RÉFÉRENCES

1. Chen X, Liu S, Goraya MU, et al. Host immune response to influenza A virus infection. *Front Immunol* 2018 ; 9 : 320.
2. Marazzi I, HO JS, Kim J, et al. Suppression of the antiviral response by an influenza histone mimic. *Nature* 2012 ; 483 : 428-33.
3. Perot B P, Ingersoll MA, Albert ML. The impact of macroautophagy on CD8 (+) T-cell-mediated antiviral immunity. *Immunol Rev* 2013 ; 255 : 40-56.
4. Gannagé M, Dormann D, Albrecht R, et al. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe* 2009 ; 6 : 367-80.
5. Choi Y, Bowman JW, Jung JU. Autophagy during viral infection – a double-edged sword. *Nat Rev Microbiol* 2018 ; 16 : 341-54.
6. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell* 2017 ; 168 : 960-76.
7. Robbins M, Judge A, MacLachlan I. siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides* 2009 ; 19 : 89-102.
8. Vergne I, Esclatine A, Biard-Piechaczyk M. Autophagie, protéines ATG et maladies infectieuses. *Med Sci (Paris)* 2017 ; 33 : 312-8.
9. Maynard-Smith L A, Chen L-C, Banaszynski LA, et al. A directed approach for engineering conditional protein stability using biologically silent small molecules. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 24866-72.
10. Perot BP, Boussier J, Yatim N, et al. Autophagy diminishes the early interferon- β response to influenza A virus resulting in differential expression of interferon-stimulated genes. *Cell Death Dis* 2018 ; 9 : 539.
11. Hutchinson EC, Charles PD, Hester SS, et al. Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nat Commun* 2014 ; 5 : 4816.

NOUVELLE

Le purpura fulminans méningococcique, une énigme partiellement résolue

Hervé Lécuyer¹⁻², Xavier Nassif¹⁻², Mathieu Coureuil¹

➤ *Neisseria meningitidis*, plus communément appelé méningocoque, est une bactérie de la flore normale du nasopharynx, totalement inféodée à l'être humain (elle ne colonise que l'homme et ne survit pas dans l'environnement extérieur). Cet hôte intime fait très rarement parler de lui. Cependant, dans de très rares cas, le méningocoque traverse l'épithélium du pharynx et se retrouve dans la circulation sanguine. Comme d'autres pathogènes extracellulaires cette bactérie possède une capsule polysaccharidique et exprime plusieurs facteurs de virulence qui la protègent de l'action bactéricide du complément et qui limitent sa phagocytose.

Une caractéristique fondamentale le distingue cependant des autres bactéries : il est capable d'adhérer aux cellules endothéliales, de s'y développer sous forme de microcolonies, et ce y compris en dépit des forces de cisaillement générées par le flux sanguin à la surface des cellules. La bactérie est ainsi capable de littéralement coloniser l'endothélium [1, 2]. Ce sont les pili de type IV, fibre protéique bactérienne, qui permettent son adhérence aux

cellules endothéliales et sont à l'origine de signaux intracellulaires. Notre équipe a montré que l'adhérence aux cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux et l'activation par les pili du récepteur bêta-2 adrénergique induisait la délocalisation des protéines de jonction serrées et le franchissement de la barrière hémato-encéphalique (BHE) [3-5] (➔).

Ces résultats expliquent ainsi la faculté étonnante du méningocoque à traverser la BHE, avec pour conséquence l'apparition d'une méningite chez environ 60 % des patients infectés.

La complication la plus redoutable de l'infection est le développement d'un syndrome de *purpura fulminans* (PF). Il associe un choc septique très sévère à des nécroses cutanées extensives, touchant notamment les membres, et qui nécessitent souvent d'avoir recours à une chirurgie « délabrante » allant jusqu'à l'amputation. D'autres organes, comme les glandes surrénales, peuvent être également affectées. Les nécroses sont la conséquence de thromboses

¹Institut Necker Enfants Malades, Université Paris Descartes, Inserm U1151, CNRS UMR 8253, 14, rue M.H. Vieira Da Silva, CS61431, 75993 Paris, France.

²Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Universitaire Necker Enfants Malades, Service de Microbiologie clinique, Paris, France.

herve.lecuyer@inserm.fr

massives de la microcirculation. Environ 25 % des patients développent un PF et une grande majorité de ceux qui ne développent pas de PF présente un purpura cutané *a minima*, ce qui révèle le caractère pro-thrombotique exceptionnel de l'infection [6].

La physiopathologie du PF et la raison pour laquelle ce syndrome est essentiellement lié aux infections invasives à méningocoque sont longtemps restées un mystère jusqu'à ce qu'un modèle de souris humanisées (des souris SCID [severe-combined immunodeficiency] greffées avec de la peau humaine) permette d'étudier *in vivo* l'interaction du méningocoque avec l'endothélium humain. Dans ce modèle, seule l'infection par une souche exprimant des pili de type IV et capable d'adhérer à l'endothélium entraîne le développement de thromboses de la microcirculation [7], révélant un lien direct entre colonisation des cellules endothéliales par la bactérie et développement d'un *purpura fulminans*. Mais quel est le rôle de la cellule endothéliale dans ce processus ? La cascade de coagulation, initiée notamment par la reconnaissance du

(➔) Voir la Nouvelle de M. Coureuil et X. Nassif, m/s, n° 1, janvier 2010, page 15

Figure 1. Schéma simplifié de la cascade de la coagulation et de son rétrocontrôle négatif par la cellule endothéliale au travers du système de la protéine C (figure adaptée de [6]). EPCR : endothelial protein C receptor ; PC : protéine C ; PCa : PC activée ; TM : thrombomoduline.

lipopolysaccharide (LPS) bactérien par les monocytes, conduit à la génération exponentielle de thrombine, l'enzyme clé de l'hémostase qui clive le fibrinogène en fibrine pour former le thrombus. Cette génération de thrombine doit être contrôlée pour éviter toute coagulation intravasculaire qui serait délétère. C'est l'endothélium qui joue ce rôle de contrôle, grâce à deux récepteurs exprimés par les cellules endothéliales : la thrombomoduline (TM) et l'*endothelial protein C receptor* (EPCR). Lorsqu'elle se fixe sur la TM, la thrombine devient capable de cliver et d'activer la protéine C (PC) qui est liée à l'EPCR. La PC est une pro-enzyme circulante sécrétée par le foie qui, lorsqu'elle est activée, clive les facteurs V et VIII de la cascade de coagulation, limitant ainsi la génération de thrombine. La cellule endothéliale, au travers de la TM et de l'EPCR, assure

donc, via l'activation de la PC, un rétrocontrôle négatif de la cascade exponentielle de la coagulation (Figure 1). Il est facile d'illustrer le rôle fondamental de ce système anticoagulant : tout déficit sévère constitutionnel ou acquis en PC est associé au développement d'un *purpura fulminans* comparable à celui qui se développe lors de l'infection méningococcique [8].

Nous avons émis l'hypothèse que l'adhérence du méningocoque aux cellules endothéliales, une étape nécessaire au développement de thrombose dans le modèle animal, était à l'origine d'un défaut du système anticoagulant de la PC, dont l'activation dépend des deux récepteurs endothéliaux, TM et EPCR. L'infection de cellules endothéliales primaires par une souche piliée et adhérente de méningocoque n'entraîne pas de modification de l'expression de la TM.

En revanche, cette infection induit une diminution très rapide et très intense de l'expression de l'EPCR à la membrane des cellules : après 4 heures d'infection, près de la moitié des cellules endothéliales n'expriment plus l'EPCR membranaire, et son expression globale au niveau de la monocouche cellulaire est diminuée de 80 % (Figure 2A).

Comme indiqué précédemment, une spécificité du méningocoque est sa capacité d'adhérence aux cellules endothéliales par l'intermédiaire des pili de type IV. Ceux-ci permettent l'adhérence proprement dite de la bactérie, mais ils sont également capables d'initier une réponse cellulaire. Afin de vérifier si la disparition de l'EPCR que l'on observe lors de l'infection était spécifiquement liée à l'adhérence du méningocoque aux cellules, une souche mutante de la bactérie n'exprimant pas de pili et donc

Figure 2. Infection par le méningocoque. Des cellules endothéliales primaires de microvaisseaux de derme ont été infectées par une souche de méningocoque pendant 4 heures. **A.** L'expression de l'EPCR (endothelial protein C receptor) membranaire par les cellules a été analysée en cytofluorométrie en flux avec un anticorps spécifique couplé à la phycoérythrine (EPCR-PE). L'histogramme vert correspond aux cellules non infectées et le rouge aux cellules infectées. Le signal du contrôle isotype est en gris. **B.** Analyse par immunofluorescence : l'EPCR est visualisé en vert et la VE-cadhérine, protéine des jonctions intercellulaires, en rose. L'ADN cellulaire et bactérien est en cyan. Les microcolonies bactériennes apparaissent sous la forme d'agrégats de coques. Seule la cellule centrale, non infectée (absence de marquage de l'ADN bactérien au pôle apical) exprime l'EPCR. Échelle : 50 µm (figure adaptée de [10]).

incapable d'adhérer aux cellules endothéliales a été utilisée. Dans ce cas, l'expression de l'EPCR par les cellules endothéliales infectées par cette souche mutante est parfaitement conservée. Des expériences d'immunofluorescence ont par ailleurs permis de démontrer définitivement que la disparition de l'EPCR membranaire est spécifiquement liée à l'adhérence de la bactérie (Figure 2B). La disparition de l'EPCR à la membrane est très rapide (observée dès la deuxième heure post-infection) et s'accompagne d'une diminution globale de l'expression de la protéine (estimée par *western-blot*). Nous avons donc émis l'hypothèse qu'il ne s'agit pas d'une régulation transcriptionnelle ou d'une internalisation du récepteur, mais plutôt d'un clivage protéolytique à la surface de la cellule. L'EPCR est en effet la cible d'une protéase membranaire, ADAM-17 (*a disintegrin and metalloprotease 17*), qui, après activation, clive des protéines

de la membrane via un processus appelé *shedding*¹ [9] (→). Cette hypothèse s'est vérifiée par l'abondance des formes solubles d'EPCR observées dans le surnageant des cellules infectées, en comparaison de cellules contrôles. Pourtant ni un petit ARN interférant (*siRNA*) dirigé contre ADAM-17 ni l'inactivation complète (*knock-out*) de l'expression du gène par la technique *Crispr/Cas9* ne permettent d'inhiber le processus de *shedding* de l'EPCR induit par l'infection méningococcique. En réalité, nous avons pu montrer pour la première fois que l'EPCR est également la cible d'une autre protéase membranaire, ADAM-10. L'activité protéolytique d'ADAM-10 est induite par l'adhérence, *via* ses pili, du

(→) Voir la Synthèse de F. Peiretti et al., m/s n° 1, janvier 2009, page 45

¹ Le *shedding* ou protéolyse de substrats ancrés à la surface cellulaire permet aux cellules de libérer des médiateurs et de contrôler leurs interactions avec la matrice extracellulaire et les ligands, qu'ils soient solubles ou associés aux cellules.

méningocoque aux cellules endothéliales. Au final, la perte de l'EPCR ainsi induite a une conséquence pathologique puisqu'elle diminue la génération par l'endothélium de la PC activée (PCa), l'anticoagulant majeur permettant de lutter contre le développement d'un PF. Ce travail met en lumière pour la première fois une dérégulation importante de l'hémostase spécifique induite par le méningocoque [10]. Il révèle un défaut d'activation de la PC dans l'infection méningococcique, suggérant que les malades souffrant de *purpura fulminans* pourraient bénéficier d'une thérapie suppléative en PCa. Cette molécule a été disponible pendant près de 10 ans en réanimation avant d'être abandonnée en raison de son inefficacité pour réduire la mortalité par choc septique. Mais elle n'a jamais été évaluée spécifiquement dans la prévention des complications thrombotiques d'une infection méningococcique. Notre

travail identifie également ADAM-10 comme une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans cette infection : son inhibition précoce permettrait de limiter le développement des thromboses et les conséquences souvent dramatiques du *purpura fulminans*.

Nous avons également pu mettre en évidence une autre conséquence de la perte de l'expression de l'EPCR par les cellules endothéliales. Fixée à l'EPCR, la PCa peut en effet cliver le récepteur PAR-1 (*protease-activated receptor-1*), initiant une réponse endothéliale anti-inflammatoire, anti-apoptotique et conduisant à une diminution de la perméabilité de l'endothélium [11]. En plus de son rôle important d'anticoagulant, la PCa possède donc de multiples effets protecteurs qui dépendent de la présence de l'EPCR. Pour étudier la perméabilité de l'endothélium, nous avons utilisé un système de mesure continue de l'impédance, c'est-à-dire de la résistance de la monocouche cellulaire au passage des électrons d'un courant électrique (système iCELLigence). Sous l'effet de certains agents physiologiques ou pharmacologiques, les jonctions intercellulaires s'ouvrent et l'impédance chute, mais ce phénomène peut être limité grâce à la PCa. Avec ce

système de mesure, nous avons montré que l'infection méningococcique supprime cette action protectrice de la PCa vis-à-vis de la perméabilité endothéliale. La perte de l'EPCR induite par le méningocoque est donc doublement délétère : elle diminue l'activation de la protéine C, limitant le rétro-contrôle négatif de la coagulation, et elle empêche l'action protectrice résiduelle du peu de PCa généré, en supprimant le récepteur indispensable à son action sur la cellule endothéliale.

Si la physiopathologie du PF méningococcique est complexe et certainement multifactorielle, il est très probable que l'atteinte de la voie anticoagulante de la protéine C que nous avons décrite joue un rôle important dans la formation des thromboses. Ce travail ouvre ainsi de nouvelles voies de recherche pour l'élaboration de thérapeutiques innovantes pour ce syndrome qui est encore aujourd'hui associé à une mortalité élevée et à des séquelles importantes chez les survivants. ♦

Meningococcus purpura fulminans, a partially solved mystery

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Dupin N, Lecuyer H, Carlotti A, et al. Chronic meningococemia cutaneous lesions involve meningococcal perivascular invasion through the remodeling of endothelial barriers. *Clin Infect Dis* 2012 ; 54 : 1162-65.
2. Mikaty G, Soyer M, Mairey E, et al. Extracellular bacterial pathogen induces host cell surface reorganization to resist shear stress. *PLoS Pathog* 2009 ; 5 : e1000314.
3. Coureuil M, Mikaty G, Miller F, et al. Meningococcal type IV pili recruit the polarity complex to cross the brain endothelium. *Science* 2009 ; 325 : 83-7.
4. Coureuil M, Lecuyer H, Scott MG, et al. Meningococcus hijacks a beta2-adrenoceptor/beta-arrestin pathway to cross brain microvasculature endothelium. *Cell* 2010 ; 143 : 1149-60.
5. Coureuil M, Nassif X. La ruse du méningocoque. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 15-7.
6. Lécuyer H, Borgel D, Nassif X, et al. Pathogenesis of meningococcal purpura fulminans. *Pathog Dis* 2017 ; 75.
7. Join-Lambert O, Lécuyer H, Miller F, et al. Meningococcal interaction to microvasculature triggers the tissular lesions of purpura fulminans. *J Infect Dis* 2013 ; 208 : 1590-7.
8. Chalmers E, Cooper P, Forman K, et al. *Purpura fulminans*: recognition, diagnosis and management. *Arch Dis Child* 2011 ; 96 : 1066-71.
9. Peiretti F, Canault M, Morange P, et al. Les deux visages d'ADAM17 dans l'inflammation. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 45-50.
10. Lécuyer H, Virion Z, Barnier J-P, et al. An ADAM-10 dependent EPCR shedding links meningococcal interaction with endothelial cells to purpura fulminans. *PLoS Pathog*. 2018 ; 14 : e1006981.
11. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2007 ; 109 : 3161-72.

Bon de commande

À retourner à EDP Sciences, 17 avenue du Hoggar, 91944 Les Ulis Cedex

Tél. : 01 49 85 60 69 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **L'imagerie dans la prise en charge des cancers des voies aérodigestives supérieures** : 35 € + 3 € de port = **38 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

☐ Par chèque, à l'ordre de **EDP Sciences**

☐ Par carte bancaire : ☐ Visa ☐ Eurocard/Mastercard

Carte n° |

Signature :

Date d'expiration : | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |