

Identification de gènes de virulence chez *Staphylococcus hyicus* via une approche d'édition génomique

Mathis Laganière, Sylvain Moineau, Steve J. Charette

Institut de biologie intégrative et des systèmes (IBIS), Université Laval, Québec, Canada
mathis.laganiere.1@ulaval.ca

Mots clés: Épidermite exsudative, *Staphylococcus hyicus*, gènes de virulence, électroporation, édition génomique CRISPR-Cas9

Introduction

La production porcine québécoise, qui représente 30 % de la production canadienne et génère près de 2 milliards de dollars de revenus par année, fait face à des défis liés aux infections par *Staphylococcus hyicus* (MAPAQ, 2022; Statistique Canada, 2021). Cette bactérie provoque l'épidermite exsudative (EE), le troisième problème de santé le plus souvent répertorié chez les porcelets au Québec (MAPAQ, 2022). L'infection entraîne des lésions cutanées, des retards de croissance et une déshydratation qui peut entraîner la mort des porcelets (Devriese et al., 1978). Les traitements antibiotiques contre cette bactérie sont souvent inefficaces en raison de l'antibiorésistance (Moreno et al., 2022) et aucun vaccin commercial n'est disponible (Park et al., 2013). Des vaccins autogènes sont possibles, mais leur production est longue, coûteuse et limitée par la capacité d'identifier les souches virulentes responsables des infections (Arsenakis et al., 2018).

Les principaux facteurs de virulence de *S. hyicus* actuellement connus sont les toxines exfoliantes, des protéases à sérine (Ahrens et Andresen, 2004; Sato et al., 2000). Cependant, l'absence des gènes codant pour ces toxines chez certaines souches virulentes (Moreno et al., 2022) démontre un flou autour des marqueurs moléculaires révélant la virulence de *S. hyicus*. De plus, la coexistence de souches virulentes et non virulentes chez les porcelets affectés complique les diagnostics (Wegener et al., 1993). Afin de développer des outils diagnostiques efficaces et poser les bases de nouveaux traitements contre l'EE, une compréhension des mécanismes de virulence est nécessaire.

Objectif du projet

Cette maîtrise vise à **identifier et valider expérimentalement de nouveaux gènes de virulence** chez *S. hyicus*. Nous posons l'hypothèse que certains gènes jouent un rôle clé dans la virulence de *S. hyicus*, et que leur inactivation réduira cette virulence. Ainsi, via une approche de mutagenèse avec l'outil CRISPR-Cas, nous produirons des mutants de délétion pour des gènes suspectés de jouer un rôle dans la pathogénicité et en vérifierons l'impact sur le comportement de la bactérie. Les gènes candidats ont été sélectionnés à partir d'études comparatives de génomes de souches virulentes et non virulentes (Leekitcharoenphon et al., 2016; Naushad et al., 2019), ainsi que par homologie avec des facteurs de virulence connus chez *S. aureus*, l'espèce la plus étudiée du genre *Staphylococcus*. Parmi eux figurent le gène *spa* (Rosander et al., 2011), des composants du système de sécrétion de type VII (Calcutt et al., 2015), une ADP-ribosyltransférase (Wegener et al., 1993) et des gènes liés aux sidérophores (Naushad et al., 2019). Bien que ces déterminants aient été proposés, leur rôle dans la virulence reste à confirmer expérimentalement.

Résultats et suite du projet

La première année du projet a permis de mettre en place une plateforme d'édition génomique adaptée à *S. hyicus*, une avancée majeure pour l'étude de ce pathogène. Les principales étapes ont été : (1) Optimisation de l'introduction d'ADN plasmidique par électroporation (2) Conception de plasmides d'édition génomique (3) Production d'un mutant de délétion du gène *lip*, validant la faisabilité de l'approche. Ce protocole s'appuie sur un système CRISPR-Cas9 développé chez *S. aureus* (Chen et al., 2017), adapté aux particularités de *S. hyicus*.

La suite du projet sera consacrée à l'inactivation de gènes candidats de virulence et à l'évaluation de leurs effets. Les mutants seront comparés aux souches parentales à l'aide d'un test de prédation avec l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Bonifait et al., 2011), pour mesurer l'impact des gènes ciblés sur la virulence. Selon leur fonction, d'autres caractéristiques seront étudiées via tests de croissance, analyses biochimiques et protéomiques. Des expériences de complémentation génétique confirmeront le rôle direct des gènes ciblés.

Perspectives et applications

Le protocole d'édition génomique développé pour *S. hyicus* permet désormais de tester directement le rôle des gènes suspects dans la virulence. À court terme, cet avancé permettra d'identifier de nouveaux facteurs de virulence, d'améliorer les outils de ciblage des souches pathogènes et de fournir un protocole applicable à l'étude d'autres gènes et mécanismes biologiques chez *S. hyicus*. À long terme, ces avancées fourniront des connaissances essentielles pour orienter le développement de stratégies vaccinales ou thérapeutiques et pour mieux cibler l'usage des antibiotiques. Ce projet représente ainsi une étape clé vers des solutions concrètes et durables pour l'industrie porcine.

Références

1. MAPAQ, *Portrait-diagnostic sectoriel de l'industrie du porc au Québec*. 2022.
2. Canada, S. Données sur les fermes porcines. 2021; Available from: <https://www.cpc-ccp.com/francais/file.aspx?id=26de82fc-4271-401f-8527-e8ec94153912>
3. Devriese, L. A., Hájek, V., Oeding, P., Meyer, S. A., & Schleifer, K. H. (1978). *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky 1953) comb. Nov. And *Staphylococcus hyicus* subsp. *Chromogenes* subsp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 28(4), 482-490.
4. Moreno, A.M., et al. Antimicrobial Resistance Profile of *Staphylococcus hyicus* Strains Isolated from Brazilian Swine Herds. *Antibiotics (Basel)*, 2022. 11(2).
5. Park, J., et al. An investigation of exudative epidermitis (greasy pig disease) and antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus hyicus* and *Staphylococcus aureus* isolated from clinical cases. *Can Vet J*, 2013. 54(2): 139-144.
6. Arsenakis, I., et al., Autogenous vaccination reduces antimicrobial usage and mortality rates in a herd facing severe exudative epidermitis outbreaks in weaned pigs. *Vet Rec*, 2018. 182(26): p. 744.
7. Ahrens, P. & Andresen, L.O. Cloning and sequence analysis of genes encoding *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxin types A, B, C, and D. *J Bacteriol*, 2004. 186(6): 1833-1837.
8. Sato, H., et al. Chromosomal and extrachromosomal synthesis of exfoliative toxin from *Staphylococcus hyicus*. *J Bacteriol*, 2000. 182(14): 4096-4100.
9. Wegener, H.C., Andresen, L.O. & Bille-Hansen, V. *Staphylococcus hyicus* virulence in relation to exudative epidermitis in pigs. *Can J Vet Res*, 1993. 57(2): 119-125.
10. Leekitcharoenphon, P., Pamp, S.J., Andresen, L.O. & Aarestrup, F.M. Comparative genomics of toxigenic and non-toxigenic *Staphylococcus hyicus*. *Vet Microbiol*, 2016. 185: 34-40.
11. Naushad, S., Naqvi, S. A., Nobrega, D., Luby, C., Kastelic, J. P., Barkema, H. W., & De Buck, J. (2019). Comprehensive virulence gene profiling of bovine non-aureus *Staphylococci* based on whole-genome sequencing data. *mSystems*, 4(2),
12. Rosander, A., Guss, B., & Pringle, M. An IgG-binding protein A homolog in *Staphylococcus hyicus*. *Veterinary Microbiology*, 2011. 149(1-2) : 273-276.
13. Calcutt, M. J., Foecking, M. F., Hsieh, H.-Y., Adkins, P. R. F., Stewart, G. C., & Middleton, J. R. (2015). Sequence analysis of *Staphylococcus hyicus* ATCC 11249T, an etiological agent of exudative epidermitis in swine, reveals a type VII secretion system locus and a novel 116-kilobase genomic island harboring toxin-encoding genes. *Genome Announcements*, 3(1), e01525-
14. Chen, W., Zhang, Y., Yeo, W., Bae, T. & Ji, Q. Rapid and Efficient Genome Editing in *Staphylococcus aureus* by Using an Engineered CRISPR/Cas9 System. *J Am Chem Soc*, 2017. 139(10): 3790-3795.
15. Bonifait, L., Charette, S.J., Filion, G., Gottschalk, M. & Grenier, D. Amoeba Host Model for Evaluation of *Streptococcus suis* Virulence. *Appl Environ Microbiol*, 2011. 77(17): 6271-6273.