



HAL
open science

Impact des mécanismes d'acquisition du fer chez Neisseria meningitidis dans l'hypervirulence de certaines souches : leçons de l'épidémie normande

J Sevestre, L. Lemée, I Tournier, P. François, F. Caron, Muhamed-Kheir Taha

► To cite this version:

J Sevestre, L. Lemée, I Tournier, P. François, F. Caron, et al.. Impact des mécanismes d'acquisition du fer chez *Neisseria meningitidis* dans l'hypervirulence de certaines souches : leçons de l'épidémie normande. Journée Normande de Recherche Biomédicale, Sep 2016, Rouen, France. hal-02265833

HAL Id: hal-02265833

<https://normandie-univ.hal.science/hal-02265833>

Submitted on 12 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.

Impact des mécanismes d'acquisition du fer chez *Neisseria meningitidis* dans l'hypervirulence de certaines souches : leçons de l'épidémie normande

J. Sevestre^{1,5}, L. Lemée^{1,2}, I. Tournier³, P. François⁴, F. Caron^{1,2} and MK Taha⁵

¹ Gram EA 2656, IRIB, Université de Rouen, Rouen, France, ² Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Rouen, Rouen, France, ³ Inserm UMR U1079, IRIB, Université de Rouen, Rouen, France, ⁴ Laboratoire de recherche génomique, Hôpital Universitaire de Genève, Genève, Suisse, ⁵ Unité des infections bactériennes invasives et centre national de référence des méningocoques, Institut Pasteur, Paris, France

Introduction

N. meningitidis (Nm) est un commensal obligatoire du nasopharynx humain retrouvé chez 10% de la population générale. Dans de rares cas le méningocoque peut traverser l'épithélium respiratoire, échapper au système immunitaire de l'hôte (notamment grâce à sa capsule) et provoquer une **infection invasive à méningocoque** (IIM) qui se manifeste sous deux formes cliniques principales, la méningite et la méningococcémie (infection disséminée pouvant aller jusqu'au purpura fulminans). Les mécanismes moléculaires de la virulence de *N. meningitidis* ne sont pas tous connus. La récente épidémie normande (2003 à 2010) a donné l'opportunité de comparer des souches hyperinvasives isolées : les unes d'infections très sévères (**souches invasives**), les autres d'un portage sain au niveau du pharynx (**souches de portage**). Par les techniques usuelles de typage toutes ces souches étaient impossibles à distinguer (souches de groupe B, sérotype 14, séro-sous-type 1.7,16 et séquence-type 32 : B:14:P1.7,16/ST32).

Objectifs

Réaliser une **analyse génomique comparative** de souches B:14:P1.7,16/ST 32, de portage et invasives, collectées en Seine-Maritime, afin d'identifier d'éventuels déterminants génétiques spécifiques des souches invasives et étudier l'impact de ces variations génétiques sur le plan physiopathologique grâce aux modèles *ex vivo* et *in vivo*.

Méthodes

Par séquençage Illumina® et grâce au site d'analyse PubMLST nous avons réalisé l'analyse génomique de six souches appartenant au clone B:14:P1.7,16 ST32 (quatre isolées en situation de portage sain et deux isolées d'infections invasives). Après comparaison génomique, les gènes d'intérêts présentant un fort polymorphisme ont été étudiés sur le plan phénotypique et le pouvoir pathogène de ces différentes souches a ensuite été déterminé dans un modèle *in vivo* de souris transgéniques exprimant le gène de la transferrine humaine.

Résultats

L'analyse comparative a permis d'identifier d'importantes variations génomiques portant sur **651 gènes polymorphes** avec des profils alléliques clairement différents entre souches invasives et de portage. Parmi ces gènes on retrouve un grand nombre de facteur associés à la virulence et notamment différents gènes impliqués dans l'**acquisition du fer**.

1. Séquençage et comparaison génomique :

- Tableau 1 : Six souches séquencées par NGS

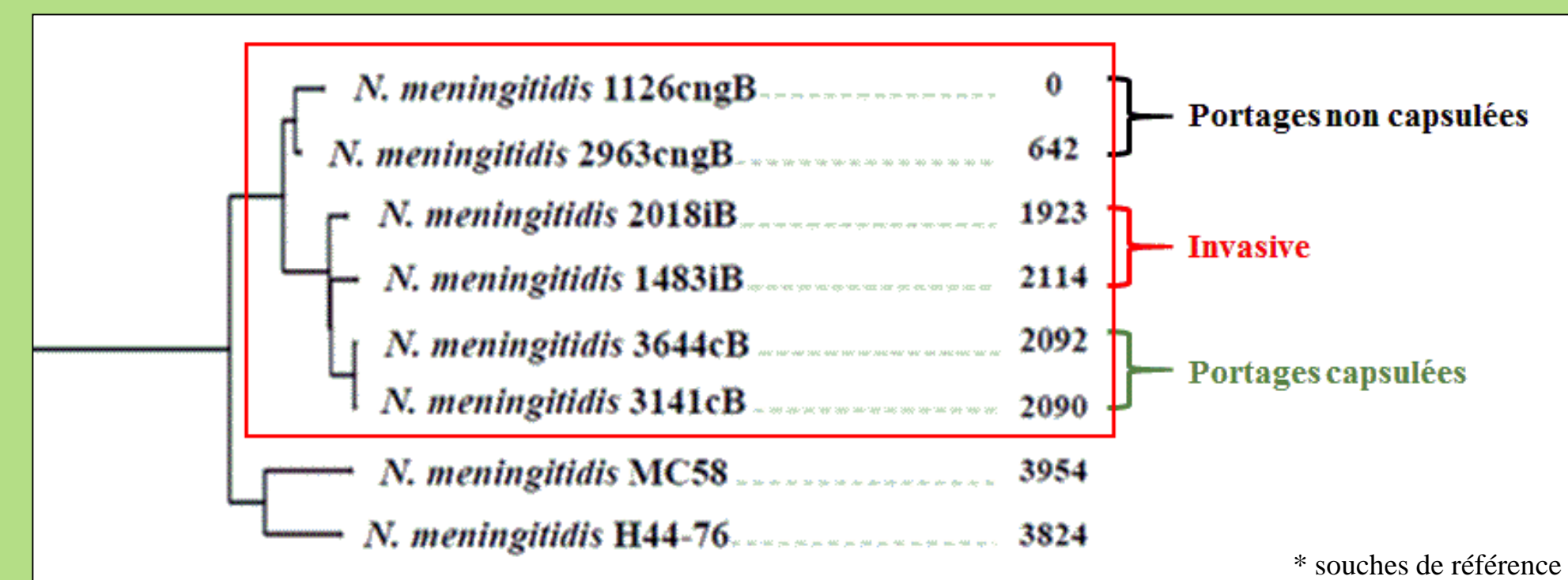
Souche	Identification phénotypique	Sequence Type	Origine géographique	Statut clinique
1126cngB	NG:14:P1.7,16	ST 32	Dieppe	Portage non capsulée
2963cngB	NG:14:P1.7,16	ST 32	Dieppe	Portage non capsulée
3141cB	B:14:P1.7,16	ST 32	Dieppe	Portage capsulée
3644cB	B:14:P1.7,16	ST 32	Dieppe	Portage capsulée
1483IB	B:14:P1.7,16	ST 32	Forges les Eaux	Infection invasive
2018IB	B:14:P1.7,16	ST 32	Seine-Maritime	Infection invasive

NG : Non Groupable (absence de capsule)

- Tableau 2 : Assemblage *de novo*

Genome name	Nbre of Contigs	n:N50	Min size	Average size	N50	Max size	Genome size (Mb)
<i>N. meningitidis</i> MC58	1	1	2272360	2272360	2272360	2272360	2.272
<i>N. meningitidis</i> 1126cngB	288	55	503	7205	12196	40124	2.075
<i>N. meningitidis</i> 1483IB	186	35	527	11341	21812	60343	2.110
<i>N. meningitidis</i> 2018IB	294	56	527	7077	11497	40054	2.081
<i>N. meningitidis</i> 2963cngB	271	48	508	7655	13975	38934	2.075
<i>N. meningitidis</i> 3141cB	167	32	505	12642	22225	81844	2.111
<i>N. meningitidis</i> 3644cB	271	56	502	7616	11843	33340	2.064

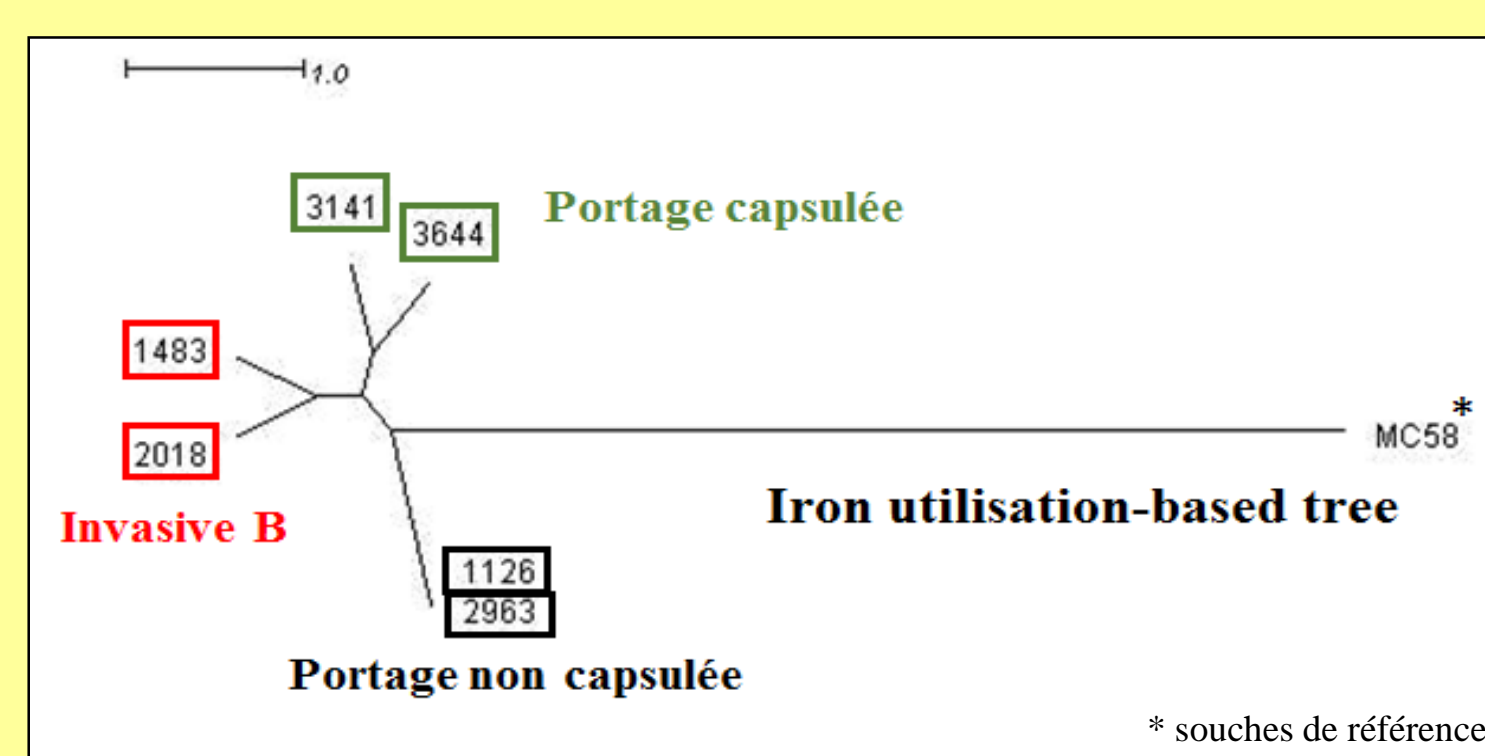
- Phylogenetic tree based on whole genomic SNPs



- confirmation du caractère clonale des souches Normandes
- clustering des différents isolats en fonction de leur statut clinique

2. Comparaison allélique et caractérisation phénotypique :

- Analyse ciblée des gènes impliqués dans l'acquisition du Fer
- comparaison allélique
- clustering similaire à celui observé pour la comparaison génomique

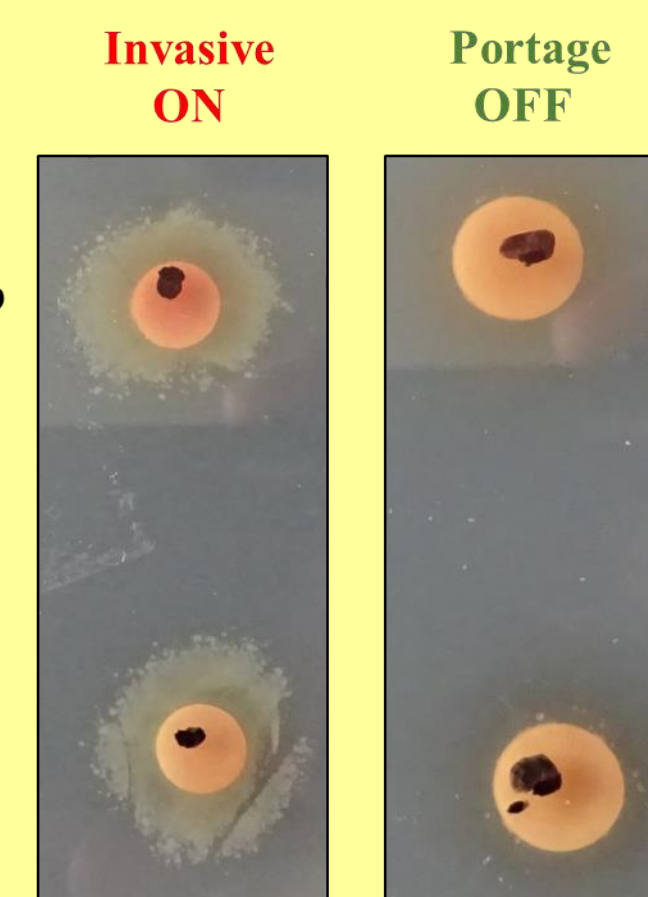


- Profil allélique identique pour les gènes :
 - transferrine (*Tbp*) et lactoferrine binding protein (*Lbp*)
- Profil allélique différent pour le gène *hmbR*
 - récepteur à l'hémoglobine, sous régulation de phase (site polyG)
- souches invasives ON**
- souches de portage OFF**

- Caractérisation phénotypique

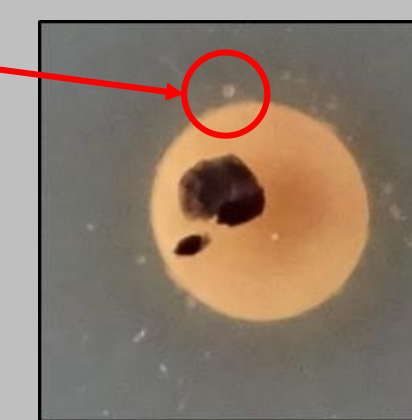
- milieu carencé en Fer (Desferal)
- additionné d'hémoglobine humaine et murine
- Croissance :
 - souches invasives +++
 - souches de portage -

	Invasive	Portage
Hb Humaine	+++	-
Hb Murine	++	-

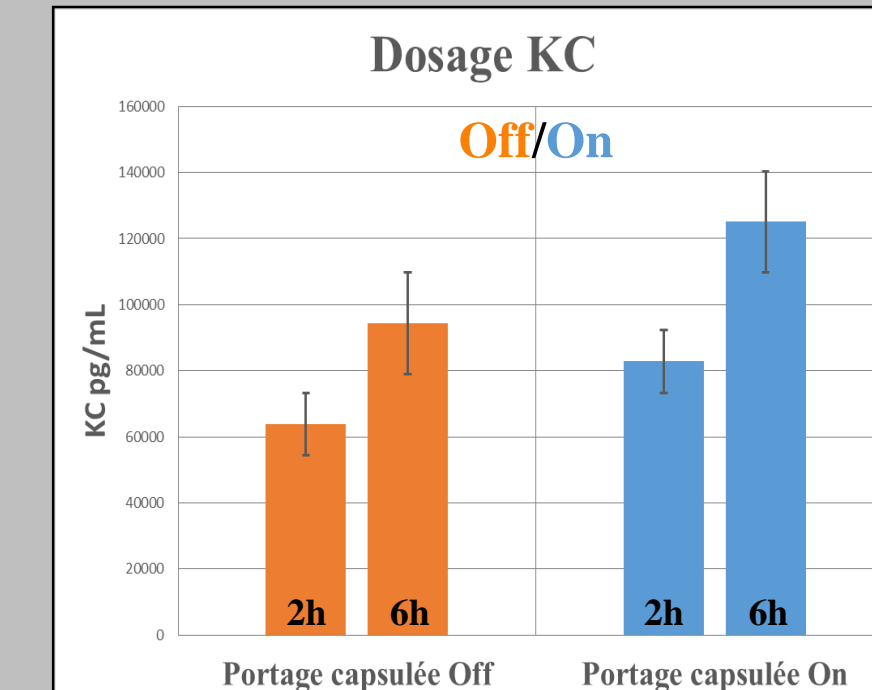
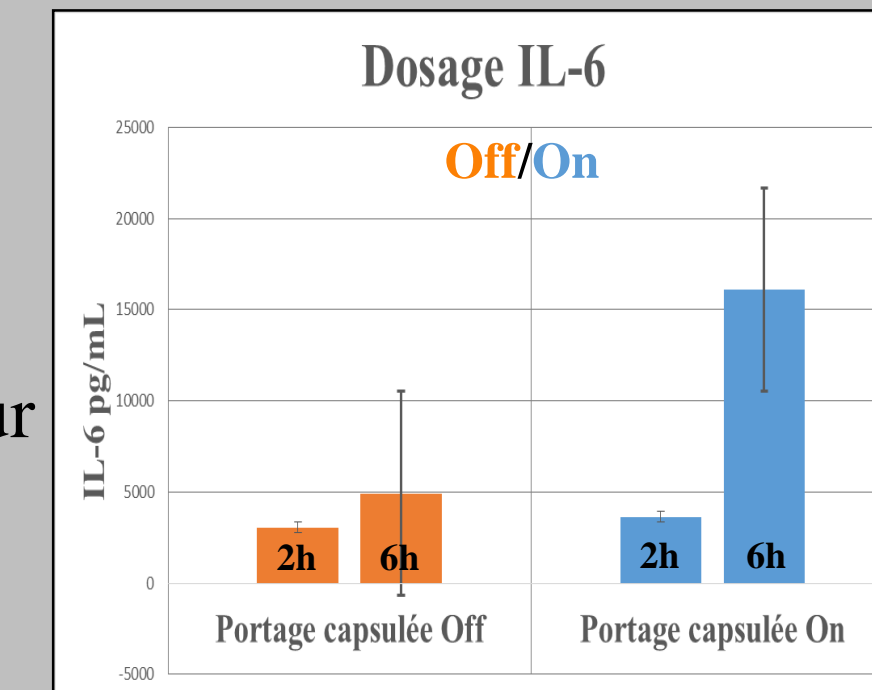
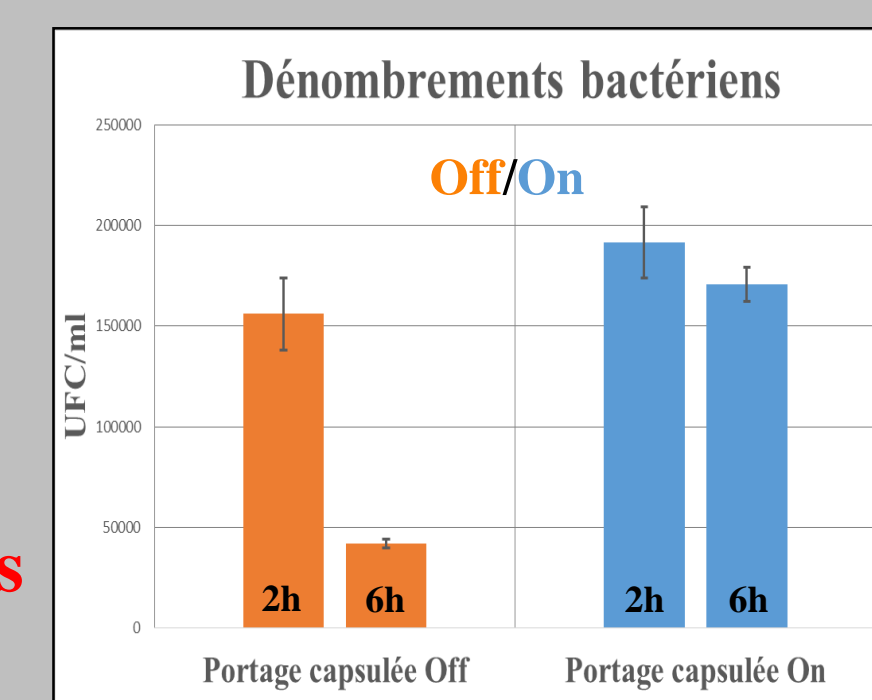


3. Modèle *in vivo* :

- Impacte de la variation de phase du gène *hmbR* sur la virulence
- sélection d'un révertant "On" à partir d'une souche de **portage *hmbR* "Off"**
- vérification de la phase par séquençage Sanger
- couple de souche isogéniques "On/Off"
- Etude physiopathologique
- souris transgéniques exprimant la transferrine humaine



- Souche de **portage "On"** :
 - capacité à provoquer une infection importante jusqu'à 6h
 - niveau proche des souches **invasives**
- induction significative des principales cytokines inflammatoires
- niveau similaire à celui observé pour les souches **invasives**
- restauration de la virulence pour l'isolate "On" dérivé d'une souche de portage dans le modèle animal



Conclusions

L'analyse NGS de 6 souches appartenant au clone B:14:P1.7,16 ST32 (2 invasives et 4 de portage) a permis d'identifier d'importantes variations génomiques portant sur 651 gènes polymorphes avec des profils alléliques clairement différents entre souches invasives et de portage. Après avoir analysé plus finement les différentes familles de gènes connues comme étant impliquées dans la virulence, nous avons observé que parmi ces différences, plusieurs portaient sur des gènes liés à l'acquisition du fer via l'hémoglobine humaine. Des tests phénotypiques réalisés sur milieu carencé en fer et additionné d'hémoglobine humaine ont validé les résultats obtenus *in silico* en montrant que seules les souches B:14:P1.7,16/ST32 invasives étaient capables d'utiliser le fer séquestré dans l'hémoglobine pour leur croissance. Enfin, des tests réalisés *in vivo* grâce à un modèle de souris transgénique ont confirmé l'importance du système *hmbR* dans la virulence du méningocoque.