



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle de l'opéron LytSR de Staphylococcus lugdunensis

Sandrine Dahyot, Virginie Oxaran, Maïté Niepceron, E. Dupart, Stéphanie Legris, Yasmine Zerdoumi, J-M. Flaman, Martine Pestel-Caron

► **To cite this version:**

Sandrine Dahyot, Virginie Oxaran, Maïté Niepceron, E. Dupart, Stéphanie Legris, et al.. Caractérisation fonctionnelle de l'opéron LytSR de Staphylococcus lugdunensis. IRIB, Jun 2015, Rouen, France. hal-02129934

HAL Id: hal-02129934

<https://normandie-univ.hal.science/hal-02129934v1>

Submitted on 15 May 2019

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

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

Dahyot S¹, Oxaran V¹, Niepceron M¹, Dupart E¹, Legris S¹, Zerdoumi Y², Flaman JM² and Pestel-Caron M¹
¹ GRAM EA2656, IRIB, Université de Rouen, Rouen, France ; ² U1079, IRIB, Université de Rouen, Rouen, France

Introduction

Staphylococcus lugdunensis est un staphylocoque à coagulase négative (SCN), commensal de la peau et des muqueuses humaines, présentant un pouvoir pathogène plus proche du *S. aureus* que des autres SCN. Il est responsable d'infections de la peau et des tissus mous, d'infections ostéo-articulaires et d'endocardites. Cependant, ses facteurs de virulence sont encore peu connus.

Des souches de *S. lugdunensis* tolérantes aux glycopeptides ont été décrites, et cette tolérance pourrait s'expliquer par un défaut des autolysines ou de leur régulation. Le système régulateur à deux composants *LytSR* est impliqué chez *S. aureus* et *S. epidermidis* dans la régulation de l'autolyse, l'activité des muréines hydrolases et la formation de biofilm.

L'objectif de cette étude est la caractérisation fonctionnelle de l'opéron *LytSR* chez *S. lugdunensis*.

Matériel et méthodes

A partir de la souche sauvage *S. lugdunensis* DSM, un **double mutant** $\Delta\textit{lytSR}$ a été construit par double recombinaison homologue. Le mutant $\Delta\textit{lytSR}$ a ensuite été complété avec les plasmides pCU1-*lytSR* et pCU1, par la technique des protoplastes.

La **croissance** de ces souches en milieu trypticase soja (TS) a été étudiée par mesure de la Densité Optique (DO), et dénombrement bactérien.

Les **concentrations minimales inhibitrices (CMI)** des glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) vis-à-vis des souches ont été déterminées par la méthode E-test (diffusion en milieu gélosé).

L'identification des membres du régulon *LytSR* a été effectuée par analyse des **micro-arrays** (puces à ADN), sur les souches DSM et $\Delta\textit{lytSR}$, après 6 heures et 8 heures de cultures. L'expression de certains gènes a été confirmée par qRT-PCR.

Résultats - Discussion

Croissance des souches

La croissance des quatre souches en milieu TS n'a pas montré de différence, indiquant que ***LytSR* n'est pas indispensable à la croissance cellulaire** (figure 1).

CMI

Les CMI des glycopeptides vis-à-vis des souches étaient comparables (données non présentées). Cependant, les CMI évaluant l'activité bactériostatique des antibiotiques, il est envisagé d'effectuer des **courbes de bactéricidie**, afin d'évaluer l'activité bactéricide de ces antibiotiques sur les souches.

Micro-arrays et qRT-PCR

L'extraction des ARN a été faite à 6 heures de culture (maximum d'expression des gènes *lytSR*), et 8 heures (maximum d'expression des gènes *IrgAB*). Les gènes dont l'expression était affectée d'au moins un facteur 2 fois étaient retenus.

L'analyse transcriptomique a mis en évidence l'impact de la délétion $\Delta\textit{lytSR}$ sur la transcription de (figure 2):

- **124 gènes à 6 heures** (45 régulés négativement 79 positivement),
- **174 gènes à 8 heures** (66 régulés négativement et 108 positivement).

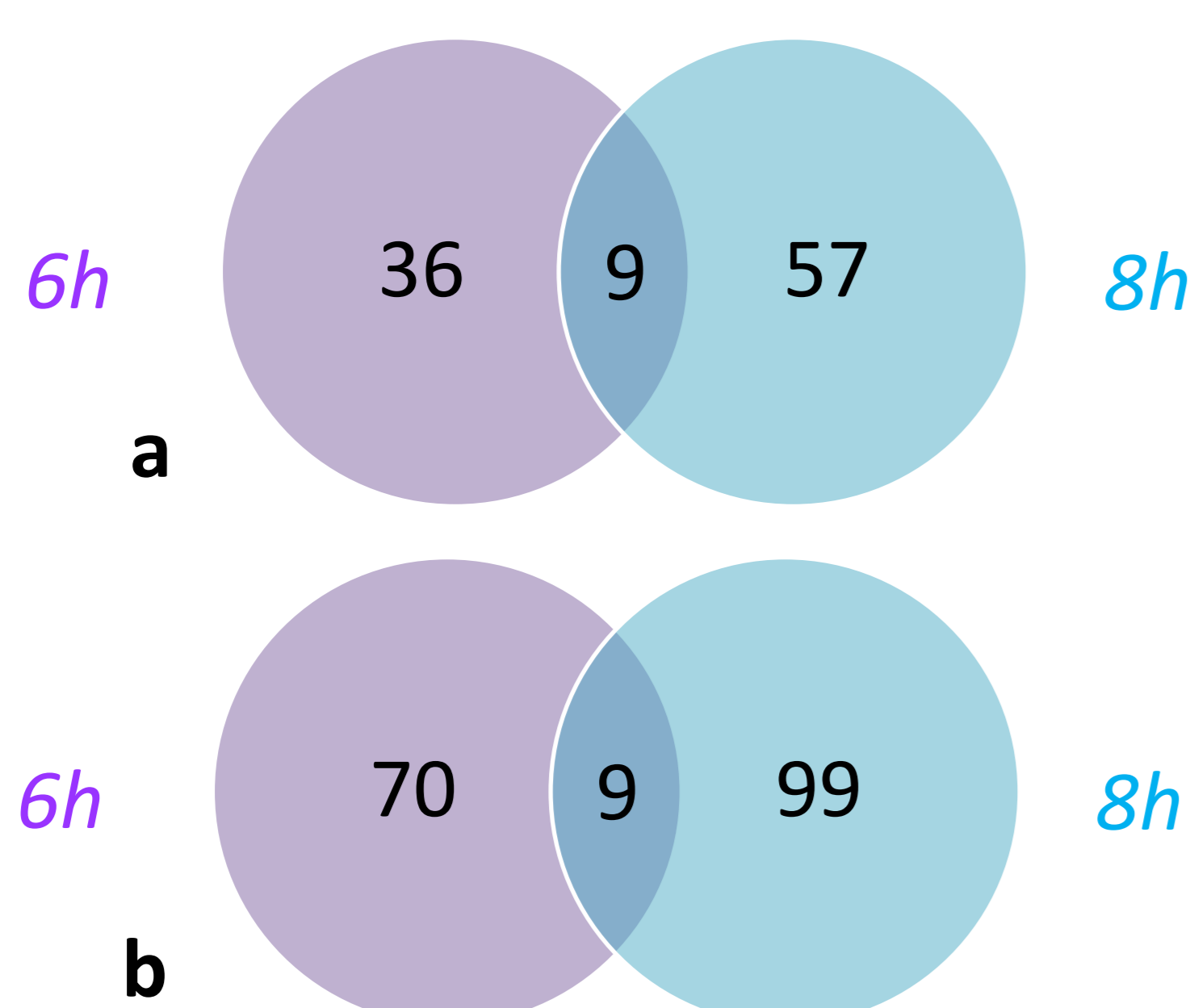


Figure 2. Diagrammes de Venn des gènes régulés (a) négativement à 6 et 8 heures et (b) positivement à 6 et 8 heures

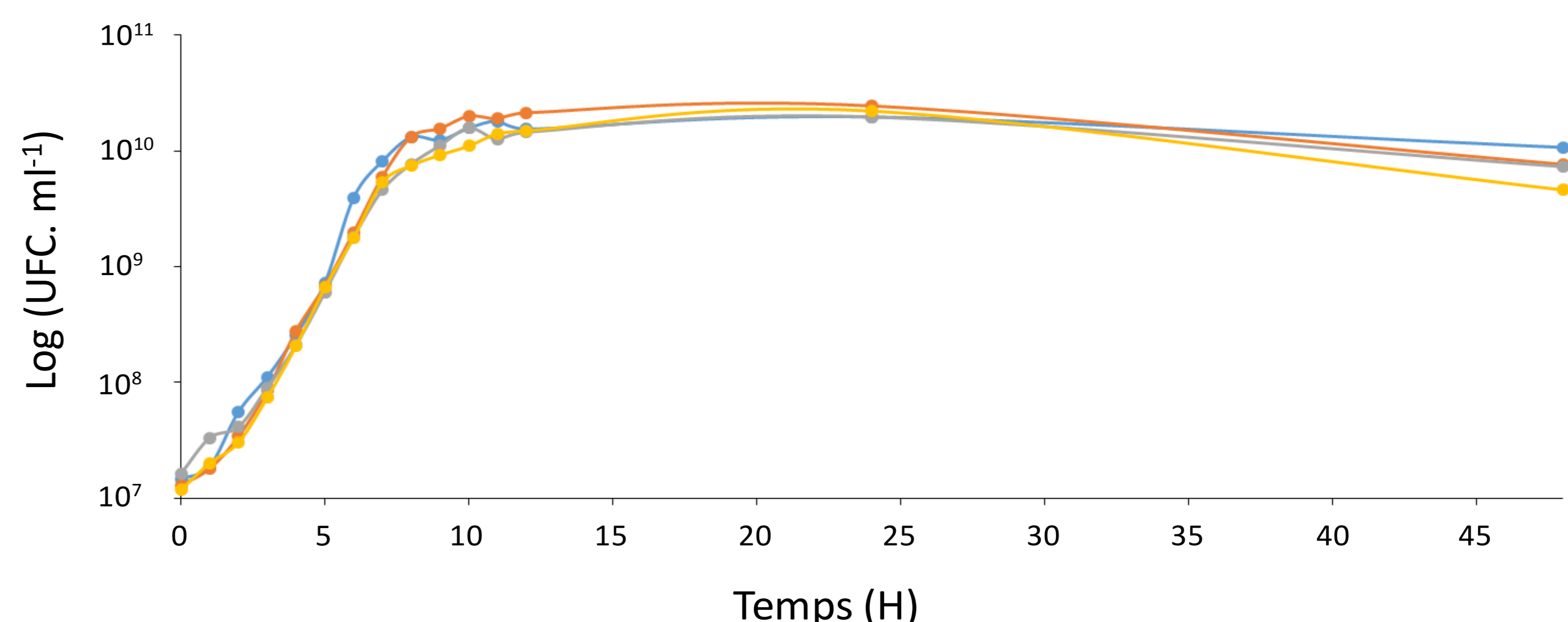


Figure 1. Courbes de croissance des souches DSM —, $\Delta\textit{lytSR}$ —, $\Delta\textit{lytSR}/\textit{pCU1-lytSR}$ — et $\Delta\textit{lytSR}/\textit{pCU1}$ — en milieu TS

Parmi ces gènes, *IrgA* et *IrgB* étaient considérablement sous-exprimés à 8 heures pour le mutant $\Delta\textit{lytSR}$. Ce résultat a été confirmé par qRT-PCR (figure 3). Ainsi, l'opéron *IrgAB* apparaît comme la cible principale du régulon *LytSR*. Il a été proposé que *IrgA*, et possiblement *IrgB*, bloquent l'accès des muréines hydrolases à la paroi via un effet antiholine.

L'expression d'autres gènes cibles sera confirmée par qRT-PCR, tels *cida*, codant pour des protéines s'apparentant aux holines, et *atIL*, décrit récemment comme codant pour l'autolysine bifonctionnelle majeure de *S. lugdunensis* (Gibert *et al.*, 2014).

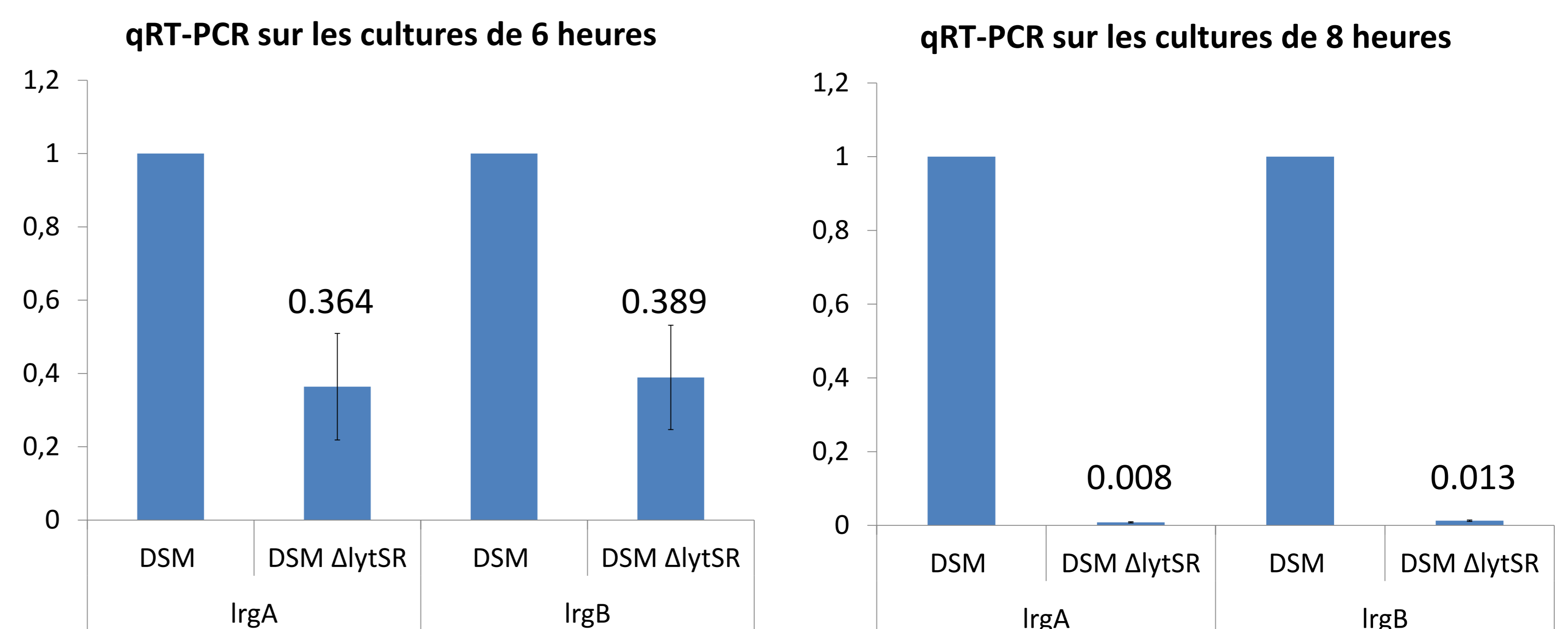


Figure 3. Ratios d'expression des gènes *IrgA* et *IrgB* chez la souche mutante par rapport à la sauvage, déterminés par qRT-PCR

D'autre part, *LytSR* impacte une grande variété de gènes impliqués dans le **métabolisme**. Ces gènes ont été triés selon la terminologie KEGG. Les gènes régulés positivement incluent ceux impliqués dans le métabolisme du pyruvate (SLUG_22130) ou encore la biosynthèse d'acides aminés (SLUG_015710, SLUG_20810...). Alors que les gènes régulés négativement incluent entre autres ceux impliqués dans la croissance anaérobie (*nar*) et dans le transport membranaire de type ABC transporteurs (*mnt*, *sst*, *opu*).

Conclusion

Ces premiers résultats confirment les gènes *IrgAB* comme la cible directe du régulon *LytSR*, en accord avec les données de la littérature chez *S. aureus* et *S. epidermidis* (Sharma-Kuinkel *et al.*, 2009 ; Zhu *et al.*, 2000). D'autre part, *LytSR* est à l'origine de la régulation d'un grand nombre de gènes. Des études sont en cours afin d'identifier plus précisément les voies métaboliques affectées.

Enfin, la caractérisation phénotypique des souches DSM, $\Delta\textit{lytSR}$ et des souches complétées se poursuivra par l'étude de l'architecture du biofilm (biomasse, structure, épaisseur, mortalité/viabilité) par microscopie confocale à balayage laser (CLSM), et de l'autolyse induite par le Triton X-100.