



HAL
open science

MultiLocus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA), nouvel outil épidémiologique pour le typage de *Staphylococcus lugdunensis*

S Dahyot, J Lebeurre, G. Prevost, L. Lemée, X. Argemi, M. Pestel-Caron

► To cite this version:

S Dahyot, J Lebeurre, G. Prevost, L. Lemée, X. Argemi, et al.. MultiLocus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA), nouvel outil épidémiologique pour le typage de *Staphylococcus lugdunensis*. Journée Normande de Recherche Biomédicale, Nov 2017, Caen, France. hal-02266210

HAL Id: hal-02266210

<https://normandie-univ.hal.science/hal-02266210>

Submitted on 13 Aug 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.

Introduction

Staphylococcus lugdunensis est un staphylocoque à coagulase négative, possédant un pouvoir pathogène proche de celui de *Staphylococcus aureus*.

L'analyse du polymorphisme de gènes domestiques par *MultiLocus Sequence Typing (MLST)*¹ a montré une structure de population **clonale** de cette espèce, sans établir de lien entre phylogénie et virulence.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était la mise au point de la méthode de typage *MultiLocus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA)*, basée sur la variabilité du nombre de répétitions en tandem (**VNTRs**) de plusieurs *loci*, et l'évaluation de son apport dans la caractérisation de lignées virulentes chez *S. lugdunensis*.

Matériels & Méthodes

■ Sélection des VNTRs *in silico* :

- Analyse à l'aide du logiciel Tandem Repeat Finder (TRF) de **2** génomes de référence^{2, 3}
- Sélection des **VNTRs** en fonction de leur position sur le génome, de la taille du motif répété (≥ 18 pb) et du nombre de répétitions (≥ 2)

■ Evaluation du pouvoir discriminant des VNTRs sélectionnés :

- A partir de **15** souches de différents *Sequence Types (STs)* définis par MLST et contextes cliniques
- Analyse du nombre de répétitions par séquençage Sanger à l'aide du logiciel BioNumerics 7.6, et détermination des MLVA types (**MTs**)

■ Application de la technique MLVA :

- Sur une collection de **98** souches cliniques humaines de *S. lugdunensis* : **82** responsables d'infections sévères⁴ et **16** isolées en condition de portage
- Typage par **MLST** (séquençage de 7 gènes domestiques) et comparaison aux données de **MLVA** : analyses phylogénétiques par *Minimum Spanning Tree (MST)* et *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA)* à l'aide du logiciel BioNumerics 7.6 ; calcul de l'index de diversité de Simpson (**DI**)

Résultats

Sélection des VNTRs *in silico* et évaluation sur un panel de 15 souches génotypées de *S. lugdunensis*

- **28** VNTRs identifiés à partir de TRF → **7** sélectionnés : **SLU1** à **SLU7**
- Taille des motifs répétés : entre **24 (SLU7)** et **58 (SLU2) pb**
- **3** VNTRs situés dans des **régions non codantes** ; **4** dans des **gènes** (3 codant des protéines hypothétiques et 1 codant un régulateur de transcription putatif)
- Assignation des **MTs** : combinaison du nombre de répétitions de chaque VNTRs dans l'ordre : **SLU1-SLU2-SLU3-SLU4-SLU5-SLU6-SLU7** ; ex : 1-2-10-4-3-2-2 → **MT1**

Typage des 98 souches cliniques

1. Typage par MLST

- Identification de **13 STs**, groupés en **7 Complexes Clonaux (CCs)** (**figure 1A**)
- **CC1** (31 souches) et **CC3** (26 souches) majoritaires

2. Typage par MLVA

- VNTRs : variation du nombre de répétitions de **1 à 11** et du **DI** de **0,098 à 0,695**
- Hétérogénéité du pouvoir discriminant des VNTRs
- Identification de **42 MTs**, groupés en :
 - **7 MLVA complexes (MCs)** par analyse **MST (figure 1B)**
 - **8 MLVA clusters** par analyse **UPGMA (figure 2)**
- Congruence entre les 2 types de regroupements (sauf MC1 subdivisé en 2 clusters: I et VI)

- **MC1** (41 souches) et **MC2** (25 souches) majoritaires

3. Comparaison des données de MLST et MLVA

- **Pouvoir résolutif** de la MLVA (**DI=0,922**) supérieur à celui de la MLST (**DI=0,870**)
- **Congruence** entre les regroupements obtenus par MLVA et MLST : souches de **CC1** regroupées en 3 MC liés (**MC2, MC5 et MC7**), et souches de **CC4** et **CC5** regroupées en **MC6** et **MC4** respectivement
- Pas de mise en évidence de lien entre CCs/MCs et contextes cliniques

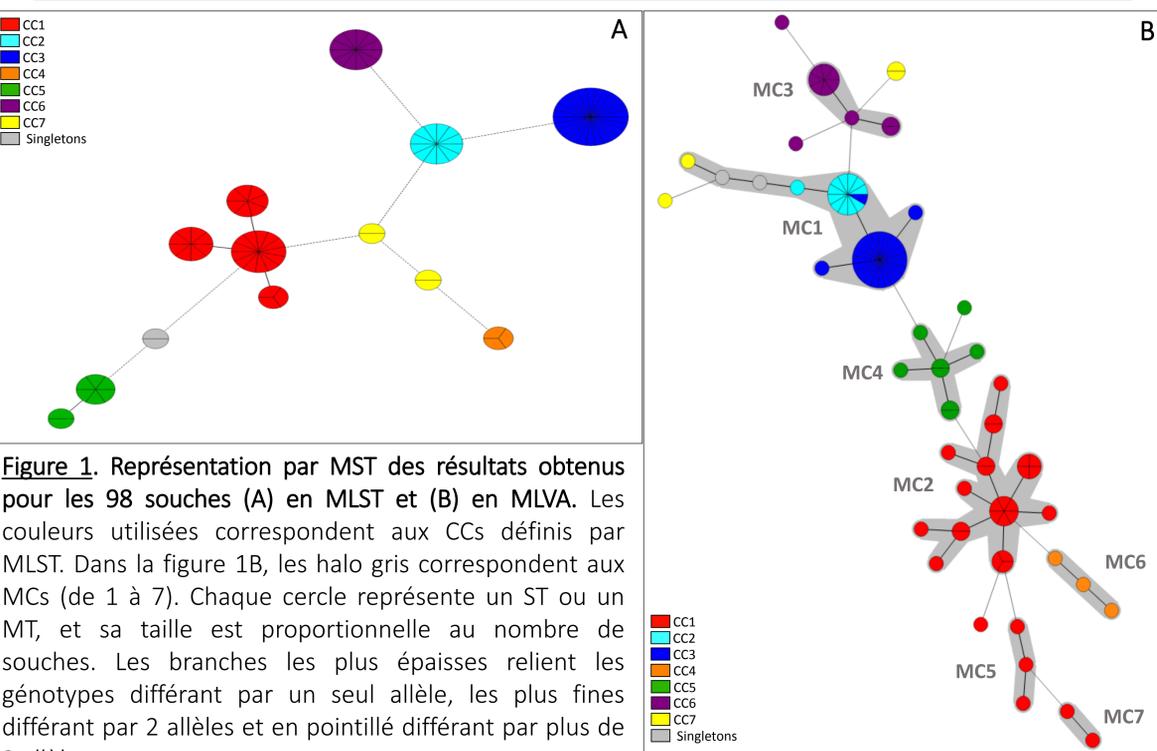


Figure 1. Représentation par MST des résultats obtenus pour les 98 souches (A) en MLST et (B) en MLVA. Les couleurs utilisées correspondent aux CCs définis par MLST. Dans la figure 1B, les halo gris correspondent aux MCs (de 1 à 7). Chaque cercle représente un ST ou un MT, et sa taille est proportionnelle au nombre de souches. Les branches les plus épaisses relient les génotypes différant par un seul allèle, les plus fines différant par 2 allèles et en pointillé différant par plus de 2 allèles.

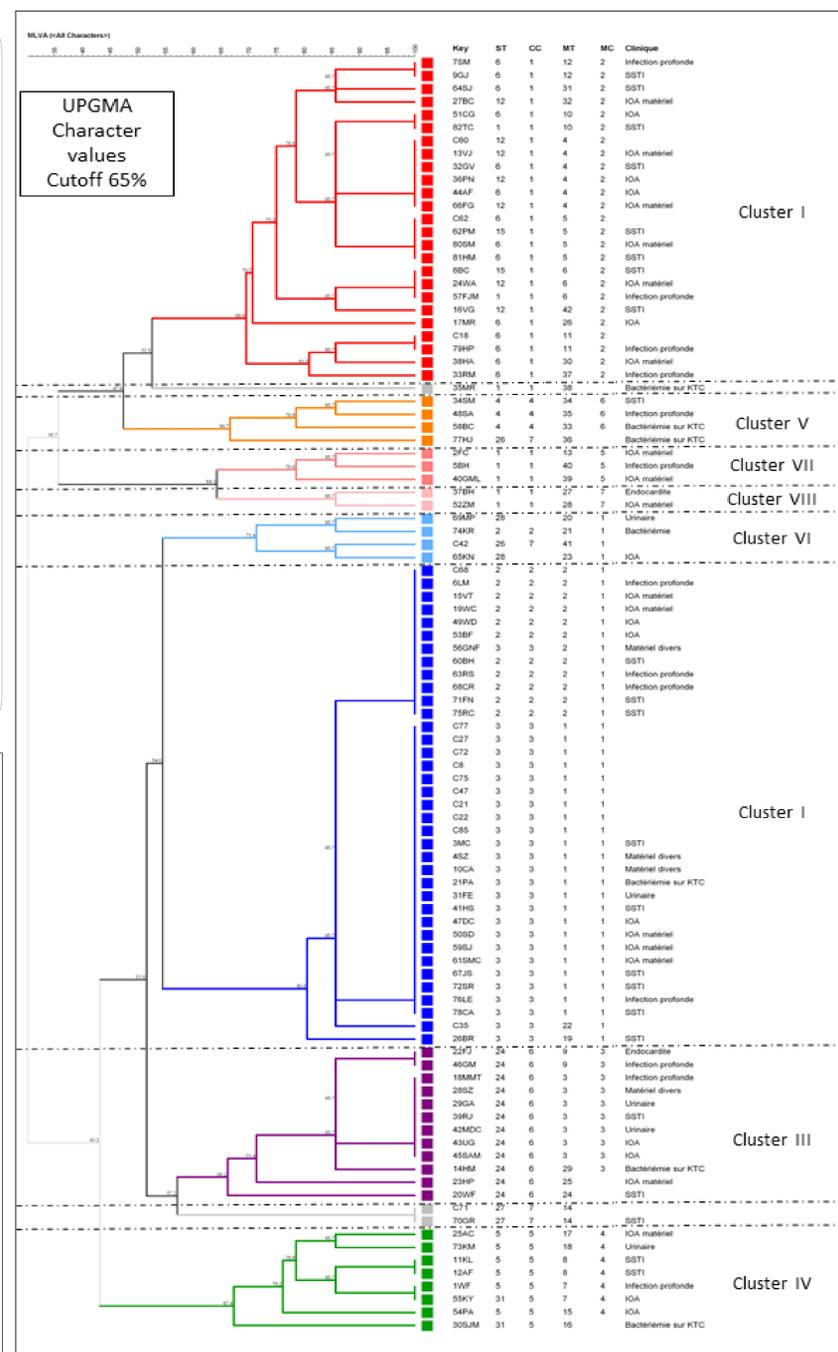


Figure 2. Clusters définis par méthode UPGMA à partir des données de MLVA obtenues pour les 98 souches. Identification de 8 clusters (de I à VIII), et de 3 singletons. Un *cutoff* de 65% a été appliqué pour définir les clusters. Les STs, CCs, MTs, MCs et contextes cliniques sont indiqués à droite.

Conclusion

Cette étude sur 98 souches cliniques de *S. lugdunensis* a permis de montrer une bonne congruence entre les groupes phylogénétiques définis par la nouvelle méthode de typage **MLVA** et le schéma **MLST** précédemment publié par le laboratoire¹. Néanmoins, à nombre de *loci* identique, la MLVA est **plus discriminante** que la MLST en termes d'index de diversité ($DI_{MLVA}=0,922$ vs $DI_{MLST}=0,870$) et de nombre de profils définis (**42 MTs vs 13 STs**), permettant de différencier des isolats de même ST. La MLVA permet ainsi la caractérisation de **nouvelles lignées phylogénétiques** chez cette espèce clonale, sans toutefois identifier des lignées spécifiques de contexte clinique. Nos résultats suggèrent que le typage par MLVA représente un **outil prometteur** pour les études épidémiologiques moléculaires appliquées à *S. lugdunensis*.

¹Chassain, B., Lemée, L., Didi, J., Thiberge, J.-M., Brisse, S., Pons, J.-L., and Pestel-Caron, M. (2012). *MultiLocus Sequence Typing Analysis of Staphylococcus lugdunensis* Implies a Clonal Population Structure. *Journal of Clinical Microbiology*

²Heilbronner, S., Holden, M.T.G., van Tonder, A., Geoghegan, J.A., Foster, T.J., Parkhill, J., and Bentley, S.D. (2011). Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors. *FEMS Microbiology Letters*

³Tse, H., Tsoi, H.W., Leung, S.P., Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., and Yuen, K.Y. (2010). Complete Genome Sequence of *Staphylococcus lugdunensis* Strain HKU09-01. *Journal of Bacteriology*

⁴Argemi X., Prévost G., Riegel P., Keller D., Meyer N., Baldeyrou M., Douiri N., Lefebvre N., Meghri K., Ronde Oustau C., Christmann D., Cianferani S., Strub JM., and Hansmann Y. (2017). VISLISI trial, a prospective clinical study allowing identification of a new metalloprotease and putative virulence factor from *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin Microbiol Infect*