Table 1).

244 In the first cluster, that included two *emm11* strains, a single mutation in the *covS* gene  
245 lead to a frameshift and a stop codon at the 26<sup>th</sup> position. The strain harboring the wild-type  
246 *covS*, named WT1, was the colonization strain and that with a mutated *covS* gene, the  
247 predicted truncated synthesized peptide corresponding solely to first the membrane-spanning  
248 domain, was the invasive strain, named CovS1 (Fig. 1A).

249 For the second cluster, composed of two *emm1* strains, the contig sequences were  
250 compared to published complete genome sequences of *emm1* strains and found to be very  
251 similar to the genome sequence of strain A20 isolated from a patient with necrotizing fasciitis  
252 [51]. The cluster 2 strains differed from the A20 strain by less than 60 SNPs (as determined  
253 by nucmer analysis [52]). A single nucleotide difference was observed between the *covS*  
254 genes of the two cluster strains. It led, in one strain, termed CovS2, to the substitution of a  
255 conserved tyrosine residue at position 39 by a histidine residue (Y39H); this residue is located  
256 at the end of the first membrane-spanning domain and is highly conserved within CovS  
257 sequences (Fig 1B). The *covS* genes from the other cluster 2 strain (WT2) and A20 are  
258 identical. In contrast, to what has been described and was found in the cluster 1 strains, the  
259 mutant CovS2 strain is the carriage strain, while the invasive strain harbors the wild-type *covS*  
260 allele (Table 1). To our knowledge this is the first description of this *covS* mutation [53], [54]  
261 and the first report of the carriage strain harboring a *covS* mutation.

262

263 **The truncation of CovS, but not the tyrosine-39 to histidine mutation, leads to**  
264 **impaired growth.** Mutations in *covS* have been described to yield growth defects. The

265 growth kinetics of the strains were consequently assayed and compared (Fig 2). The CovS1  
266 strain growth was impaired in THY compared to that of the WT1 strain (Fig. 2A). Adding  
267 human plasma at final concentration of 20% or 40% to THY yielded growth curves for CovS1  
268 similar to those of the WT1 strain, indicating that human plasma at these concentrations  
269 restored growth of the *covS* mutant strain (Fig. 2B). Since CovS has been described as the  
270 main sensor of extracellular  $Mg^{2+}$  [12, 13, 15], we evaluated the effect of extracellular  $Mg^{2+}$   
271 on the growth of the CovS1 strain. Adding  $MgCl_2$  at a final concentration of 15 mM restored  
272 the growth of the CovS1 strain (Fig 2C). Effect on growth of another divalent cation, namely  
273  $CaCl_2$ , was also tested. Adding  $CaCl_2$  at final concentration of 1 mM or 6 mM partially  
274 restored the growth of the CovS1 strain, the highest concentration yielding the larger effect  
275 (Fig. 2D). These results suggest that in an *emm11* strain, a *covS* mutant strain displays an  
276 impaired growth *in vitro*, as already described for *emm1* and *emm81* strains [33, 55]. In  
277 contrast to the growth defect observed in *covS* strains in this and other studies, the growth of  
278 the CovS2 strain was identical to that of WT2 (Fig. 2A). This result indicates that the  
279 mutation Y39H did not alter the growth of the CovS2 strain *in vitro*.

280

281 **The CovSY39H mutation yields atypical SpeB accumulation.** *speB* and *has*  
282 expression being differently controlled by CovRS, we decided to assess the accumulation of  
283 both SpeB and the polysaccharidic capsule in the wild-type and mutant strains of both clusters  
284 [6, 10, 28-31]. SpeB accumulation was assayed on supernatant proteins from exponential  
285 cultures ( $OD_{600}$  0.3-0.4) by immunoblot using specific anti-SpeB antibodies (Fig. 3A, B). The  
286 accumulation of SpeB was higher in the WT1 strain than in the CovS1 strain (Fig. 3A). The  
287 difference was quantified using ImageJ software on three independent experiments (Fig. 3B).  
288 The ratio between SpeB accumulation in CovS1 and WT1 is 55%. This result indicates that  
289 the loss of CovS impaired the expression of *speB* in the *emm11* background, as was already

290 described in other genetic backgrounds [10, 28-30]. In contrast to these results, there was a  
291 seemingly higher accumulation of SpeB in the CovS2 than in the WT2 strain (Fig 3A).  
292 Quantification of the dot-blot from three independent experiments indicated a non-significant  
293 difference (Fig 3B). This result suggests that the CovSY39H mutation identified in the CovS2  
294 strain did not impair but, in contrary, weakly enhanced the SpeB accumulation. No *covS*  
295 mutation with this phenotypic consequence has thus far been described.

296 Cell-associated capsular hyaluronic acid, the end product of the *has* operon, was  
297 assayed on the same cultures as SpeB. The results suggested differences in the levels of  
298 capsular accumulation with higher capsule yields reached by the CovS1 and CovS2 strains  
299 than by their wild-type counterparts; however the differences were not significant.  
300 Interestingly, whereas the two *covS* mutations did not yield the same variation of SpeB  
301 accumulation, they influenced similarly that of the hyaluronic acid, as if the behavior  
302 difference was solely observable on products of genes whose expression is de-repressed in  
303 both *covR* and *covS* mutant strains.

304 Altogether, these results suggest that CovS1 has a typical invasive phenotype, as  
305 described with other *covS* mutant strains, whereas CovS2 is atypical.

306

307 **The CovSY39H mutation yields a unique transcriptomic profile.** The phenotype of  
308 CovS2 strain was unusual for a *covS* mutant strain; to characterize the consequences of the  
309 CovSY39H mutation further, we compared the transcriptomic profile, determined by the  
310 RNAseq technique, of WT2 and CovS2 strains harvested at late exponential phase ( $OD_{600} =$   
311 0.7) grown in THY.

312 Statistical analyses of RNAseq data showed that 47 genes were differentially expressed,  
313 with a statistically significant difference (Table 3, Table S1) and a minimum fold change of 2.  
314 In particular, the expression of the genes encoding streptolysin 0 (*slo*), streptokinase (*ska*),

315 C5A-peptidase (*scpA*), secreted inhibitor of complement (sicC3-like ADP-ribosyltransferase  
316 (*spyA*)), collagen-like protein A (*sclA*), fibronectin-binding protein (*fbaA*), all known  
317 virulence factors [56, 57], was higher in the WT2 than in the CovS strain (Fig. 4A). In  
318 contrast, expression of the genes encoding exotoxin B (*speB*), immunoglobulin G-binding  
319 protein G (*grab*) and genes from the pilus locus, or FCT, was higher in the CovS2 than in the  
320 WT2 strain. The *has* genes were expressed at very low levels and their expression was not  
321 significantly different between both strains. In addition to variations in the expression of  
322 genes involved in virulence, the two strains also differed in the expression of metabolic genes,  
323 such as genes involved in pyrimidine (including the *pyrR* regulatory gene) and sugar  
324 metabolisms. To confirm the RNAseq results, we performed, on the same RNA samples, a  
325 quantitative RT-PCR analysis on several virulence genes whose expression is regulated by  
326 CovRS (Fig. 4B). The *speB* and, to a lesser extent, the *grab* genes were over-expressed in the  
327 CovS2 strain compared to the WT2 strain, while *ska* was slightly under-expressed and the  
328 transcription of *hasA* was not affected.

329 These results confirmed the RNAseq data and indicated that the variations in gene  
330 expression between WT2 and CovS2 are opposite to those classically described between wild-  
331 type and *covS* strains, where spontaneous *covS* strains are invasive strains: genes that are  
332 under-expressed, such as *speB* or *grab*, or over-expressed such as *slo* or *ska*, in the *covS*  
333 invasive strains, were, respectively, over-expressed and under-expressed in the CovS2 strain  
334 [12-15].

335 To further explore the phenotype of both strains, we tested the influence of  $Mg^{2+}$  on  
336 their transcriptomic profiles (Fig. 4C, 4D, Table 3, Table S1). The addition of 15 mM  $Mg^{2+}$  to  
337 the growth medium did not impact the growth of these strains (data not shown). Important  
338 changes in gene expression were observed for the wild-type WT2 strain in response to  $Mg^{2+}$ ,  
339 with at least 224 genes being differentially expressed (Table 3). Regarding virulence genes,

340 *speB*, *grab*, genes of the pilus locus and one *has* gene were over-expressed in the presence of  
341  $Mg^{2+}$ . In contrast, *sci*, *slo*, *spyA*, *spd3*, among others, were under-expressed (Fig. 4C). qRT-  
342 PCR confirmed the RNAseq results and showed that addition of  $Mg^{2+}$  results in an over-  
343 expression of *speB* and *grab* while the transcription of *speA*, *hasA* and *ska* was not affected  
344 (Fig. 4D, white bars). These results indicate that addition of  $Mg^{2+}$  elicited the same effects, as  
345 those already described, on the expression of GAS virulence genes in wild-type strains [12-  
346 15].

347 In contrast, fewer genes displayed a modified transcription in response to  $Mg^{2+}$ , in the  
348 CovS2 strain than in the WT2 strain (26 vs 224). While *speB* was over-expressed, although  
349 less than in the WT2 strain, the *grab* transcription was unmodified. This suggests that similar  
350 but weaker modifications were observed for “ $Mg^{2+}$ ” activated genes in the CovS2 strain  
351 compared to the WT2 strain (Fig. 4E). To note, very few genes (14), that, like *ska*, were  
352 under-expressed in presence of  $Mg^{2+}$  in WT2, displayed a modified expression in CovS2;  
353 among them *scpA* and *fbaA* displayed a more than a two-fold diminution. This supports that  
354 smaller variations are observed in CovS2 than in WT2. In conclusion, the *covSY39H* mutation  
355 gives rise to a strain that only weakly responds to addition of  $Mg^{2+}$ .

356 LL-37 has been shown to derepress CovR-repressed genes expression in some but not  
357 all GAS strains [12-15]; LL-37 and  $Mg^{2+}$  elicit opposite effects on the expression of CovRS-  
358 controlled genes [12-15]. Its influence on the gene expression of WT2 and CovS was  
359 consequently analyzed by RNAseq and confirmed by qRT-PCR (Fig. 4D, 4E, Table3, Table  
360 S1). The addition of LL-37 to the growth medium of the WT2 strain produced fewer  
361 transcription changes than that of  $Mg^{2+}$ , with only 111 genes being differentially expressed in  
362 THY+LL-37- versus THY-grown bacteria. Unexpectedly, *speB* and *grab* were over-expressed  
363 and *sdal*, *ska*, and *slo* were under-expressed, indicating that LL-37 elicited, in the WT2  
364 strain, a response similar to that produced by the addition of  $Mg^{2+}$  (Fig. 4E). LL-37 has



365 similar albeit weaker effects than  $Mg^{2+}$  on the expression of CovRS-controlled genes in WT2.  
366 The consequences produced by LL-37 on the CovS2 gene expression was nevertheless  
367 assessed, by RNAseq and qRT-PCR, and compared to that of  $Mg^{2+}$  on the same strain and of  
368 LL-37 on WT2 gene transcription (Fig. 4D, Table 3, Table S1). LL-37 had barely any effect  
369 on CovS2, with the transcription of only one to two genes being modified. As in WT2, *speB*  
370 was over-expressed in response to LL-37, although variations were not statistically  
371 significant.

372 These results indicate that, surprisingly, LL-37 and  $Mg^{2+}$  did not have opposite effects  
373 in the wild-type strain and that the effect was strongly attenuated in the CovS2 strain  
374 compared to the WT2 strain.

375

376  **$Mg^{2+}$  and LL-37 influence SpeB accumulation in WT2 but not in CovS2 strain.** To  
377 determine phenotypic consequences of the transcription variations, we assayed SpeB and  
378 hyaluronic acid accumulation produced by these strains cultured in the different growth media  
379 at two time points, early ( $OD_{600}$  0.3-0.4) and late ( $OD_{600}$  0.6-0.7) exponential phases (Fig. 5).  
380 Total proteins were precipitated and an immunoblot analysis was performed with specific  
381 anti-SpeB antibodies. In early exponential phase, SpeB accumulation was, in neither WT2 nor  
382 CovS2, affected by addition of either  $Mg^{2+}$  or LL-37 (Fig. 5A). Furthermore, the absence of  
383 significant difference between both strains, but a trend to more SpeB in the CovS2 strain, was  
384 confirmed (Fig. 1B, 5A). In late exponential phase, the CovS2 strain accumulated at least  
385 three times as much SpeB as WT2 in THY ( $P < 0.001$ ), supporting the transcription results.  
386 Addition of LL-37 yielded a slight increase of SpeB accumulation in the WT2 strain,  
387 phenotype usually described when  $Mg^{2+}$  is added, and a small but not significant one in  
388 presence of  $Mg^{2+}$ . This confirms the absence of opposite effect elicited by these two

389 environmental cues in the WT2 strain. The level of SpeB accumulation by CovS2 was similar  
390 in all conditions confirming that CovS became hypo-responsive to these signals.

391 Effects of Mg<sup>2+</sup> or LL-37 on capsular HA production was also studied in WT2 and  
392 CovS2 strains grown to exponential phase. HA level appeared slightly, but not significantly,  
393 higher in the CovS2 strain than in the WT2 strain grown in THY (Fig. 5B). Adding Mg<sup>2+</sup> or  
394 LL-37 to THY did not alter significantly the level of HA production in either strain. Addition  
395 of LL-37 yielded a slight, but not significant, increased HA production in WT2. These results  
396 also support the transcription data, where no significant differences were observed.

397

398 **WT2 and CovS2 adhere similarly to epithelial cells.** Adherence to eukaryotic cells is  
399 critical for GAS colonization, an important step of GAS infections. We thus tested the  
400 capacity of each of the Cluster2 strains to adhere to several relevant epithelial cell lines; Hep-  
401 2 (human larynx carcinoma cells), A549 (human lung adenocarcinoma cells), HaCaT (human  
402 kératinocytes) and Hec-1A (endometrial adenocarcinoma cell). The results are expressed as  
403 percentage of adherence after a one-hour infection period (Table 4). No differences were  
404 observed between the adherence capacities of WT2 and CovS2. However, these were variable  
405 according to the cell-line type. The highest adherence was observed with Hep-2 cells line and  
406 the weakest with Hec-1A. These data suggest that the *covSY39H* mutation does not affect  
407 GAS adherence capacities.

408

409 **The CovS2 strain is impaired in its intra-cellular survival capacity.** The role of  
410 macrophages in the early steps of GAS infection remains unclear; they can kill GAS or the  
411 bacteria can survive and even multiply in the macrophage [58-60]. They may constitute a  
412 reservoir for GAS dissemination as macrophage intracellular persistence and multiplication  
413 have been described in an *emm1* GAS strain [60]. A phagocytosis assay was performed with

414 murine RAW macrophages using an MOI of 10 bacteria per macrophage (Fig. 6). After a 45  
415 minute-infection period, WT2 and CovS2 strains were both phagocytosed at similar levels  
416 (Fig 6A). The macrophage survival assay indicated that two hours post-infection the WT2  
417 strain survived significantly better than the CovS2 strain ( $p=0.0149$ ). No significant  
418 differences were observed at other time points. This suggests that the *covSY39H* mutation  
419 may alter the survival in macrophages.

420

421 **The CovS2 strain is less virulent than the WT2 strain.** The classical *covS* mutant  
422 strain being more virulent in models of invasive infections and the CovS2 strain displaying an  
423 atypical phenotype, we assessed whether the virulence of this strain would be modified. Mice  
424 were infected intravenously with two doses of each of the strains ( $2$  to  $4 \times 10^8$  and  $4$  to  $5 \times 10^7$ )  
425 cfus and survival was followed (Fig. 7). For all doses tested, the CovSS2 strain was less  
426 virulent ( $p = 0.0049$  and  $p = 0.0005$ , for the higher and the lower dose, respectively).

427

428 **DISCUSSION**

429 To decipher mechanisms involved in the switch from colonization to invasive strains,  
430 we isolated clusters of such strains and sequenced their genomes. Two clusters displayed  
431 mutations in *covS*. The first one followed an already described situation, albeit for the first  
432 time in an *emm11* strain, with the invasive strain harboring the *covS* mutation. Growth of *covS*  
433 strains is impaired; interestingly, addition of plasma restored growth of the *covS* strain  
434 suggesting that the growth defect has no *in vivo* consequences once the bacteria have reached  
435 the blood, accounting in part for their hyper-virulent phenotype in invasive diseases.  
436 Furthermore, addition of  $Mg^{2+}$  also restored growth, indicating that the bacterial metabolism  
437 is influenced by  $Mg^{2+}$  via CovRS-independent regulatory pathways. Addition of  $Ca^{2+}$ , which  
438 does not modify the expression of the genes from the CovR regulon [13], also partially  
439 restored growth, the involved pathway and that of  $Mg^{2+}$  could be linked. Hyper capsulation of  
440 mutant strains is the means by which the CovRS TCS was initially described [6], yet no  
441 significant difference in capsulation was observed between WT1 and CovS1 strains. This  
442 could be due to other regulators, such as CvfA or other yet non-described regulator,  
443 displaying a more prominent role in the expression of the *has* operon in *emm11* strains than in  
444 other genetic backgrounds [61]. This result also supports the notion that the capsule is not the  
445 sole virulence factor responsible for the *in vivo* selection of *covRS* mutations.

446 The second cluster was atypical with the colonization strain harboring a *covS* mutation.  
447 Comparing the gene expression profile of both strains indicated that the *covSY39H* mutation  
448 had important consequences on the expression of genes belonging to the CovR regulon,  
449 having opposite effect to that displayed by other *covS* mutations. The CovSY39H protein  
450 could be overacting in its role towards CovR, the wild-type WT2 strain displaying an  
451 intermediate phenotype between CovS2 and classical *covS* mutant strains. The consequences  
452 on gene expression of adding  $Mg^{2+}$ , a CovS specific signal, to the growth medium were

453 different: they were not opposite between both strains, but very weak in the CovS2 strain.  
454 This suggests that the CovSY39H protein has a reduced ability to detect this signal; it may be  
455 in a conformation that is barely receptive to the environment. Altogether these results suggest  
456 that the conformation of the mutant protein could be such that either no signal or a lower  
457 concentration of signaling molecules is required to yield the active state. Unfortunately, in our  
458 hands LL-37 and  $Mg^{2+}$  did not elicit opposite effects on the wild-type strain gene expression;  
459 in fact it produced, although at a lower level, the same modifications as  $Mg^{2+}$ . Consequently,  
460 we could not assay the effect of a signal that alters CovS kinase properties in opposite way to  
461 that of  $Mg^{2+}$ . The simplest hypothesis for the discrepancy between the described effect of LL-  
462 37 and our data is the product which is not of the same origin (Sigma versus prepared [15],  
463 [62]). Noticeably, the response of the CovS2 strain was nearly non-existent.

464 In the course of this work, we observed that the effect on SpeB accumulation mediated  
465 via CovRS is more important during late exponential phase than during early exponential  
466 phase; this was also observed at the transcriptional level as assayed by qRT-PCR (data not  
467 shown). *speB* expression varies during growth and is maximal at the end of the exponential  
468 phase [63], accounting for the variation in expression being observed at late time points.

469 The genes encoding the pilus constituents were over-expressed after addition of  $Mg^{2+}$  in  
470 the WT2 strain, whereas, to our knowledge, this locus was not previously described as a target  
471 of the CovRS system. This is consistent with the role of the pilus in epithelial and pharyngeal  
472 cell adhesion and  $Mg^{2+}$ -induced modifications of gene expression corresponding to the  
473 colonization stage [64-66].

474 The immune pressure selects *in vivo* *covR* or *covS* mutations that enable the switch from  
475 colonization to invasive phenotype and, among the immune system components, macrophages  
476 play an important role, either killing or being a reservoir to GAS [58-60]. The CovSY39H  
477 strain does not, in contrast to the WT2 strain, multiply during the first hours after

478 phagocytosis suggesting a weaker invasive ability, than the wild-type strain. This was  
479 confirmed by *in vivo* experiments, in which WT2 was more virulent than CovS2 in an  
480 invasive model of infection. These results account for this mutant strain being a colonization  
481 strain. Many data has been accumulated, either by analyzing *in vivo* selected strains or by  
482 comparing *in vivo* properties of constructed *covS* mutants, supporting that *covS* mutant strains  
483 have an invasive phenotype. It has also been demonstrated that these mutants were  
484 outcompeted in non-invasive infections, that there is a fitness cost in the naso-pharynx for  
485 these strains [30, 67]. Until now no mutant displaying a colonization phenotype has been  
486 isolated or constructed. The CovS2 strain, that was isolated from a healthy carrier during an  
487 epidemiological survey concerning an invasive case of GAS infection, has all the *in vitro*  
488 characteristics of a specialized colonization strain. This further supports the requirement for a  
489 wild-type *covRS* in GAS to permit dissemination, colonization and invasion. Finally, further  
490 analysis of the CovSY39H protein, determination of its structure, of its interaction with CovR  
491 would broaden our knowledge on GAS CovRS TCS and possibly on kinases from other TCS.  
492

- 494 1. Cunningham, M.W., *Pathogenesis of group A streptococcal infections*. Clin Microbiol Rev, 495 2000. **13**(3): p. 470-511.
- 496 2. Kotb, M., et al., *An immunogenetic and molecular basis for differences in outcomes of* 497 *invasive group A streptococcal infections*. Nat Med, 2002. **8**(12): p. 1398-404.
- 498 3. Bessen, D.E., T.R. Fiorentino, and S.K. Hollingshead, *Molecular markers for throat and skin* 499 *isolates of group A streptococci*. Adv Exp Med Biol, 1997. **418**: p. 537-43.
- 500 4. Bessen, D.E., et al., *Genetic correlates of throat and skin isolates of group A streptococci*. J 501 Infect Dis, 1996. **173**(4): p. 896-900.
- 502 5. Kreikemeyer, B., K.S. McIver, and A. Podbielski, *Virulence factor regulation and regulatory* 503 *networks in Streptococcus pyogenes and their impact on pathogen-host interactions*. Trends 504 Microbiol, 2003. **11**(5): p. 224-32.
- 505 6. Levin, J.C. and M.R. Wessels, *Identification of csrR/csrS, a genetic locus that regulates* 506 *hyaluronic acid capsule synthesis in group A Streptococcus*. Mol Microbiol, 1998. **30**(1): p. 507 209-19.
- 508 7. Graham, M.R., et al., *Virulence control in group A Streptococcus by a two-component gene* 509 *regulatory system: global expression profiling and in vivo infection modeling*. Proc Natl Acad 510 Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13855-60.
- 511 8. Churchward, G., *The two faces of Janus: virulence gene regulation by CovR/S in group A* 512 *streptococci*. Mol Microbiol, 2007. **64**(1): p. 34-41.
- 513 9. Dalton, T.L., et al., *RscA, a member of the MDR1 family of transporters, is repressed by CovR* 514 *and required for growth of Streptococcus pyogenes under heat stress*. J Bacteriol, 2006. 515 **188**(1): p. 77-85.
- 516 10. Sumby, P., et al., *Genome-wide analysis of group a streptococci reveals a mutation that* 517 *modulates global phenotype and disease specificity*. PLoS Pathog, 2006. **2**(1): p. e5.
- 518 11. Dalton, T.L. and J.R. Scott, *CovS inactivates CovR and is required for growth under* 519 *conditions of general stress in Streptococcus pyogenes*. J Bacteriol, 2004. **186**(12): p. 520 3928-37.
- 521 12. Gryllos, I., et al., *Mg(2+) signalling defines the group A streptococcal CsrRS (CovRS)* 522 *regulon*. Mol Microbiol, 2007. **65**(3): p. 671-83.
- 523 13. Gryllos, I., J.C. Levin, and M.R. Wessels, *The CsrR/CsrS two-component system of group A* 524 *Streptococcus responds to environmental Mg2+*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 525 4227-32.
- 526 14. Gryllos, I., et al., *Induction of group A Streptococcus virulence by a human antimicrobial* 527 *peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(43): p. 16755-60.
- 528 15. Tran-Winkler, H.J., et al., *Signal transduction through CsrRS confers an invasive phenotype* 529 *in group A Streptococcus*. PLoS Pathog, 2011. **7**(10): p. e1002361.
- 530 16. Churchward, G., et al., *Regulation of streptokinase expression by CovR/S in Streptococcus* 531 *pyogenes: CovR acts through a single high-affinity binding site*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 532 2): p. 566-75.
- 533 17. Federle, M.J. and J.R. Scott, *Identification of binding sites for the group A streptococcal* 534 *global regulator CovR*. Mol Microbiol, 2002. **43**(5): p. 1161-72.
- 535 18. Gao, J., et al., *Binding of the global response regulator protein CovR to the sag promoter of* 536 *Streptococcus pyogenes reveals a new mode of CovR-DNA interaction*. J Biol Chem, 2005. 537 **280**(47): p. 38948-56.
- 538 19. Gusa, A.A. and J.R. Scott, *The CovR response regulator of group A streptococcus (GAS) acts* 539 *directly to repress its own promoter*. Mol Microbiol, 2005. **56**(5): p. 1195-207.
- 540 20. Gusa, A.A., et al., *Phosphorylation of the group A Streptococcal CovR response regulator* 541 *causes dimerization and promoter-specific recruitment by RNA polymerase*. J Bacteriol, 2006. 542 **188**(13): p. 4620-6.
- 543 21. Berge, A. and L. Bjorck, *Streptococcal cysteine proteinase releases biologically active* 544 *fragments of streptococcal surface proteins*. J Biol Chem, 1995. **270**(17): p. 9862-7.
- 545 22. Collin, M. and A. Olsen, *Effect of SpeB and EndoS from Streptococcus pyogenes on human* 546 *immunoglobulins*. Infect Immun, 2001. **69**(11): p. 7187-9.

- 547 23. Eriksson, A. and M. Norgren, *Cleavage of antigen-bound immunoglobulin G by SpeB*  
548 *contributes to streptococcal persistence in opsonizing blood.* Infect Immun, 2003. **71**(1): p.  
549 211-7.
- 550 24. Kuo, C.F., et al., *Degradation of complement 3 by streptococcal pyrogenic exotoxin B inhibits*  
551 *complement activation and neutrophil opsonophagocytosis.* Infect Immun, 2008. **76**(3): p.  
552 1163-9.
- 553 25. Nyberg, P., et al., *SpeB modulates fibronectin-dependent internalization of Streptococcus*  
554 *pyogenes by efficient proteolysis of cell-wall-anchored protein F1.* Microbiology, 2004.  
555 **150**(Pt 5): p. 1559-69.
- 556 26. Terao, Y., et al., *Group A streptococcal cysteine protease degrades C3 (C3b) and contributes*  
557 *to evasion of innate immunity.* J Biol Chem, 2008. **283**(10): p. 6253-60.
- 558 27. Wei, L., et al., *Impact of the SpeB protease on binding of the complement regulatory proteins*  
559 *factor H and factor H-like protein 1 by Streptococcus pyogenes.* Infect Immun, 2005. **73**(4): p.  
560 2040-50.
- 561 28. Aziz, R.K., et al., *Invasive MIT1 group A Streptococcus undergoes a phase-shift in vivo to*  
562 *prevent proteolytic degradation of multiple virulence factors by SpeB.* Mol Microbiol, 2004.  
563 **51**(1): p. 123-34.
- 564 29. Walker, M.J., et al., *DNase SdaI provides selection pressure for a switch to invasive group A*  
565 *streptococcal infection.* Nat Med, 2007. **13**(8): p. 981-5.
- 566 30. Trevino, J., et al., *CovS simultaneously activates and inhibits the CovR-mediated repression of*  
567 *distinct subsets of group A Streptococcus virulence factor-encoding genes.* Infect Immun,  
568 2009. **77**(8): p. 3141-9.
- 569 31. Heath, A., et al., *A two-component regulatory system, CsrR-CsrS, represses expression of*  
570 *three Streptococcus pyogenes virulence factors, hyaluronic acid capsule, streptolysin S, and*  
571 *pyrogenic exotoxin B.* Infect Immun, 1999. **67**(10): p. 5298-305.
- 572 32. Engleberg, N.C., et al., *Spontaneous mutations in the CsrRS two-component regulatory system*  
573 *of Streptococcus pyogenes result in enhanced virulence in a murine model of skin and soft*  
574 *tissue infection.* J Infect Dis, 2001. **183**(7): p. 1043-54.
- 575 33. Garcia, A.F., et al., *An insert in the covS gene distinguishes a pharyngeal and a blood isolate*  
576 *of Streptococcus pyogenes found in the same individual.* Microbiology, 2010. **156**(Pt 10): p.  
577 3085-95.
- 578 34. Hollands, A., et al., *Genetic switch to hypervirulence reduces colonization phenotypes of the*  
579 *globally disseminated group A streptococcus MIT1 clone.* J Infect Dis, 2010. **202**(1): p. 11-9.
- 580 35. Carapetis, J.R., et al., *The global burden of group A streptococcal diseases.* Lancet Infect Dis,  
581 2005. **5**(11): p. 685-94.
- 582 36. Bisno, A.L., M.O. Brito, and C.M. Collins, *Molecular basis of group A streptococcal*  
583 *virulence.* Lancet Infect Dis, 2003. **3**(4): p. 191-200.
- 584 37. Li, Z., et al., *Array of M protein gene subtypes in 1064 recent invasive group A streptococcus*  
585 *isolates recovered from the active bacterial core surveillance.* J Infect Dis, 2003. **188**(10): p.  
586 1587-92.
- 587 38. Beall, B., R. Facklam, and T. Thompson, *Sequencing emm-specific PCR products for routine*  
588 *and accurate typing of group A streptococci.* J Clin Microbiol, 1996. **34**(4): p. 953-8.
- 589 39. Zerbino, D.R. and E. Birney, *Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de*  
590 *Bruijn graphs.* Genome Res, 2008. **18**(5): p. 821-9.
- 591 40. Darling, A.C., et al., *Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with*  
592 *rearrangements.* Genome Res, 2004. **14**(7): p. 1394-403.
- 593 41. Li, H. and R. Durbin, *Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler*  
594 *transform.* Bioinformatics, 2009. **25**(14): p. 1754-60.
- 595 42. Li, H., et al., *The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.* Bioinformatics, 2009.  
596 **25**(16): p. 2078-9.
- 597 43. Milne, I., et al., *Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data.*  
598 Brief Bioinform, 2013. **14**(2): p. 193-202.
- 599 44. Schrager, H.M., J.G. Rheinwald, and M.R. Wessels, *Hyaluronic acid capsule and the role of*  
600 *streptococcal entry into keratinocytes in invasive skin infection.* J Clin Invest, 1996. **98**(9): p.  
601 1954-8.



- 602 45. Lamy, M.C., et al., *CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory*  
603 *system involved in virulence*. Mol Microbiol, 2004. **54**(5): p. 1250-68.
- 604 46. Langille MG, Hsiao WW, and B. FS., *Detecting genomic islands using bioinformatics*  
605 *approaches*. Nat Rev Microbiol. , 2010. **8**: p. 373-82.
- 606 47. Robinson, M., D. McCarthy, and G. Smyth, *edgeR: a Bioconductor package for differential*  
607 *expression analysis of digital gene expression data*. Bioinformatics. , 2010. **26**: p. 139-140.
- 608 48. Anders, S., et al., *Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using*  
609 *R and Bioconductor*. Nat Protoc, 2013. **8**(9): p. 1765-86.
- 610 49. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, *Controlling the false discovery rate: a practical and*  
611 *powerful approach to multiple testing*. Journal of the Royal Statistical Society Series B:  
612 *Statistical Methodology*, 1995. **57**: p. 289–300.
- 613 50. Gratz, N., et al., *Group A streptococcus activates type I interferon production and MyD88-*  
614 *dependent signaling without involvement of TLR2, TLR4, and TLR9*. J Biol Chem, 2008.  
615 **283**(29): p. 19879-87.
- 616 51. Zheng, P., et al., *Complete Genome Sequence of emm1 Streptococcus pyogenes A20, a Strain*  
617 *with an Intact Two-Component System, CovRS, Isolated from a Patient with Necrotizing*  
618 *Fasciitis*. Genome Announc., 2013. **1**: p. e00149-12.
- 619 52. Kurtz, S., et al., *Versatile and open software for comparing large genomes*. Genome Biology,  
620 2004. **5**: p. R12.
- 621 53. Beres, S.B., et al., *Molecular complexity of successive bacterial epidemics deconvoluted by*  
622 *comparative pathogenomics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(9): p. 4371-6.
- 623 54. Ikebe, T., et al., *Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes*  
624 *in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates*. PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p.  
625 e1000832.
- 626 55. Tatsuno, I., et al., *Partial loss of CovS function in Streptococcus pyogenes causes severe*  
627 *invasive disease*. BMC Res Notes, 2013. **6**: p. 126.
- 628 56. Hoff, J., et al., *SpyA, a C3-like ADP-ribosyltransferase, contributes to virulence in a mouse*  
629 *subcutaneous model of Streptococcus pyogenes infection*. Infect Immun. , 2011. **79**: p. 2404-  
630 11.
- 631 57. O'Seaghda, M. and M. Wessels, *Streptolysin O and its co-toxin NAD-glycohydrolase protect*  
632 *group A Streptococcus from Xenophagic killing*. PLoS Pathog, 2013. **9**: p. e1003394.
- 633 58. Goldmann, O., et al., *Role of macrophages in host resistance to group A streptococci*. Infect  
634 Immun, 2004. **72**(5): p. 2956-63.
- 635 59. Thulin, P., et al., *Viable group A streptococci in macrophages during acute soft tissue*  
636 *infection*. PLoS Med, 2006. **3**(3): p. e53.
- 637 60. Herten, E., et al., *M1 protein-dependent intracellular trafficking promotes persistence and*  
638 *replication of Streptococcus pyogenes in macrophages*. J Innate Immun, 2010. **2**(6): p. 534-  
639 45.
- 640 61. Kang, S.O., et al., *Thermoregulation of capsule production by Streptococcus pyogenes*. PLoS  
641 One, 2012. **7**(5): p. e37367.
- 642 62. Sawai, M.V., et al., *Impact of single-residue mutations on the structure and function of*  
643 *ovispirin/novispirin antimicrobial peptides*. Protein Eng, 2002. **15**(3): p. 225-32.
- 644 63. Unnikrishnan, M., J. Cohen, and S. Sriskandan, *Growth-phase-dependent expression of*  
645 *virulence factors in an MIT1 clinical isolate of Streptococcus pyogenes*. Infect Immun, 1999.  
646 **67**(10): p. 5495-9.
- 647 64. Abbot, E., et al., *Pili mediate specific adhesion of Streptococcus pyogenes to human tonsil and*  
648 *skin*. Cell Microbiol, 2007. **9**: p. 1822-33.
- 649 65. Köller, T., et al., *MIT1 group A streptococcal pili promote epithelial colonization but*  
650 *diminish systemic virulence through neutrophil extracellular entrapment*. J Med Microbiol.,  
651 2010. **88**: p. 371-81.
- 652 66. Manetti, A., et al., *Streptococcus pyogenes pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm*  
653 *formation*. Mol Microbiol., 2007. **64**: p. 968-83.
- 654 67. Alam, F.M., et al., *Inactivation of the CovR/S virulence regulator impairs infection in an*  
655 *improved murine model of Streptococcus pyogenes naso-pharyngeal infection*. PLoS One,  
656 2013. **8**(4): p. e61655.

- 657 68. Plainvert, C., et al., *Invasive group A streptococcal infections in adults, France (2006-2010)*.  
658 Clin Microbiol Infect, 2012. **18**(7): p. 702-710.
- 659 69. Cady, A., et al., *Clonal spread of Streptococcus pyogenes emm44 among homeless persons,*  
660 *Rennes, France*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(2): p. 315-7.

661

662

663 **Table 1 Clinical group A *Streptococcus* strains studied.**

Cluster	Strain	Sex	Age	Sample origin	Clinical symptoms	<i>emm</i> genotype <sup>a</sup>	PFGE pattern <sup>b</sup>
Cluster 1	CovS1	F	56	Blood culture	Peritonitis + STSS	<i>emm11</i>	11-A3
	WT1	M	54	Throat swab	Pharyngeal carriage	<i>emm11</i>	11-A3
Cluster 2	WT2	M	36	Blood culture	NF + STSS	<i>emm1</i>	1-A
	CovS2	M	7	Throat swab	Pharyngeal carriage	<i>emm1</i>	1-A

664 <sup>a</sup>, *emm* genotype was obtained as previously described [68]. <sup>b</sup>, pulse field gel electrophoresis (PFGE)  
665 patterns were determined as previously described [69].

666

667 **Table 2. Primer sequences.**

<b>Oligonucleotides</b>	<b>Sequence (5'→3')</b>	<b>Target gene</b>
gyrA1	GCCATGAGTGTCATTGTGGC	<i>gyrA</i>
gyrA2	GGCGATAACTCCACCACTGA	<i>gyrA</i>
speA1	CGCAAGAGGTATTTGCTCAA	<i>speA</i>
speA2	GCCATCTCTTGGTTCTTAAG	<i>speA</i>
speB1	CCGCTGGTAGAGTATCCTA	<i>speB</i>
speB2	GCTAACCCAGTATTTGCCG	<i>speB</i>
grab3	GGCCGTAATATTACTTTCGGAG	<i>grab</i>
grab4	GCTACAGTTTATAATAGCTTGAAAGAC	<i>grab</i>
has1	GGAACATCAACTGTAGGAATTTAT	<i>hasA</i>
has2	GCATCTGTGTTTGA ACTCC	<i>hasA</i>
ska1	GCACTGCTGTTTGCATTAAC	<i>ska</i>
ska2	GCAAATGGTTTTGATTTTGGACT	<i>ska</i>

668

669

670 **Table 3. Analysis of differentially regulated genes**

	WT2 vs CovS2 THY	WT2 Mg <sup>2+</sup> vs THY	WT2 LL-37 vs THY	CovS2 Mg <sup>2+</sup> vs THY	CovS2 LL-37 vs THY
edgeR	54	315	172	28	2
deSEQ	47	411	168	19	1

671 The analysis was conducted using two packages.

672

673 **Table 4. WT2 and CovS2 adhere similarly to various epithelial cell lines.**

	Percentage of adhesion to cell lines*			
	Hep-2	A549	HaCaT	Hec-1A
WT2	45.6 ± 6.1	22.3 ± 2.9	35.2 ± 5.4	4.6 ± 0.7
CovS2	35.3 ± 5.3	23 ± 2.6	31.6 ± 6	5.6 ± 0.9

674 \*Cells were infected at an MOI of 1 bacteria per cell for 1 h at 37°C and the adherence  
675 frequencies were calculated as the number of bacteria remaining attached to the cells after the  
676 incubation period with respect to the total number of bacteria numbered at the end of the  
677 infection period. Results are represented as mean values (±SEM) of at least three experiments.

**A**

	1	10	20	30	40	50
WT1	MENQKQKQKQK	KYKNSLPKRLS	NIFFVLFFCIFS	AFTLIA	<b>YS</b> SSTNYFLLKKE	
CovS1	MENQKQKQKQK	KYKNSLPKRLS	NIFFV*			

**B**

	1	10	20	30	40	50
WT2	MENQKQKQKQK	KYKNSLPKRLS	NIFFVLFFCIFS	AFTLIA	<b>YS</b> SSTNYFLLKKE	
CovS2	MENQKQKQKQK	KYKNSLPKRLS	NIFFVLFFCIFS	AFTLIA	<b>H</b> SSTNYFLLKKE	

FIG. 1. Alignment of the first 50 amino acid residues of the predicted CovS proteins of clusters 1 (A) and 2 (B) strains. The numbers indicate the amino acid residue position, the Tyrosine and Histidine in position 39 are in bold.

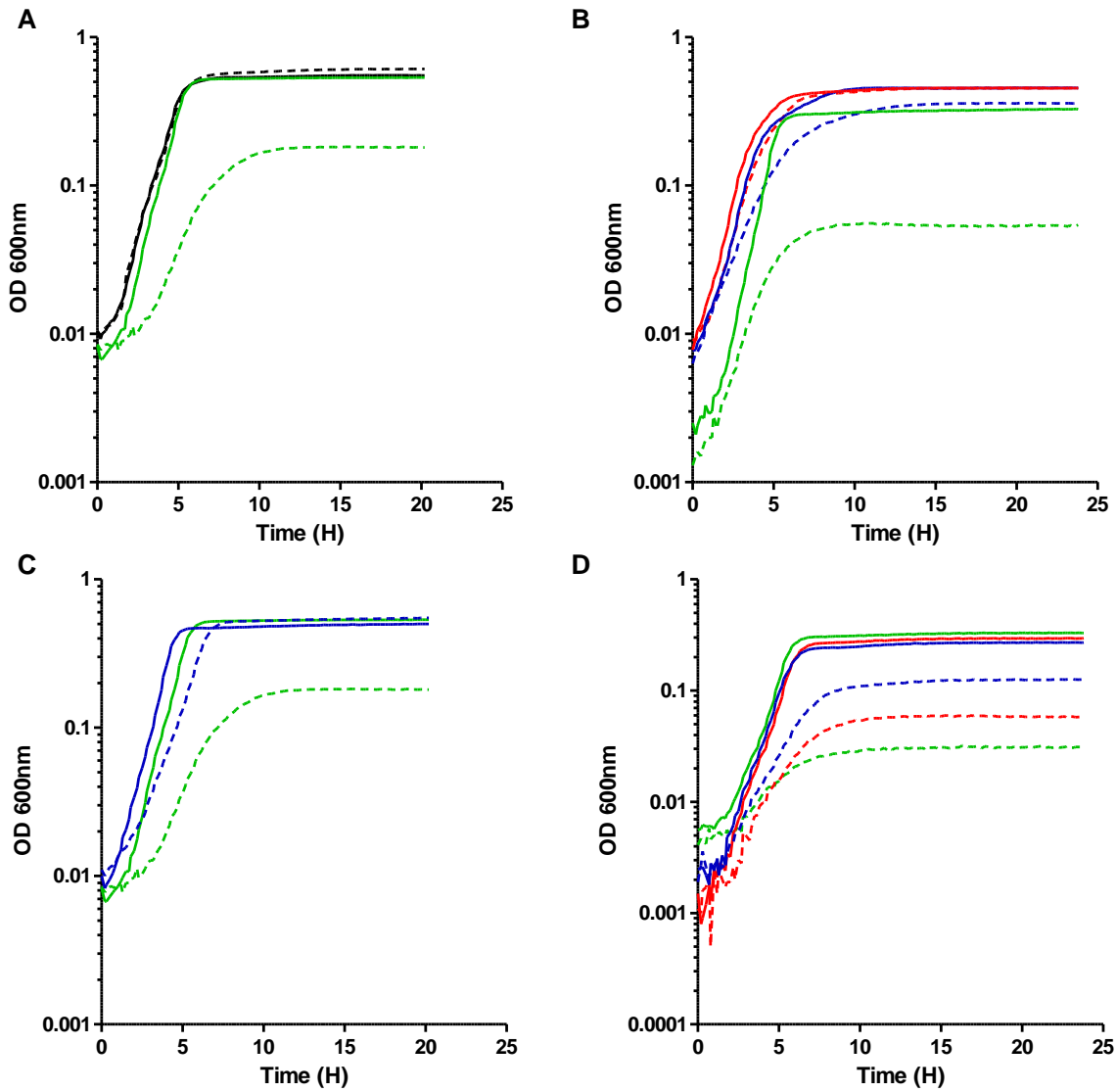
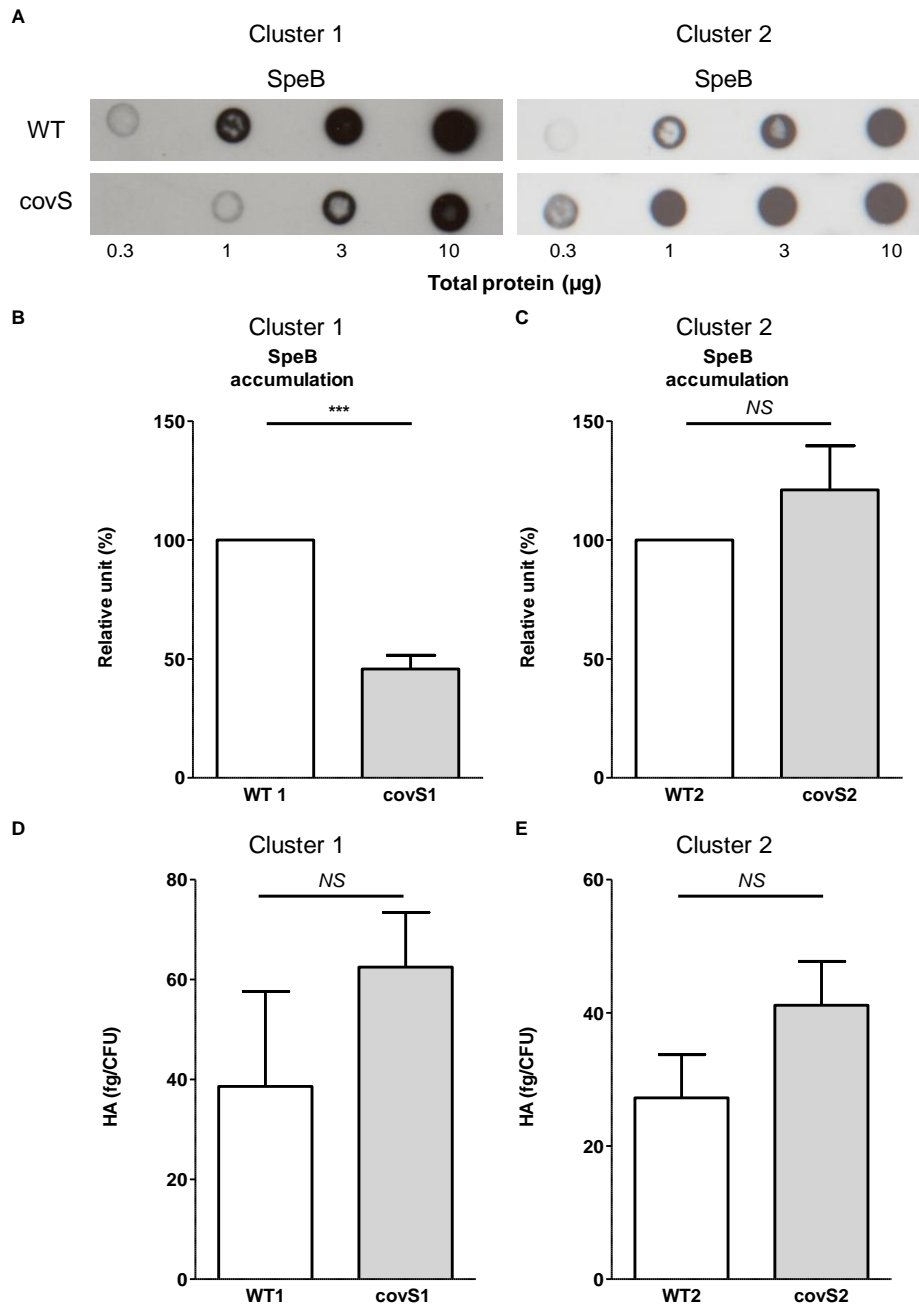


FIG. 2. The growth of CovS1, but not that of CovS2, is affected in THY and restored by supplementation with human plasma or MgCl<sub>2</sub>. Cluster 1 strains (A,B,C,D) and cluster 2 strains (A) were grown in (A) THY or in THY supplemented with (B) human plasma, (C) MgCl<sub>2</sub> and (D) CaCl<sub>2</sub>. Continuous lines, wild-type strains; dotted lines, mutant strains; green lines, cluster 1 strains grown in THY. (A) black lines, cluster 2 strains in THY. (B,C,D) Cluster 1 strains grown in THY supplemented with, (B) blue lines, 40% human plasma; red lines, 20% human plasma. (C) blue lines, 15 mM MgCl<sub>2</sub>. (D) blue lines, 6 mM CaCl<sub>2</sub>; red lines, 1 mM CaCl<sub>2</sub>. The experiments were carried out three times and the results of single representative experiments are presented.





**FIG 3. The *covSY39H* mutation does not affect SpeB or HA accumulation.** (A) Dot blots were used to assay accumulation of SpeB. The total proteins were precipitated from the supernatant of exponential THY grown bacteria (OD 0.3 - 0.4). Results of single representative experiments are presented. (B,C) Dot Blots were analyzed by ImageJ software. SpeB accumulation is presented as the percentage of that with the WT strain in (B) cluster 1, (C) cluster 2. The data represent the mean and standard error of the mean from three independently performed experiments. Asterisks indicate significance levels compared to WT strain as calculated by the two-tailed paired Student's test ( $***P < 0.0001$ ). (D,E) Cell-associated hyaluronic acid (HA) levels from mid-exponential THY grown bacteria are expressed as femtogram (fg) of HA per CFU. The data represent the mean and standard error of the mean from at least three independently performed experiments. *NS*, not significant.

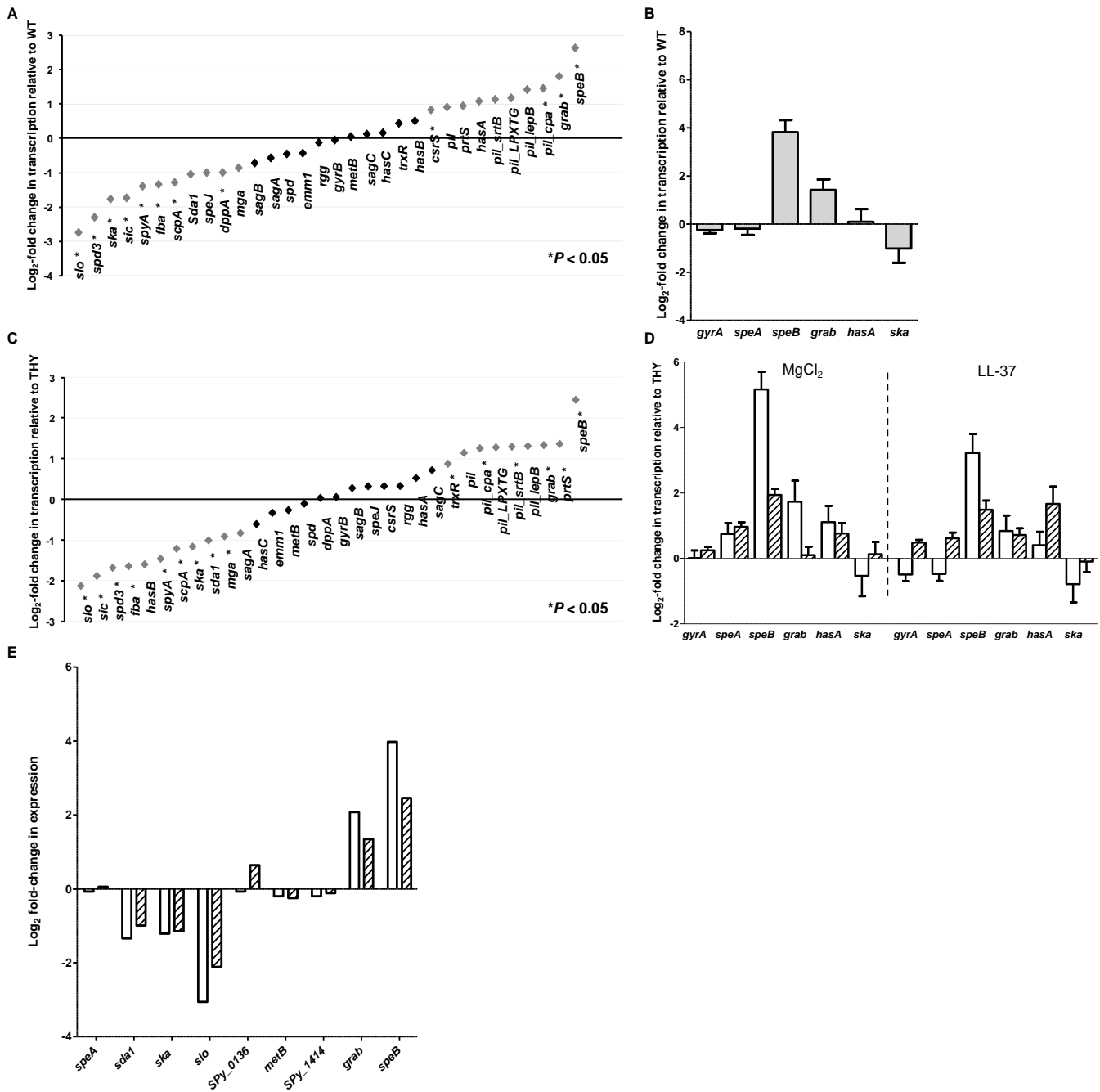
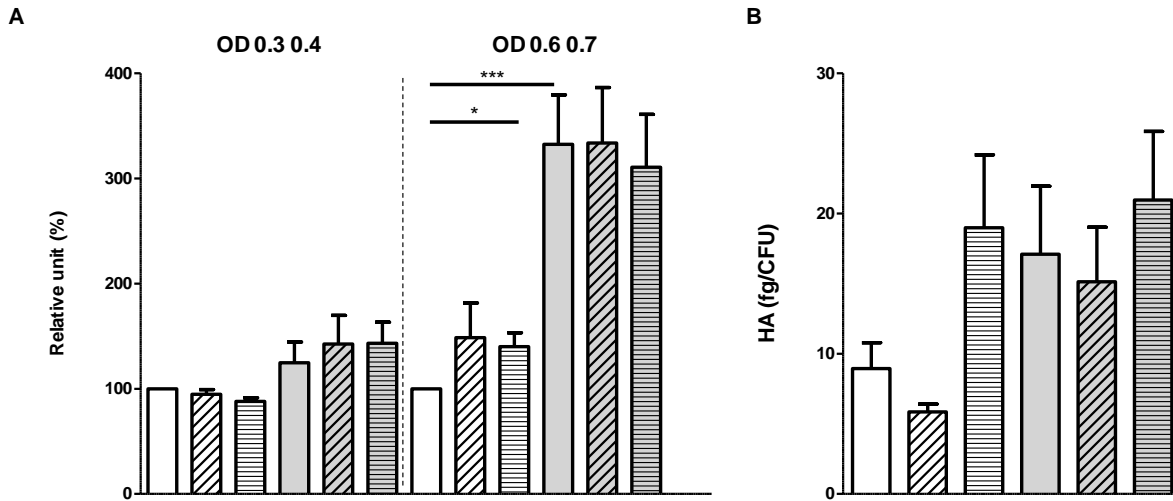
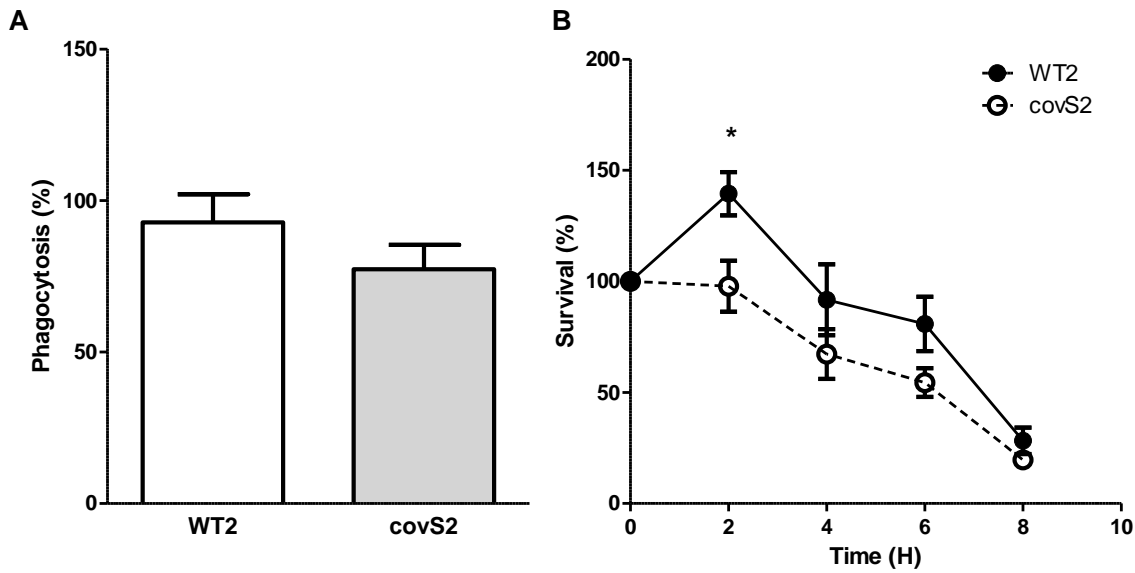


FIG. 4. The CovS2 strain display an atypical transcriptomic profile and responds poorly to environmental cues. (A) Log<sub>10</sub>-fold transcript differences between WT2 and CovS2 for selected virulence genes determined by RNAseq analysis. Genes in grey, above the 0 bar are those that are over-expressed in the WT2 strain, those below are over-expressed in the CovS2 strain and those in black are those whose transcription shows no variation. (B) Log<sub>2</sub>-fold transcript differences between WT2 and CovS2 of selected genes were determined by quantitative RT-PCR; genes above or under the 0 bar are those that are over-expressed or under-expressed in the CovS2 strain compared to the WT2 strain, respectively. Mean and standard error of the mean are shown. The experiment was performed in triplicate. (C) Log<sub>10</sub>-fold transcript differences between growth after addition or not Mg<sup>2+</sup> to WT2 cultures determined by RNAseq analysis. Genes in grey, above the 0 bar are those that are over-expressed in presence of 15 mM Mg<sup>2+</sup>, those below are over-expressed in absence of 15 mM Mg<sup>2+</sup> and those in black are those whose transcription shows no variation. (D) Log<sub>2</sub>-fold transcript differences between growth after addition or not of Mg<sup>2+</sup> or LL-37 to WT2 (white bars) or CovS2 (hatched bars) cultures of selected genes, as determined by quantitative RT-PCR; genes above or under the 0 bar are those that are over-expressed or under-expressed in presence of 15 mM Mg<sup>2+</sup> or LL-37, respectively. Mean and standard error of the mean are shown. The experiment was performed in triplicate. (E) Log<sub>2</sub>-fold transcript differences between growth after addition or not Mg<sup>2+</sup> (white bars) or LL-37 (hatched bars) to WT2 cultures of selected genes, as determined by RNAseq analysis.



**FIG. 5. The CovS2 strain accumulates more SpeB and responds less to environmental cues than the WT2 strain.** Total proteins were precipitated from the supernatant of THY cultures supplemented, or not with 15 mM MgCl<sub>2</sub> or 100 nM LL-37. Dot Blots were analyzed by ImageJ software. (A) SpeB accumulation after early exponential culture (OD 0.3-0.4) and late exponential culture (OD 0.6-0.7) is presented as the percentage of that for THY grown bacteria. White or grey bars, WT2 or CovS2 strains; diagonally hatched bars, growth in presence of 15 mM MgCl<sub>2</sub>, horizontally hatched bars in presence of 100 nM LL-37. Asterisks indicate significance level calculated by the two-tailed paired Student's test (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). The data represent the mean and standard error of the mean from three independently performed experiments. (B) Cell-associated HA levels from exponential THY grown cultures supplemented or not with MgCl<sub>2</sub> (diagonally hatched bars) or LL-37 (horizontally hatched bars) are expressed as fg of HA per CFU. The data represent the mean and standard error of the mean from four independently performed experiments.



**FIG. 6. The WT2 strain survives better than the CovS2 strain in macrophages.** (A), Phagocytosis assay was performed with mouse RAW246.7 macrophages infected at an MOI of 10. Phagocytosis is expressed as the percentage of intracellular bacteria relative to the total bacteria after PBS washes. (B) Macrophage survival assay was performed with mouse RAW246.7 macrophages infected at an MOI of 10. GAS Survival is expressed as the percentage of intracellular bacteria at T2, T4, T6 and T8 relative to that at T0. Results are representative of three independent experiments performed in triplicate. Error bars represent the mean and standard error of the mean ( $*P < 0.05$ ).

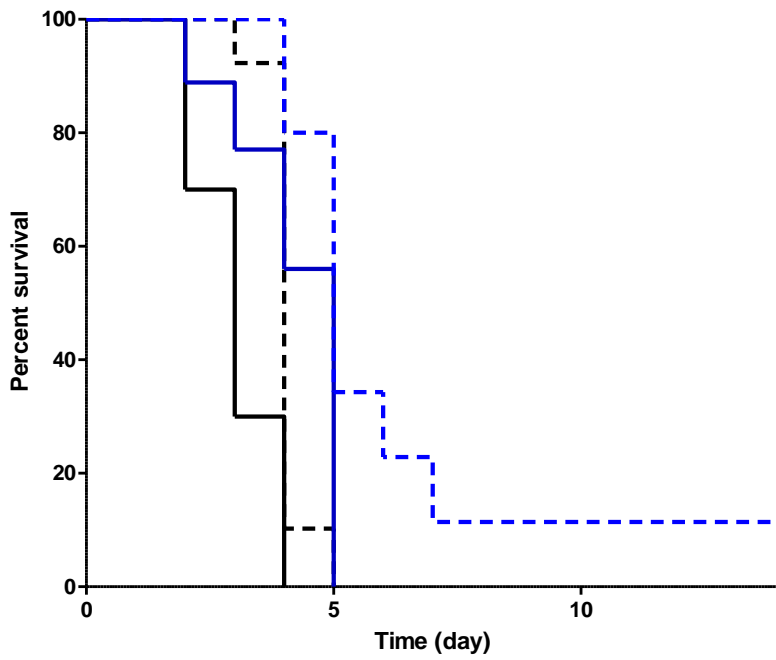


FIG. 7. The CovS2 strain is less virulent than the WT2 strain in a model of invasive GAS infection. Mice (n = 10) were infected intravenously with WT2 (black lines), CovS (blue lines), 2 x 10<sup>8</sup> and 4 x 10<sup>8</sup> cfus (black and blue solid lines, respectively), 4 x 10<sup>7</sup> and 5 x 10<sup>7</sup> cfus (black and blue dotted line, respectively) and the survival of the animals was scored for a period of 14 days.