



## CNR des Méningocoques

# **CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES MENINGOCOQUES RAPPORT D'ACTIVITE 2011**

Unité des Infections Bactériennes Invasives

28 rue du Dr Roux  
75724 Paris cedex 15

Tel 01 45 68 84 38  
Secrétariat 01 40 61 31 08  
Télécopie 01 40 61 30 34

Courriel : [meningo@pasteur.fr](mailto:meningo@pasteur.fr)

Site : <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante>

Responsable Scientifique : Muhamed-Kheir TAHA

Courriel [muhamed-kheir.taha@pasteur.fr](mailto:muhamed-kheir.taha@pasteur.fr)

Tel : 01 45 68 84 38

Télécopie 01 45 68 83 38

Responsable Scientifique Adjoint : Ala-Eddine DEGHMANE

Courriel : [ala-eddine.deghmane@pasteur.fr](mailto:ala-eddine.deghmane@pasteur.fr)

Tel : 01 44 38 95 90

Responsable Administratif : Christophe MAURIET, Directeur Général

Adjoint Administration

[christophe.mauriet@pasteur.fr](mailto:christophe.mauriet@pasteur.fr)

Tel 01 45 68 80 10

# Plan

1. INTRODUCTION.....	3
1.1 Physiopathologie des infections méningococciques .....	3
1.2. Contexte épidémiologique global et enjeux de santé publique.....	4
1.3. Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR en termes de santé publique, son organisation.....	5
1.4. Résumé des activités de l'année 2011 : faits marquants, points-clef, contexte, principaux résultats de contribution à la surveillance et à l'alerte. ....	7
1.5. L'Équipe .....	8
1.6. Organigramme nominatif des personnels directement impliqués dans le CNR.....	9
2. ACTIVITES D'EXPERTISE :.....	13
2.1. Capacités techniques du CNR.....	13
2.2. Activité d'expertise de l'année 2011 .....	17
3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE .....	26
3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....	26
3.2. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux.....	28
4. ALERTE .....	28
5. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	28
6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR .....	29
6.1. ETUDE DE LA COUVERTURE DES SOUCHES INVASIVES EN FRANCE PAR LE VACCIN RECOMBINANT CONTRE LE MENINGOCOQUE DU SEROGRUPE B .....	29
7. LISTE DES PUBLICATIONS 2011 EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR.....	30
8- PROGRAMME D'ACTIVITE N+1 ET N+2 .....	31

Les infections invasives à méningocoque (IIM) sont des maladies à Déclaration Obligatoire (DO). La surveillance des IIM repose sur la déclaration obligatoire (DO) à l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) et la caractérisation des souches invasives au Centre National de Référence des méningocoques (CNR). Tout cas suspect doit être signalé immédiatement à l'Agence Régionale de Santé (ARS) qui évalue les mesures de prophylaxie pour les contacts proches et organise leur mise en œuvre

Les IIM sont provoquées par *Neisseria meningitidis*, le méningocoque, qui est une espèce bactérienne exclusivement retrouvée chez l'homme. Le méningocoque est présent le plus souvent comme une espèce bactérienne commensale du rhino-oropharynx (portage asymptomatique retrouvé chez 10% de la population générale).

Certaines souches (hyper-invasives) peuvent être responsables d'infections invasives à méningocoque et peuvent être à l'origine des cas groupés et/ou poussées épidémiques. Cela souligne l'importance de la caractérisation des souches du méningocoque. Les IIM sont dominées par les méningites et les méningococcémies (septicémies) qui peuvent se compliquer de *purpura fulminans* et de choc septique mortel. De ce fait, l'IIM constitue probablement la dernière frontière à vaincre en matière d'urgence en pathologie infectieuse.

D'autres formes cliniques plus rares doivent être connues et recherchées, telles que des arthrites et des péricardites ou des pneumonies invasives, révélées par la bactériémie qui est constante dans tout cas d'IIM.

Le méningocoque est une bactérie variable par transformation et recombinaison génétique. Des variants sont ainsi continuellement générés du fait des échanges génétiques horizontaux entre les souches. Ces variants peuvent donc présenter des altérations de sensibilité aux antibiotiques et/ou des changements de leurs antigènes de surfaces (variants d'échappement à la réponse immune)

## **1. Introduction**

### **1.1 Physiopathologie des infections méningococciques**

La transmission du méningocoque est aérogène, par les sécrétions rhino-pharyngées (gouttelettes de Flügge) classiquement après une exposition de plus d'une heure et à courte distance (<1 mètre). C'est la distance que peuvent parcourir des gouttelettes de 10 microns avant de s'évaporer ou tomber. La taille de 10 microns de ces gouttelettes permet une rétention au niveau du rhinopharynx (porte d'entrée du méningocoque). L'infection par *N. meningitidis* se produit par l'acquisition d'une souche au niveau du rhinopharynx. L'acquisition conduit le plus souvent à un portage asymptomatique (souches de portage). Rarement, l'acquisition est suivie d'une infection invasive. C'est le cas notamment lors de l'acquisition d'une souche hyper-

invasive. La susceptibilité de l'hôte joue également un rôle majeur dans le taux d'attaque d'IIM après acquisition (exemple : les sujets ayant des déficits dans les composants tardifs du complément).

Sur le plan clinique, les IIM sont dominées par les méningites et les méningococcémies (septicémies) qui peuvent se compliquer de *purpura fulminans* et de choc septique mortel. Si la méningite, dans sa forme typique, avec syndrome fébrile intense, céphalées et nausées ou même vomissements, altération de la conscience et raideur de la nuque et du dos, est immédiatement diagnostiquée et déclenche une prise en charge rapide et un traitement présomptif mais efficace, d'autres formes cliniques plus rares doivent être connues et recherchées, telles que des arthrites et des péricardites ou des pneumonies invasives, confirmées par la découverte d'une bactériémie. En effet, la présence de *N. meningitidis* dans le sang (révélée par hémoculture ou par amplification génique) caractérise une infection méningococcique invasive, quelle qu'en soit l'expression clinique. Le traitement antibiotique, par l'administration parentérale d'une céphalosporine de troisième génération, est efficace à la phase précoce de dissémination des bactéries, mais la cascade inflammatoire du choc septique, qui survient parfois en quelques heures, ne peut être contrée par aucun traitement spécifique à ce jour.

Cette dualité de la maladie, avec un processus infectieux inaugural aisément curable mais de possibles complications septiques menaçant le pronostic vital, impose un algorithme diagnostique rigoureux et urgent pour l'instauration du traitement spécifique et la mise en œuvre de mesures prophylactiques de l'entourage du malade.

Le suivi des différents phénotypes et génotypes des souches invasives est essentiel pour détecter des liens entre différents cas, pour une alerte la plus précoce possible pour le contrôle du risque d'expansion épidémique d'un clone connu ou émergent.

## **1.2. Contexte épidémiologique global et enjeux de santé publique**

*N. meningitidis* est un agent majeur d'infections invasives communautaires sévissant dans le monde entier. En moyenne l'OMS estime le nombre annuel des cas à 500 000 cas mais cela varie selon l'importance des poussées épidémiques annuelles avec un taux de létalité supérieur à 10%. Ces infections se manifestent par des méningites (environ 30 % des méningites bactériennes aiguës de l'enfant et de l'adulte, les autres agents bactériens majeurs étant le pneumocoque et *Haemophilus influenzae* de type B) et des septicémies, ainsi que des arthrites, des péricardites septiques et des pneumonies (surtout chez les sujets âgés.)

Les méningocoques ont un potentiel de transmission et d'expansion épidémique qui imposent une surveillance constante. Dans les pays industrialisés, où leur incidence annuelle varie de 0,7 à 4 cas pour 100 000 habitants, les IIM sévissent essentiellement sous forme de cas

sporadiques, et sont dues à des phénotypes et génotypes variés, parmi lesquels dominent des souches des sérogroupes B, C, Y et W135. Ces cas sont expliqués par des facteurs liés aux souches (lignées hyper invasives). Mais l'immaturité immunitaire ou des facteurs d'immunosuppression (syndromes immunodéficients, traitements immunosuppresseurs, immunosuppression viro-induite, etc.) sont également suspectés chez le patient victime d'une infection méningococcique invasive. Dans les contrées hyperendémiques (jusqu'à 500 cas pour 100 000 habitants), en particulier d'Afrique sub-saharienne, dans la "ceinture de la méningite cérébro-spinale" décrite par Lapeyssonnie (du Sénégal à l'Ethiopie), les méningococcies sévissent périodiquement (en fait, chaque année à la saison sèche de décembre à mai), sous forme d'épidémies de méningites dues à des génotypes homogènes, majoritairement des souches des sérogroupes A, W135 et le plus récemment du séro groupe X qui connaissent alors une expansion clonale. La virulence du clone épidémique est ici déterminante pour la transmissibilité et la gravité de l'infection parmi des populations immunologiquement naïves. En France, les infections invasives à méningocoque sont des maladies à déclaration obligatoire. Les critères de déclaration sont définis dans la circulaire de la Direction Générale de la Santé (N° DGS/RI1/2011/33 du 27 janvier 2011 relative à la prophylaxie des infections invasives à méningocoque). Ces critères sont :

- Culture positive ou PCR positive à partir d'un site normalement stérile (LCR, sang...)
- Examen direct positif dans le LCR (cocci à coloration de Gram négative)
- LCR purulent ET
  - Lésions purpuriques
  - Ou antigènes solubles positifs dans le LCR, le sang ou les urines
- *Purpura fulminans*

### **1.3. Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR en termes de santé publique, son organisation**

Le CNR des méningocoques a été reconduit en 2011, avec Muhamed-Kheir TAHA qui en est le responsable et Ala-Eddine DEGHMANE qui est le responsable adjoint. Les techniques permettant la surveillance des infections méningococciques potentiellement épidémiques évoluent sans cesse et le travail réalisé au CNR, reprend, dans ce but, les différents thèmes énoncés dans la liste du cahier des charges de l'appel d'offre de janvier 2005 (définie par l'arrêté du 29 novembre 2004):

## Cahier des charges spécifiques du CNR

---

### *Méningocoques*

---

Le Centre national de référence des méningocoques et ses éventuels laboratoires associés s'engagent à assurer les missions définies par l'arrêté du 29 novembre 2004 fixant les modalités de désignation et les missions des CNR.

Il sera particulièrement demandé au Centre national de référence des méningocoques de :

- Développer et mettre en œuvre des techniques d'analyse génétique permettant la comparaison fine des souches de *Neisseria meningitidis* au niveau national et international,
- Développer et évaluer les nouvelles techniques de confirmation du diagnostic et d'identification des souches en particulier lorsque la culture n'est pas possible ou a échoué,
- Développer, évaluer et diffuser des techniques moléculaires permettant le diagnostic rapide d'espèce et de sérotype notamment des méningites décapitées par l'antibiothérapie,
- Diffuser les nouvelles techniques diagnostiques validées aux laboratoires qui en font la demande,
- Assurer un contrôle de qualité de la mise en œuvre des techniques moléculaires utilisées par les laboratoires hospitaliers dans le cadre du diagnostic des infections invasives à méningocoques,
- Collaborer, notamment par l'échange de souches, avec le Centre national de référence de la résistance aux antibiotiques à l'étude de nouveaux mécanismes de résistance,
- Détecter l'émergence en France de souches nouvelles, de complexes clonaux de souches apparentées, notamment ceux appartenant aux complexes responsables d'épidémies,
- Poursuivre et compléter la collection de souches existantes,
- Expertiser les souches adressées par les laboratoires hospitaliers en particulier par la confirmation des sérotypes, le typage et le sous-typage et l'identification de la sensibilité aux antibiotiques,
- Transmettre, en routine, à l'Institut de veille sanitaire, les résultats des analyses phénotypiques et génotypiques réalisées sur les souches invasives,
- Décrire l'évolution de la sensibilité aux antibiotiques au niveau national pour les antibiotiques à visées curative et les antibiotiques à visée préventive,
- Contribuer, en lien avec les agences de sécurité sanitaire, à l'identification de souches qui pourraient être utilisées à des fins de préparation d'un vaccin en situation de cas groupés de sérotype B,
- Participer à la surveillance européenne et internationale, en collaboration avec l'Institut de veille sanitaire,
- Contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de veille sanitaire les cas groupés liés à une souche commune et tout phénomène inhabituel,
- Contribuer aux travaux de cellules d'urgence ad hoc mises en place par la Direction Générale de la Santé à l'occasion de situations d'alerte.

Outre ces thèmes du cahier des charges, sans cesse enrichis par les innovations du CNR, nous réalisons des recherches expérimentales visant à élucider les déterminants moléculaires qui caractérisent les infections invasives à méningocoques dans le but de trouver de nouveaux marqueurs de virulence et d'identifier de nouveaux vaccins rationnels contre les nouveaux variants génotypiques pathogènes. Nous avons entrepris de qualifier ces souches, non seulement sur la base des données épidémiologiques et cliniques, mais également sur des critères expérimentaux mesurant la virulence et les propriétés pro-apoptotiques, pour mieux préciser les critères d' « hyperinvasivité ». Ce type d'étude illustre bien, de notre point de vue, toute la richesse de l'intrication entre surveillance épidémiologique, les typages moléculaires et l'approche expérimentale fondamentale, dans les activités de CNR. La recherche est indispensable à l'activité de référence.

#### **1.4. Résumé des activités de l'année 2011 : faits marquants, points-clef, contexte, principaux résultats de contribution à la surveillance et à l'alerte.**

Nous étudions et expertisons les souches de *N. meningitidis*, qui nous sont adressées par plus de 700 laboratoires correspondants nationaux. Plus de 75% des souches correspondent à des infections invasives (méningites, méningococcémies, arthrites et péricardites). Les données de 2011 (sur l'ensemble des cas confirmés par culture ou par PCR) montrent que le sérotype B reste majoritaire et est en légère augmentation (72,2%), suivi du sérotype C (15,3%), du sérotype Y (8,7%), du sérotype W135 (2,6%) et d'autres sérotypes ou des souches non groupables (1,2%). Ces pourcentages sont pour les cas confirmés par culture 69%, 17,4%, 10,6%, 2% et 1% respectivement (Fig. 1 cas confirmés par culture). L'augmentation des souches du sérotype Y, observée en 2010, s'est confirmée en 2011. La baisse des cas du sérotype C continue en 2011 mais à un rythme moins important (Fig. 2).

Une attention particulière est portée à l'évolution des caractéristiques des souches invasives, notamment en ce qui concerne leur structure antigénique, leur sensibilité aux antibiotiques, et plus généralement leur génotype, caractérisé par MLST et permettant de les rattacher à un complexe clonal particulier. Plusieurs faits marquants en 2011 :

- En 2011, toutes les souches invasives ont été typées par MLST et 53% des cas confirmés uniquement par PCR sont également caractérisés par MLST. Les données complètes des phénotypes (sérotype:sérotipe :sous-type et antibiogramme) et les données des génotypes (complexe clonal, séquences variables VR1 et VR2 de porA et FetA) sont reportées mensuellement à l'InVS.
- Des changements notables ont été observés concernant la distribution des génotypes (complexes clonaux) majeurs. Les plus fréquents étaient, comme pour les années précédentes et par ordre de fréquence décroissante : ST41/44 (22,3%), ST-32 (19,5%), ST-11 (16,9%) et ST-

269 (5,8%) (Fig. 3 et Fig. 4) . Le nombre et le pourcentage des cas dus au complexe clonal ST-32 est en légère augmentation et cela correspond à l'apparition dans le département du Nord (59) d'une souche proche de celle du département de la Seine Maritime (76). En effet, la souche du département du Nord (B :14 :P1.16, VR1=7-2, V2=16) est proche de la souche épidémique de la Seine Maritime (B :14 :P1.7,16, VR1=7, VR2=16). La nouvelle souche était responsable des cas groupés dans le département du Nord. Le CNR a réalisé une étude d'immunogénicité du vaccin MenBvac® contre cette nouvelle souche. Compte tenu de cette situation épidémiologique des infections invasives à méningocoque B:14: P1.16 dans le département du Nord, le Haut Conseil de la santé publique (HCSP), afin d'éviter la survenue de cas secondaires tardifs dans le réseau social identifié, a recommandé la mise en œuvre d'une vaccination par le vaccin MenBvac® (*Avis du HCSP13/12/2011*)

- Ces cas sont liés à un même clone de méningocoque du complexe clonal ST-269 (VR1porA=22 ; VR2porA=9). Le vaccin MenBvac® n'est pas efficace contre ces souches. Ces souches étaient également impliquées dans des cas groupés d'infections invasives à méningocoque B en particulier dans les Landes (40) depuis plusieurs années.

- l'antibioprophylaxie des sujets contacts lors de situations impliquant plusieurs cas d'infection invasive à méningocoque dans une même communauté. Cela est dû au risque du développement de la résistance aux antibiotiques actuellement utilisés dans l'antibioprophylaxie (en particulier contre la rifampicine). En effet une résistance à la rifampicine a été détectée par séquençage dans l'épisode du département du Nord. Le CNR a activement contribué à la formulation des nouvelles recommandations. En particulier, il est recommandé de prescrire une nouvelle cure d'antibioprophylaxie aux personnes ayant déjà reçu un traitement prophylactique dans un délai supérieur à 10 jours. Ce nouveau traitement prophylactique est effectué à l'aide d'un antibiotique différent de celui utilisé lors de la cure précédente. En pratique, la rifampicine sera remplacée par de la ciprofloxacine ou de la ceftriaxone.

- Les souches du complexe clonal ST-23 sont en augmentation et représentent 6,7%. Ces souches sont du séro groupe Y. Cette augmentation est le reflet de l'augmentation des souches du séro groupe Y constatée en France en 2010 et semble se confirmer en 2011.

- Nous avons continué l'étude inter-laboratoire de détection et d'identification moléculaire par PCR de *N.meningitidis* à partir de dix échantillons biologiques en incluant un nouveau centre hospitalier (le CHU de Nantes). Cette étude a été organisée en France par le CNR en 2010 avec la participation de dix laboratoires de bactériologie des centres hospitaliers et qui représente la seule étude de ce type en Europe parmi les centres hospitaliers d'un seul pays.

#### **1.5. L'Équipe** : personnels dévolus aux activités du CNR et laboratoires associés

- Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur
- Organigramme



Le CNR est dirigé par Muhamed-Kheir TAHA, Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur et un responsable adjoint : Ala-Eddine DEGDMANE, Chargé de Recherche à l'Institut Pasteur. Notre laboratoire dispose d'un réseau de correspondants nationaux incluant plus de 700 laboratoires, majoritairement hospitaliers, et couvrant l'ensemble du territoire. Nous fournissons ces laboratoires en milieu de transport spécifique pour le méningocoque, ce qui leur permet de nous envoyer les souches bactériennes viables dans les meilleurs délais. La procédure de demande du milieu de transport et l'envoi des souches/échantillons est disponible sur le site internet de l'Institut Pasteur (<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante>). En tant que CNR, les arrivages sont immédiatement pris en charge au laboratoire de 9H à 18h les jours ouvrés et de 9h à 13h le samedi. De plus, la réception des souches/échantillons est assurée à l'Institut Pasteur 24h/7j.

Les moyens du laboratoire

**Tableau 1 Les ressources humaines**

Prénoms et Noms	Qualifications	Période de recrutement sur l'exercice en cours en mois	ETP
Muhamed-Kheir TAHA	SCIENTIFIQUE	12	0,75
Ala-Eddine DEGDMANE	SCIENTIFIQUE	12	0,75
Marek SZATANIK	INGENIEUR	12	0,75
Dario GIORGINI	TECHNICIEN SUPERIEUR DE LABORATOIRE	12	0,25
Eva HONG	TECHNICIEN SUPERIEUR DE LABORATOIRE	12	1,00
A RECRUTER	TECHNICIEN SUPERIEUR DE LABORATOIRE	12	1,00
Pascale VIENNE	SECRETAIRE DE DIRECTION	12	0,50
Cartini MARDI	AIDE DE LABORATOIRE	12	0,10
Michel FERREIRA	AIDE DE LABORATOIRE	12	0,10
Nadia OUSSARGHIN	AIDE DE LABORATOIRE	12	0,08
Isabel GALUPA	AIDE DE LABORATOIRE	12	0,10
Claudette FIRPION	RESPONSABLE DE PREPARATION	12	0,10
Nadia SOLEES	AIDE DE LABORATOIRE	12	0,10

#### **1.6. Organigramme nominatif des personnels directement impliqués dans le CNR.**

Secrétariat :

Pascale VIENNE

**Chercheurs :**

TAHA Muhamed-Kheir, Dr en médecine, Dr d'Université (Chef de Laboratoire, Chef d'Unité, Institut Pasteur, Responsable du CNR)

DEGHMANE Ala Eddine, Dr d'Université (Chargé de Recherche Institut Pasteur, Responsable Adjoint du CNR).

**Ingénieur :**

Marek SZATANIK

**Techniciens supérieurs :**

GIORGINI Dario, Technicien Supérieur, Institut Pasteur

HONG Eva, Technicienne Supérieure, Institut Pasteur

LEDROIT Morgan, Technicienne Supérieure, Institut Pasteur (CDD jusqu'au 31/07/2012).

- **Description de la démarche qualité du laboratoire**

Historique :

En 1996, les Centres Nationaux de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur ont entrepris une démarche qualité pour suivre le référentiel GBEA et, depuis 2008, dans le cadre des inspections AFSSAPS, les exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux Micro-Organismes et Toxines (MOT).

En septembre 2010, un état des lieux des dispositions qualité des CNR et des services supports (Service QSE-DD, Pôle équipements, Département Achats, DRH,...) de l'Institut Pasteur assurant un appui efficace et maîtrisé aux CNR a été dressé.

La Direction déléguée Environnement-Sécurité-Logistique (ESL) apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 partielle des CNR (envoi des actes de candidatures pour l'accréditation avant le 31/10/2012 et obtention de l'accréditation ISO 15189 partielle avant le 31 mai 2013) et complète (avant le 1/11/2016) conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 relative aux activités de biologie médicale.

Projet ISO 15189 des CNR de l'Institut Pasteur :

➤ Bilan 2011 :

1. Projet piloté par le service QSE-DD en collaboration avec la Direction Médicale et la Coordination des Centres de Références
2. Appui méthodologique par des consultants extérieurs possédant une expérience des démarches qualité d'accréditation ISO 15189
3. Discussion avec la DGS concernant les activités spécifiques des CNR par rapport à des LBM « classique »
4. Mise en place des dispositions en matière de gestion du matériel, RH, gestion documentaire et achats
5. Acquisition d'un SGL pour la gestion des non conformités, actions d'amélioration et audits qualité pour les CNR

➤ Perspectives 2012 :

1. Sélection des CNR avec une avancée significative dans le déploiement du plan d'action, pour le dépôt de dossier de candidature au COFRAC en octobre 2012 : Mars 2012
2. Lancement d'un GT technique pour mutualiser la méthodologie en matière de vérification/validation de méthode : Mars 2012
3. Audit blanc ISO 15189 : Juillet 2012
4. Revue de direction : Octobre 2012
5. Dépôt de dossier au COFRAC : Octobre 2012

La démarche qualité au sein du CNR des méningocoques est intégrée dans la pratique depuis fin 2002. Nous avons entrepris depuis 2005 une nouvelle démarche qualité en ce qui concerne les techniques moléculaires et les activités de recherche expérimentale. La démarche de qualité prend en compte la spécificité du travail de recherche du CNR. Cela permet d'alimenter notre travail/mission de veille microbiologique par des nouvelles approches. Le Tableau 2 résume l'état actuel de nos démarches de qualité.

Tableau 2

ETAPES	ACTIONS
Préparation	Fait
Organigramme	Fait
Fiches de fonctions	Fait
Intégration d'un nouveau collaborateur	Fait
Parcours d'habilitation	Fait
Tableau de répartition des tâches	Fait
Gestion documentaire	à jour

## Locaux et équipements

Le CRN des méningocoques est hébergé dans l'Unité Postulante : Infections Bactériennes Invasives (IBI). L'Unité est située au Rez-de-chaussée bas de l'aile Bertrand du bâtiment Duclaux à l'Institut Pasteur. Ces locaux ont été refaits à neuf. L'unité dispose des espaces spécifiques (laboratoires de type P2 et Bureaux) de 120 M<sup>2</sup>. De plus, l'Unité profite des espaces communs aux autres Unités et/ou CNR situés dans l'aile Bertrand. Le CNR comporte un laboratoire dédié aux caractérisations bactériologiques, physiopathologiques et immunologiques (niveau de sécurité L2), d'une part, et un laboratoire plus spécifiquement dédié aux caractérisations et typages moléculaires, d'autre part, auquel est annexé un espace confiné (composé de deux modules) pour les techniques d'amplifications géniques (diagnostic par PCR). Ces modules sont organisés avec un sens unique de flux et sont séparés des autres laboratoires du CNR pour réduire le risque de la contamination. La gestion informatisée s'effectue dans un bureau séparé et dédié uniquement à la saisie des fiches de renseignements accompagnant les souches et les prélèvements, ainsi qu'à la validation et l'édition des résultats. Ces locaux, sous assurance qualité, sont régulièrement contrôlés par la commission institutionnelle d'hygiène et sécurité.

L'Unité IBI et le CNR profitent également des plates-formes (PF) techniques de l'Institut Pasteur : la PF Génotypage des Pathogènes et Santé Publique et la génomique.

### **Matériel et équipements :**

Le CNR dispose des équipements standard d'un laboratoire de microbiologie de niveau de sécurité de classe 2.

### **Moyens extérieurs à la structure / Structures transversales**

Le CNR des Méningocoques est le premier utilisateur (séquençage) de la Plate-forme de Génotypage PF8 (plateforme Génotypage des Pathogènes et Santé Publique) à l'Institut Pasteur. Le séquençage des souches invasives par MLST est désormais systématique pour pouvoir les classer au sein des complexes clonaux épidémiques et les comparer au contexte international. Plus de 23000 réactions de séquençage ont été réalisées en 2011 à la plateforme de séquençage des CNR à l'Institut Pasteur. Cela a permis d'avoir en temps réel les informations indispensables à l'analyse de l'ensemble des cas en 2011 et en particulier les cas groupés et les différentes alertes.

## 2. Activités d'expertise :

### 2.1. Capacités techniques du CNR

#### Liste des techniques déjà disponibles pour le diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

Une grande panoplie de techniques est déjà disponible et utilisée pour le diagnostic/typage du méningocoque. Certaines de ces techniques ont été à l'origine développées au sein de notre laboratoire.

**Tableau 3. Analyses effectuées par le CNR**

Techniques	Type	Délais après réception de la souche
Identification bactériologique	identification	2-3 j. si culture pure
Sérogroupage pour l'ensemble des 12 sérogroupes	typage phénotypique	1-2j. 2h par génogroupage si la souche n'est sérogoupée par le laboratoire expéditeur et en situation d'alerte.
Séro et sous-typages	typage phénotypique	1 semaine (selon l'origine).3j en cas d'hyper endémie.
Amplification génique (PCR)	diagnostic sans culture	1à 2 j, selon l'échantillon
Multilocus sequence typing MLST, séquençage de <i>porA</i> et <i>fetA</i>	typage moléculaire	MLST systématique pour tout cas d'IIM. Envoi mensuel à l'InVS
typage PFGE	typage moléculaire	Selon études épidémiologiques/cas groupés
Séquence d'autres marqueurs génétiques : <i>fhbp</i> , <i>porB</i>	typage moléculaire	Selon études épidémiologiques/cas groupés
Antibiogramme et CMI de référence	typage phénotypique	2-3 j. si culture pure
Analyse moléculaire de mécanisme de résistance : séquences de <i>penA</i> , <i>rpoB</i> , <i>gyrA</i> , <i>parC</i> et <i>parE</i> .	typage moléculaire	Selon études épidémiologiques/cas groupés
Tests de bactéricidie	exploration immunologique	Cas d'échec vaccinal, étude d'immunogénicité

#### Les procédures appliquées au CNR.

Le CNR collabore avec un réseau de correspondants nationaux incluant plus de 700 laboratoires, majoritairement hospitaliers, qui adressent leurs souches pour confirmation, détermination du groupe antigénique capsulaire (sérogroupe), du sérotype (protéine de membrane externe, PorB) et sous-type (protéine de membrane externe, PorA). Les immunotypes (immunospecificité du lipooligosaccharide, LOS) sont également déterminés. L'antibiogramme de référence est réalisé selon les recommandations de l'EMGM (*European Monitoring Group on Meningococci*) pour les antibiotiques utilisés dans le traitement et la

chimio prophylaxie. Des études moléculaires complémentaires sont également menées sur les souches résistantes pour identifier les mécanismes moléculaires de cette résistance.

Toute suspicion de cas groupés fait l'objet d'un typage moléculaire des souches exprimant des phénotypes semblables. Les données de surveillance nationale sont régulièrement évaluées avec l'InVS et la DGS, auxquels la liste des souches invasives est communiquée chaque mois, ou plus fréquemment en cas d'alerte. Les correspondants qui n'appliquent pas les techniques de diagnostic moléculaire et de génogroupage nous adressent des échantillons pathologiques (sang, LCR et autres fluides biologiques, ainsi que des biopsies de lésions purpuriques) dans lesquels l'ADN de *N. meningitidis* peut être détecté par PCR avec indication du séro groupe par amplification des gènes de la capsule (génogroupage). Plusieurs méthodes de typage moléculaire sont employées pour les études des cas groupés (MLST, PFGE, *fetA*, *penA*, *porA* et *porB*). Le CNR continue à développer de nouvelles approches moléculaires pour augmenter la résolution des études de comparaison entre les souches.

Une surveillance internationale des souches responsables d'IIM est instaurée en partenariat avec l'EMGM (associant tous les centres de référence européens), l'Organisation Ouest Africaine de la Santé et l'Organisation Mondiale de la Santé.

Les modalités de recueil des souches et des prélèvements adressés au CNR pour diagnostic et typage moléculaires sont organisées selon des procédures adressées à tous nos correspondants. Les milieux de transport spécifiques pour les souches de *Neisseria* (milieu de Vandekerkove), garantissant la viabilité des cultures bactériennes, sont fournis gratuitement aux correspondants nationaux du CNR. Des fiches de renseignements sont également fournies ainsi que le dispositif d'étiquetage à l'adresse du CNR. Les fiches de renseignement, pré-identifiées à l'adresse du CNR des méningocoques, comportent les questionnaires concernant les données cliniques, épidémiologiques et bactériologiques, incluant la détermination du séro groupe (ce document est téléchargeable à partir du site internet [www.pasteur.fr/sante/cnr/](http://www.pasteur.fr/sante/cnr/)). Compte tenu de l'urgence à instaurer une prophylaxie appropriée à l'entourage de chaque cas d'infection invasive, les expertises concernant le séro groupe et la sensibilité aux antibiotiques d'intérêt thérapeutique et prophylactique sont communiquées extemporanément au correspondant par téléphone, ou par E-mail lorsqu'il existe.

### **Techniques en développement en 2011: principes et état d'avancement**

Outre les techniques citées ci-dessus, nous développons des typages complémentaires par séquençage de nouveaux gènes, autres que les gènes utilisés pour le « multilocus sequence typing » (MLST), *porA*, *fetA* et *penA*. Ces approches font l'objet d'évaluations multicentriques au sein de l'EMGM, dans le but de pouvoir proposer un consensus international. Après les travaux antérieurs menés par le CNR sur le séquençage des gènes *penA* et *rpoB*, le CNR vient de finir

une étude européenne sur l'utilisation du séquençage du gène *gyrA* pour le typage des souches de *N. meningitidis* résistantes à la ciprofloxacine. Ce projet a deux objectifs :

- Ajout d'un nouveau marqueur de typage moléculaire,
- Détermination de la valeur critique (*breakpoint*) pour caractériser les souches résistantes à la ciprofloxacine.

Les données de cette étude seront accessibles via le site (<http://pubmlst.org/neisseria/>)

Le séquençage du gène codant pour la protéine de liaison au facteur H (*fhbp: factor H binding protein*) est en cours de développement. Ce gène code pour le candidat vaccin majeur dans les vaccins recombinants en cours de développement par les compagnies pharmaceutiques Novartis et Pfizer.

Le typage par MLST et le séquençage de *porA* et *fetA* sont également développés directement sur les prélèvements biologiques sans culture (Fox AJ, Taha MK, Vogel U. Standardized nonculture techniques recommended for European reference laboratories. FEMS Microbiol Rev 2007; 31:84-8). Le typage de *porA* sans culture a été déjà intégré au schéma en 2011. Le typage FetA sans culture sera ajouté en 2012 pour compléter les typages des cas diagnostiqués par PCR.

### Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

Les souches invasives de *N. meningitidis* font systématiquement l'objet d'une détermination phénotypique complète, incluant : le sérogroupe par agglutination à l'aide d'immuns sérums préparés, évalués et validés au CNR, puis le sérotype (immunospécificité de PorB), le séro-sous type (immunospécificité de PorA) et l'immunotype (immunospécificité du LOS) à l'aide d'une batterie d'anticorps monoclonaux de référence internationale. Ces souches sont ensuite typées par MLST : une séquence type et l'appartenance à un complexe clonal sont déterminées. Le séquençage des gènes *penA*, *porA*, *fetA* et *porB* complète ce génotypage. Depuis 2010, le CNR réalise également le séquençage des gènes *fhbp*, *nadA* et *nhbp* qui sont parmi les composants des vaccins recombinants contre le méningocoque en cours de développement.

Les études par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) sont utilisées en plus dans l'exploration des cas groupés préalablement classés par MLST.

### Collections de souches

Nos procédures consistent à mettre en collection toute souche caractérisée au CNR, répertoriée avec la fiche de paillasse le n° LNP (collection propre au laboratoire). L'effectif en fin de 2011 est de 26500 souches. Certaines souches ayant fait l'objet d'études publiées sont répertoriées par le Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur et, à ce titre, peuvent

être disponibles après évaluation de la demande soumise au CNR.

De plus, le CNR participe à l'effort européen sous l'égide de l'ECDC pour la constitution d'une collection européenne des souches représentatives des souches en circulation en Europe.

Les souches sont conservées en double par cryoconservation dans deux congélateurs à -80°C situés dans le sous-sol du bâtiment Duclaux à l'Institut Pasteur bénéficiant d'un accès réservé. Les congélateurs sont sous système centralisé d'alarme. Une liste de personnes à contacter en cas de panne est établie. Un congélateur de secours est également disponible.

Les demandes des laboratoires académiques pour des souches de la collection seront étudiées dans le cadre de développement par ces laboratoires de méthodes de diagnostic et de typage du méningocoque. Ainsi et durant la période précédente, le CNR des méningocoques a participé activement et a fourni des souches de référence pour la mise en œuvre des techniques de diagnostic par PCR dans plusieurs centres hospitaliers.

Le CNR dispose également d'une collection de souches de référence pour l'antibiogramme du méningocoque qui sont également fournies. Cette collection provient d'une étude de standardisation de l'antibiogramme entre les centres de référence en Europe.

### **Procédure visant à permettre l'accès et le transfert des échantillons collectés dans le cadre de l'activité des CNR**

L'accès aux souches, aux prélèvements biologiques et données associées collectés dans le cadre de l'activité des CNR est conditionné par la mise en place de documents contractuels spécifiques. Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées, la mise en place *a minima* d'un accord de transfert de matériel biologique (Material Transfer Agreement - MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties.

Suivant la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou pas à une contrepartie financière.

Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire. L'unité de recherche reconnue CNR, de par la valorisation de son savoir-faire et de son expertise sur le matériel biologique concerné, reste détenteur des prélèvements biologiques et données associées ou propriétaire des droits existants sur les souches et données associées y afférant.

Différents points essentiels sont appréhendés dans ces accords :

- le partenaire s'engage à n'utiliser les souches, les prélèvements biologiques et données associées que dans le cadre d'un programme de recherche défini spécifiquement.



- les résultats issus du programme de recherche devront systématiquement être communiqués par le partenaire au CNR ; le CNR sera également associé ou remercié dans les publications et/ou aux communications.

- le tiers partenaire s'engage à ne pas transférer les souches, les prélèvements biologiques et les données associées à des tiers et à retourner ou détruire le matériel biologique à la fin du programme de recherche.

En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique et veille à ce que la valorisation du savoir-faire et de l'expertise du CNR ayant conservé, traité, trié et analysé le matériel biologique soit garantie au titre de l'accord.

Lorsque le matériel biologique et les données associées sont mis à disposition dans le cadre d'une collaboration scientifique par laquelle les partenaires s'associent de manière plus conséquente à la réalisation du programme de recherche, la valorisation des travaux menés conjointement devra tenir compte des apports respectifs de chacun des partenaires.

Les accords excluent toute garantie relative (i) à la nature appropriée des souches, des prélèvements biologiques et données associées pour une utilisation spécifique et (ii) à la qualité non-infectieuse du matériel biologique.

L'interdiction de l'utilisation du matériel biologique sur l'homme et sur les animaux, le cas échéant, est également stipulée dans l'accord.

Enfin, le CNR n'assume aucune responsabilité quant à l'utilisation du matériel biologique par le partenaire.

## **2.2. Activité d'expertise de l'année 2011**

Le bilan de toutes les souches étudiées par culture et caractérisations phénotypiques figure au Tableau 4 pour l'ensemble des souches reçues pour expertise en 2011. Plus de 75% des souches du méningocoque reçues au CNR correspondent à des souches invasives mais 16% de ces souches sont envoyées au CNR sans déterminer le sérotype par les laboratoires des centres hospitaliers et pour 2% des souches, le sérotype était erroné.

L'examen des données sur les infections invasives à *N. meningitidis*, établies d'après le nombre de souches adressées au CNR depuis 1989 (Fig. 1), montrait une incidence croissante de 1995 à 2002. A partir de 2003, nous avons observé une diminution du nombre des souches qui est en partie due à la diminution du nombre des cas impliquant des souches des sérotypes C et W135. De plus, un nombre croissant de cas est maintenant diagnostiqué seulement par PCR. En 2011, 140 des cas (28%) biologiquement confirmés l'ont été par PCR. Ces chiffres étaient de 125 cas en 2009 (23%) et 150 (30%) en 2010.

L'évolution de la distribution des sérotypes des souches invasives en 2011 est montrée dans

la Fig 2 en comparaison avec la période 2006-2010 et l'année 2010.

Tableau 4. Nombre de souches reçues et étudiées au CNR EN 2011

<i>Neisseria meningitidis</i>	479
<i>N. gonorrhoeae</i>	4
<i>N. sicca</i>	1
<i>N. cinerea</i>	1
<i>N. perflava</i>	1
<i>Moraxella spp</i>	2
Pas de subculture	19
Absence de <i>Neisseria</i> Ou contamination	18

### Diagnostiques et typages moléculaires de *N. meningitidis*

Le CNR des méningocoques a mis au point et validé une technique de diagnostic direct originale sur produits pathologiques permettant d'établir l'étiologie lorsque la culture a échoué. La caractérisation de *N. meningitidis* directement à partir des prélèvements biologiques (sang, liquide céphalo-rachidien, etc.) permet son identification par l'amplification du gène de régulation *crpA*, puis la prédiction du sérotype de la souche incriminée, par l'amplification des gènes de la capsule (sérotypes A, B, C, Y, W135 et X).

Cette technique est utilisable par tout laboratoire disposant des compétences et installations pour le diagnostic par PCR. Les méthodes mises au point au CNR, et pouvant être utilisées « au lit du malade », sont publiées (Taha MK. J. Clin. Microbiol. 2000 ; 38: 855-7 et Taha *et al.*, J. Clin. Microbiol. 2005; 43:144-9). Elles permettent l'identification d'une centaine de cas additionnels d'IIM, chaque année (en plus des cas confirmés par culture) améliorant ainsi l'exhaustivité de la surveillance microbiologique (tableau 5).

Tableau 5. Infections invasives à méningocoques identifiées par PCR (NG= non génogroupable)

Année	Total	n°positifs*	Génogroupe					
			A	B	C	W135	Y	NG ou autres
2006	304	93	0	59	18	2	1	13
2007	450	172	1	114	41	0	4	12
2008	360	143	0	100	27	3	3	10
2009	404	169	0	127	29	3	2	8
2010	424	195	0	165	18	3	5	4
2011	454	209	0	165	23	8	8	4

Le nombre d'échantillons positifs (pour certains cas, plusieurs échantillons sont testés : LCR et sang, biopsie cutanée)

Le pourcentage des échantillons positifs pour le méningocoque a augmenté entre 2006 et 2011 de 30,6% à 46% respectivement. En parallèle, le pourcentage des cas non groupables a

diminué de 14% en 2006 à 1% en 2011. Ces meilleures performances sont en partie liées à la meilleure communication instaurée avec nos correspondants hospitaliers pour les conditions de prélèvements et d'envoi. A noter que le nombre de PCR sur biopsies cutanées a représenté 10% des tests réalisés. Le pourcentage de PCR positive dans les biopsies cutanées est significativement plus élevé (80% dans les biopsies cutanées contre 46% dans l'ensemble des prélèvements). De plus, des perfectionnements techniques (en particulier la purification de l'ADN dans les échantillons) ont également contribué à améliorer les performances de la PCR. Comme le montrent les bilans des PCR, le nombre des demandes reste stable malgré le fait que certains de nos correspondants introduisent la technique dans leurs laboratoires. Cela s'explique par un nombre croissant des cas diagnostiqués par PCR. Nous continuons notre travail auprès de nos correspondants afin de recevoir la totalité des prélèvements positifs pour un typage complet au CNR. La PCR joue pleinement son rôle de technique de « rattrapage » du diagnostic. En particulier dans le contexte de l'utilisation fréquente d'une antibiothérapie préventive, dès le moindre signe d'alerte de *purpura*, à l'admission aux urgences à l'hôpital. Cette technique est désormais pratiquée par un nombre croissant de nos correspondants.

#### **Remarques et recommandations concernant la PCR « méningocoque »**

Le LCR (200 µl au minimum) doit être acheminé au laboratoire du CNR dans un tube stérile en plastique, à capuchon étanche, de 5 ml, et ne doit pas avoir été manipulé (risque de contamination).

Les prélèvements sanguins (2ml) doivent être recueillis dans un tube sec stérile et ne doivent pas avoir été manipulés (contaminés).

Les échantillons subissent un cycle de congélation/décongélation puis sont portés à ébullition pendant 3 min, avant d'être centrifugés à 10 000 x g.

Pour chaque essai, le mélange réactionnel d'un volume de 50µl contient : 15µl de l'échantillon à tester dans une solution de 60 mM de Tris-HCl (pH 8,8), 17 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de chaque désoxynucléoside triphosphate, les oligonucléotides correspondant à chaque type de PCR à 0,3 µM et 1 unité de Taq polymérase (Invitrogen). La réaction est réalisée en thermocycleur (Techne).

Les oligonucléotides, définis d'après Taha MK (J. Clin. Microbiol. 2000 ; 38: 855-857), sont les suivants :

Oligonucléotide	Séquence amplifiée	Gene (serogroupe)	Taille de l' amplicon
98-6	5'-gctggcgccgctggcaacaaaattc-3'	<i>crgA</i> (tous)	230 bp
98-10	5'-cttctgcagattgCGGCGTgccgt-3'		
98-28	5'-cgcaataggtgtatatattctcc-3'	<i>orf-2</i> (A)	400 bp
98-29	5'-cgtaatagttcgtatgccttct-3'		
98-19	5'-ggatcatttcagtgtttccacca-3'	<i>siaD</i> (B)	450 bp
98-20	5'-gcatgctggaggaataagcattaa-3'		
98-17	5'-tcaaatgagtttgcaatagaaggt-3'	<i>siaD</i> (C)	250 bp
98-18	5'-caatcacgattgccaattgac-3'		
98-32	5'-cagaaagtgagggattccata-3'	<i>siaD</i> (W135)	120 bp
98-33	5'-cacaaccattttcattatagttactgt-3'		
98-34	5'-ctcaaagcgaaggcttggtta-3'	<i>siaD</i> (Y)	120 bp
98-35	5'-ctgaagcgtttcattataattgctaa-3'		

Lorsque la PCR *crgA* est positive, une PCR multiplex permet ensuite de déterminer le génogroupe capsulaire (indication du sérotype). Cette PCR de génogroupage multiplex utilise simultanément les oligonucléotides du gène *siaD* (sérotypes B, C, Y et W135) et du gène *mynB* (sérotype A).

### Epidémiologie moléculaire

Toute suspicion de cas groupés d'IIM fait l'objet d'un typage moléculaire extensif des souches exprimant des phénotypes analogues. En 2011, deux épisodes ont fait l'objet d'analyses génétiques et sérologiques : les cas groupés dans le département du Nord et l'épisode dans le département de la Savoie. Les techniques de typage incluent le "multilocus DNA fingerprinting" (MLDF), le "multilocus sequence typing" (MLST) et l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), elles permettent d'établir des filiations génétiques au sein d'un même complexe clonal et d'effectuer des comparaisons avec des isolats de différents cas groupés ou non, au niveau national et international (Taha MK. Expert. Rev. Mol. Diagn. 2002. 2 :89-96). Le CNR des méningocoques a coordonné une étude européenne portant sur le typage moléculaire des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline G et à la rifampicine par séquençage du gène *penA* et *rpoB* respectivement. Une base de données (<http://pubmlst.org/neisseria/>) a été construite pour ce typage. Le CNR vient d'achever une autre étude européenne portant sur le typage moléculaire des souches résistantes à la ciprofloxacine, par séquençage du gène *gyrA*. Les données seront accessibles bientôt via la base de données (<http://pubmlst.org/neisseria/>).

### Caractéristiques des souches invasives de *N. meningitidis*

Les souches invasives en 2011 présentent une grande diversité phénotypique et génotypique, ce qui reflète une grande variété et variabilité génétique et complique la politique vaccinale.

### **Caractéristiques des souches invasives du séro-groupe B**

Ces souches représentaient 69% en 2011 (68,7% en 2010). Comme le montre la Figure 5, les souches de séro-groupe B se répartissent selon les sérotypes (immuno-spécificité de la porine PorB) 4, 15, 1,14 et 2a (par ordre décroissant). Cependant, 31% des souches invasives de séro-groupe B ne sont pas sérotypables (NT : absence d'expression de PorB ou nouvel antigène non reconnu par les anticorps monoclonaux de référence, listés en Annexe 1). Les séro-sous-types (immuno-spécificité de la porine PorA) sont très diversifiés, 23 combinaisons séro-sous-types ont été détectées. Cependant, 17% des souches invasives ne sont pas séro-sous-typables (NST : absence d'expression de PorA ou nouvel antigène non reconnu par les anticorps monoclonaux de référence, listés en Annexe 1). Plus de 50 combinaisons sérotype :séro-sous-type sont observées parmi les souches invasives du séro-groupe B (Fig. 5). La combinaison la plus fréquente est NT : NST (8.5%).

Les autres phénotypes (séro-groupe : sérotype : séro-sous-type) les plus fréquents parmi les souches invasives du séro-groupe B sont B :14 :P1.7,16 (6,5%) et B :4 :P1.5 (6,5%). Ces deux types de souches appartiennent au complexe clonal ST-32. Le pourcentage des souches B :14 :P1.7,16 était de (9,3%,) pour la période 2006-2010. En 2011, 4 souches sur 16 souches B :14 :P1.7,16 (25%) ont été isolées en Seine Maritime. Cette baisse est en accord avec l'impact positif de la vaccination par le MenBvac® contre les souches B :14 :P1.7,16 en Seine Maritime. Les souches du séro-groupe B appartiennent aux 13 complexes clonaux différents et 13 souches (5,3%) n'appartiennent pas à des complexes clonaux connus. Les complexes clonaux ST41/44 et ST-32 sont les plus fréquents (61% des cas). Le complexe clonal ST-269 semble s'être stabilisé (Fig. 3). Les souches des complexes clonaux ST-213 et ST-461 continuent à augmenter. En 2011, chacun de ces deux complexes représentait 7% des souches du séro-groupe B. Les souches du séro-groupe B semblent donc hétérogènes sur le plan phénotypique et génotypique (Fig. 5).

Quatre souches du séro-groupe B du complexe clonal ST-11 sont détectées. Il est important de souligner qu'aucune souche de ce type n'a été détectée en 2010. (11 souches pour la période 2006-2009). La surveillance de ces souches est importante car elle peut indiquer une commutation (Switch) de la capsule de C vers B. Le faible nombre de ces souches indique qu'actuellement, il n'y a pas de preuves d'une expansion clonale de variant antigénique par changement (commutation) de séro-groupe C vers B et qui risque d'augmenter sous la pression

de sélection immunologique introduite par une vaccination généralisée contre le méningocoque C. Mais l'apparition de ces 4 souches en 2011 doit inciter à la vigilance.

### **Caractéristiques des souches invasives du sérogroupe C**

Le pourcentage des cas dus au sérogroupe C est de 17,4%. Ces souches représentaient 24,2% pour la période 2006-2010 (20,2% en 2010), Les souches du sérogroupe C sont un peu moins hétérogènes que les souches du sérogroupe B et 87,1% des ces souches appartiennent au complexe clonal ST-11. Plusieurs sérotypes sont observés, mais le sérotype 2a représente à lui seul 50% des souches de sérogroupe C en 2011 (49% pour la période 2006-2010). Les souches non sérotypables (NT) représentent 45%. Contre 40% pour la période 2006-2010. Trois séro-sous-types sont les plus fréquents P1.5 (32,2%), P1.5,2 (32,2%) et P1.7,1 (16,1%) alors que 8 % des souches ne sont pas séro-sous-typables (NST). Les séro-sous-types P1.5,2 et P1.7,1 représentent respectivement 36% et 32% des souches non typables (Fig. 6). La baisse des souches du sérogroupe C continue en 2011 mais à moindre rythme et cela est probablement lié au maintien/augmentation des souches C:2a:P1.5,2 et C:NT:P1.5,2 du complexe clonal ST-11 (Fig. 7).

La combinaison C:NT:P1.7,1 représente 14,5% des souches du sérogroupe C. Toutes ces souches appartiennent au complexe clonal ST-11. Cette observation est en corrélation avec celle constatée en 2010 du remplacement des souches C:2a:P1.7,1 par les souches C:NT:P1.7,1. La pertinence de cette observation n'est pas seulement sur le plan épidémiologique mais également sur le plan physiopathologique.

En effet, les travaux de recherche menés dans notre Unité ont récemment montré que la protéine PorB est directement impliquée dans l'induction de l'apoptose dans les cellules épithéliales infectées par le méningocoque et que cette induction est directement liée au pouvoir invasif de la souche bactérienne (Deghmane *et al.*,2009). La proportion des souches C:NT:P1.7,1 confirme l'émergence des nouvelles souches du sérogroupe C depuis 2005. Ces souches continuent à évoluer vraisemblablement par recombinaison et échanges horizontaux d'ADN. Ces observations corroborent donc avec le changement de la stratégie vaccinale en France contre le méningocoque du sérogroupe C.

### **Caractéristiques des souches invasives du sérogroupe W135**

Ces souches représentaient 3,6% pour la période 2006-2010 (2,2% en 2010) et elles sont de 2% en 2011. Le pourcentage des souches du sérogroupe W135 a continué à baisser depuis 2006. L'expansion des souches de phénotype W135:2a:P1.5,2, du complexe clonal ST-

11 était liée au pèlerinage à la Mecque en 2000 et 2001 (10% des souches invasives du méningocoque). La fréquence du sérotype W135 a chuté dès 2003 du fait de la raréfaction des souches W135:2a:P1.5,2 et de la persistance de souches locales du sérotype W135. Les souches sont hétérogènes, cependant deux souches du phénotype W135:2a:P.15,2 du complexe clonal ST-11 sont détectées (Fig. 8). Il faut donc maintenir la surveillance de ce sérotype pour détecter toute nouvelle réémergence locale ou par importation. En effet, les souches du sérotype W135 semblent en augmentation en 2011 dans certains pays de l'Afrique subsaharienne comme c'est le cas au Niger.

### **Caractéristiques des souches invasives du sérotype Y**

Ces souches représentaient 5,1% pour la période 2006-2010 (7,1% en 2010) et 8,7% en 2011. L'augmentation de ce sérotype se confirme donc en 2011. Cette augmentation est observée dans un contexte de baisse de l'incidence des IIM liées aux 2 autres sérotypes (C et W135). En 2011, ces souches restent hétérogènes phénotypiquement et génotypiquement. Les combinaisons phénotypiques les plus fréquentes sont Y:14 :NST (26,3%) et Y :14 :P1.5 (18,4%) (Fig. 9). Les souches du sérotype Y sont en majorité du complexe clonal ST-23 (71,1%) mais avec plusieurs phénotypes et plusieurs combinaisons de VR1, VR2 et FetA.

Une majorité des souches (2010-2011) appartiennent au complexe clonal ST-23 (56%) mais 22% appartiennent au complexe clonal ST-167. Plusieurs combinaisons des marqueurs PorAVR1, PorAVR2, FetA sont également observées parmi ces souches. La combinaison génotypique ST-23 :VR1=5-2 :VR2=10-1 : F4-1 est la plus fréquente et elle est représentée par 16% des souches (Fig.10). Aucune résistance à la rifampicine, ciprofloxacine ou céphalosporines de troisième génération n'a été détectée parmi ces souches.

Les souches du sérotype Y sont souvent isolées chez des sujets de plus de 65 ans. Lorsqu'il s'agit d'un sujet jeune, l'isolement d'une souche du sérotype Y peut évoquer un déficit immunitaire et en particulier les déficits dans les composants tardifs du complément. Dans ce contexte, nous recommandons systématiquement l'exploration du complément.

Cependant, une baisse de l'âge médian des cas est observée en 2009 et surtout en 2010 en comparaison avec les années 2006 à 2008. Ce changement significatif de la répartition des cas d'IIM Y par groupe d'âge en 2010 ne s'est pas poursuivi en 2011 (Tableau 6).

**Tableau 6 Distribution des souches invasives Y en fonction de l'âge**

Année	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Nombre of souches	19	17	25	30	19	25	38
Minimum	1,4	4,4	0,3	0,0	0,3	0,7	0,3
25% Percentile	31,3	21,8	36,6	18,7	19,2	9,8	9,5
Médian	76,1	80,1	74,8	43,6	34,1	20,8	21
75% Percentile	81,4	84,0	80,3	76,2	71,7	56,2	73,5
Maximum	97,0	94,3	102,4	87,8	95,5	95,4	89,6
Moyenne	59,7	60,1	58,4	43,7	44,2	31,6	34,7
Ecart type	31,6	32,1	31,8	28,9	31,7	29,4	32,8
95% CI de la moyenne	44,4	43,6	45,3	32,9	29,0	19,4	22,5
95% CI de la moyenne	74,9	76,5	71,5	54,5	59,5	43,7	50

### Sensibilité aux antibiotiques

Les profils de sensibilité des souches de *N. meningitidis*, isolées d'infections invasives, à la pénicilline G, aux céphalosporines de troisième génération, à la rifampicine et la ciprofloxacine qui sont actuellement les antibiotiques d'intérêt thérapeutique ou prophylactique, ainsi qu'au chloramphénicol (parfois le seul antibiotique disponible en Afrique), et la ciprofloxacine, sont systématiquement déterminés (tableau 7).

La standardisation des conditions techniques de réalisation de ces déterminations est primordiale car des discordances apparaissent parfois entre laboratoires selon le milieu de culture, la densité de l'inoculum bactérien et les conditions d'incubation. C'est dans le but d'établir et valider un consensus sur la standardisation de ces paramètres qu'une étude multicentrique a été réalisée au sein de l'EMGM. Elle a conduit à retenir la méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test, en ensemençant un inoculum standardisé à 0,5 sur l'échelle de Mc Farland sur milieu de Mueller Hinton au sang de mouton (Vazquez *et al.* Antimicrob. Agents Chemother. 2003 ; 47 :3430-4).

Les déterminations des CMI de la pénicilline G montrent que la CMI de 0,125 mg/L, retenue comme valeur-seuil de sensibilité diminuée sur la base des altérations de séquence du gène *penA* codant la protéine de liaison PBP2, est atteinte ou dépassée par 27% des souches. Ce pourcentage est stable entre 2010 et 2011. La proportion des souches de *N. meningitidis* de sensibilité diminuée à la pénicilline G était plus élevée avant 2006 (autour de 32%). La baisse constatée depuis 2006 est liée à la diminution des souches du sérotype C du complexe clonal ST-8 (absentes en 2011) et la diminution des souches de sérotype W135. Aucune souche de *N. meningitidis*  $\beta$ -lactamase (cétinase)- positive n'a été détectée. Les souches de sensibilité réduite à la pénicilline G étaient également de sensibilité réduite à l'amoxicilline.



La distribution des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la pénicilline G est présentée dans la figure 11 pour l'année 2011. L'étendue des valeurs des CMI est 0,008-0,5 mg/L. En outre, les valeurs de CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> pour l'ensemble des souches et étaient de 0,047 et 0,190 respectivement en 2011. Ces valeurs étaient de 0,064 et 0,250 respectivement en 2010, ce qui reflète davantage la baisse des souches de sensibilité réduite à la pénicilline. La diminution de la sensibilité à la pénicilline G reste donc modeste selon les CMI et ne semble pas s'étendre. Des observations similaires sont également faites pour l'amoxicilline. Cela justifie l'indication de l'utilisation de la pénicilline G et de l'amoxicilline dans le traitement des infections invasives à méningocoque, bien que les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération (céfotaxime et ceftriaxone) soient les plus souvent utilisées en première intention, selon les recommandations de la Société Française de Pathologie Infectieuse.

Toutes les souches étaient sensibles aux céphalosporines de troisième génération (céfotaxime et ceftriaxone), et au chloramphénicol. Une souche de sérogroupe C était résistante à la rifampicine (CMI>32 mg/). Un autre cas (génogroupe B) de résistance à la rifampicine a été détecté sans culture par séquençage du gène *rpoB*. Une souche de sérogroupe B était résistante au ciprofloxacine (CMI>0,06 mg/L).

Tableau 7. Profils d'antibio-sensibilité des souches d'infections invasives étudiées en 2011.

Antibiotique	Catégorie*	B	C	Y	W135	autres
PénicillineG**	S	171	56	31	3	3
	I	77	8	7	4	1
	R	0	0	0	0	0
Céfotaxime	S	248	63	38	7	4
	I	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0
Rifampicine	S	248	62	38	7	4
	R	0	1	0	0	0
Ciprofloxacine	S	247	63	38	7	4
	R	1	0	0	3	1
Chloramphénicol	S	248	63	38	7	4
	I	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0

\*S= sensible, I= intermédiaire, R= résistant

\*\*Pen<sup>S</sup>, susceptible à la pénicilline G (CMI E-test<sup>®</sup> < 0,125 mg/L) ; Pen<sup>I</sup>, CMI de pénicilline G ≥ 0,125 mg/L et Pen<sup>R</sup> ; CMI>1mg/L.

### **3. Activités de surveillance**

#### **3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections**

**Le CNR des méningocoques collabore avec près de 700 laboratoires de microbiologie clinique en France, ainsi qu'avec les autorités nationales de santé (DGS, InVS), le Groupe Européen de Surveillance des Méningocoques (EMGM), l'OMS et les Instituts Pasteur du Réseau International.**

Pour la surveillance nationale, nous intervenons en tant que partenaires microbiologistes de l'InVS, avec qui les interactions sont constantes, lorsque nous sont signalés par celui-ci des cas groupés, géographiquement et temporellement, repérés grâce aux déclarations obligatoires. Ce sont là des éléments qui nous sont rarement accessibles de manière directe car les patients sont souvent hospitalisés dans des hôpitaux différents (parfois même des départements différents) et que leurs adresses et contacts éventuels nous sont inconnus.

Notre rôle consiste à établir d'éventuelles filiations génotypiques entre les différents isolats cliniques de ces patients. Dans d'autres circonstances, nous repérons un nouveau clone ou variant phénotypique, ou bien une fréquence anormalement élevée d'un génotype connu dans une région donnée. Toujours en partenariat avec l'InVS et les intervenants régionaux, nous procédons alors à un suivi extrêmement serré du clone incriminé.

En 2011, les cas groupés d'IIMB dans le département du Nord (Avesne sur Helpe) ont fait l'objet d'analyse détaillée pour leur caractérisation et une exploration de l'immunogénicité du MenBvac® contre le clone identifié. Les souches sont du complexe clonal ST-32 comme la souche B:14:P1.7,16 Normande de la Seine Maritime. Comme la souche Normande, la souche isolée à Avesne sur Helpe présente le même épitope de PorA VR2=16. Cependant, la souche d'Avesne sur Helpe possède l'épitope VR1= 7-2 qui diffère de l'épitope VR1= 7 de la souche Normande par la délétion de trois acides aminés ce qui empêche la reconnaissance de cet épitope par l'anticorps monoclonal P1.7 (on parle alors d'épitope caché). La souche est donc du génotype VR1=7-2 VR2=16 pour PorA mais elle n'est pas reconnue par l'anticorps P1.7 et elle n'est pas du sous-type P1.7,16 comme la souche Normande mais du sous-type P1.16 (phénotype). La réponse immunitaire induite par les vaccins de type OMV est majoritairement dirigée contre la protéine PorA et en particulier l'épitope VR2 de cette protéine PorA. Le CNR a donc exploré l'immunogénicité du vaccin Norvégien « MenBvac™ » contre la souche B:14 :P1.16.

**Comparaison de l'activité bactéricide des sérums (SBA) entre la souche B :14 :P1.7,16 (Seine Maritime) et la souche B :14 :P1.16 isolée dans le Nord en utilisant du sérum humain comme source de complément (hSBA)**

Le CNR a testé donc l'immunogénicité du vaccin Norvégien « MenBvac™ » vis-à-vis de la souche isolée dans le département 59 et 15 paires de sérums des enfants vaccinés lors de la campagne de vaccination dans les cantons de Neufchâtel-en-Bray et Forges-les-Eaux (avant la vaccination et 6 semaines après la troisième dose) ont été testés. Les résultats sont résumés dans le tableau 8.

**Tableau 8. Dosage de l'activité bactéricide**

hSBA	Avant vaccination			Après la 3 <sup>ème</sup> dose		
<b>Souches</b>	B :14 :P1.7, 16	B :14 :P1 .16	B :14 :NST	B :14 :P1.7, 16	B :14 :P1.16	B :14 :NST
<b>N° de sérums</b>	15	15	15	15	15	15
<b>Moyenne géométrique</b>	2,09	2,19	2,00	7,29	13,3	2,00
<b>IC 95%</b>	1,90-2,31	1,92-2,51	2,00-2,00	3,39-15,7	6,30-28,1	2,00-2,00

La p-value est de 0,0005 et 0,0287 pour les souches B :14 :P1.7,16 et B :14 :P.16 respectivement (avant vaccination et 6 semaines après la troisième dose). Le test bilatéral de Wilcoxon est donc significatif : on observe une augmentation significative des titres hSBA après la 3<sup>ème</sup> dose de vaccin. Pour la souche B:14 :NST, utilisée comme contrôle négatif, il n'y a pas d'augmentation des titres hSBA après la 3<sup>ème</sup> dose de vaccin contre cette souche. Les différences entre les moyennes géométriques pour les deux souches B :14 :P1.7,16 et B :14 :P.16 ne sont pas significatives après la troisième dose (p-value de 0,1989) avec une bonne corrélation des titres entre les deux souches.

Le pourcentage des sérums avec un titre d'au moins 4 est de 80% pour la souche Normande B :14.P1.7,16 (95%IC 55%-93%) et de 95% pour la souche Avesne sur Helpe B :14 :P1.16 (95% IC 70%-99%). (Fig.12)

Ces résultats confirment que la réponse immunitaire induite par les vaccins de type OMV est majoritairement dirigée contre l'épitope VR2 de la protéine PorA. Le vaccin Norvégien « MenBvac™ » semble avoir une efficacité semblable, en terme d'activité bactéricide et après la troisième dose, sur la souche B:14 :P1.7,16 de la Normandie et la souche B:14:P1.16 isolée dans le département 59.

### **3.2. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux**

Toutes les souches sont systématiquement éprouvées par E-test contre les antibiotiques d'intérêt thérapeutique (béta-lactamines, chloramphénicol) et prophylactique (rifampicine et ciprofloxacine). Voir le tableau 7, ci-dessus. Des analyses complémentaires par séquençage des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques sont également réalisés (*penA*, *rpoB* et *gyrA*)

## **4. Alerte**

Le CNR des méningocoques alerte extemporanément la DGS et l'InVS ainsi que les correspondants régionaux concernés lors de la survenue de cas de méningococcies dues à des souches clonales, des cas groupés, ou des souches inhabituelles. Des cas groupés ou suspects de cas groupés sont étudiés en collaboration avec les correspondants biologistes et cliniciens locaux, l'InVS et les ARS. Outre les procédures d'alerte en cas d'événement inhabituel, un bilan mensuel exhaustif est adressé chaque mois à l'InVS.

Les données sur les méningococcies survenant en France sont régulièrement confrontées aux données européennes (EMGM) et le ECDC, Nord américaines (CDC) et africaines. A noter ici que notre laboratoire est également désigné depuis Novembre 2011 centre collaborateur OMS pour le méningocoque.

## **5. Activités d'information, de formation et de conseil**

### **-auprès du Ministère de la Santé.**

Les responsables du CNR participent activement aux travaux du "groupe méningites" du Haut Conseil de Santé Publique (élaboration des recommandations sur la surveillance et le contrôle des infections à méningocoques). Ils participent également aux cellules d'aide à la décision organisées par la Direction Générale de la Santé (DGS). M-K Taha était membre du Comité Technique de Vaccination (CTV) et du groupe méningocoque du CTV jusqu'à 2010 et a participé activement aux travaux d'évaluation et recommandations de stratégies vaccinales contre les infections invasives à méningocoque en France.

### **-auprès des professionnels de la santé.**

Le compte rendu d'expertise d'une souche bactérienne ou le diagnostic moléculaire est adressé sans délai au correspondant.

Dans le cas des souches, le compte rendu est émis en deux étapes. La première comporte l'identification et le sérotype (antigènes polysaccharidiques de la capsule) ainsi que l'antibiogramme. La seconde complète le typage antigénique par la détermination du sérotype et du séro-sous-type (typage par une batterie d'anticorps monoclonaux contre les protéines

majeures de membrane PorB et PorA).

Notre activité de conseil à nos correspondants biologistes et cliniciens (pédiatres, réanimateurs et urgentistes) est quotidienne, par téléphone essentiellement, pour pratiquement un tiers des cas d'infections invasives : formes cliniques graves, telles que *purpura fulminans*, formes inhabituelles ou rares (formes récidivantes chez les immunodéprimés, souches de sérogroupes rares, diagnostics différentiels de méningites, etc.). Les travaux de recherche et les synthèses de travaux et d'expertises sont régulièrement publiés dans la presse scientifique et médicale et communiqués dans des congrès à l'échelle nationale et internationale.

Nous répondons à toute demande d'intervention sur le terrain, soit pour l'investigation de cas groupés ou supposés tels, soit pour toute demande de formation.

Des recommandations techniques sont également disponibles sur le site du CNR <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/meningo/meningo-pratique.html>.

De plus, le CNR participe régulièrement aux formations organisées par l'InVS pour les acteurs de terrain sur l'épidémiologie moléculaire appliquée à la surveillance et au contrôle des maladies infectieuses. Le CNR répond favorablement à toute sollicitation de formation par les DDASS/ARS pour répondre aux interrogations pratiques des professionnels de terrain pour la gestion des cas d'infection invasive à méningocoque. A titre d'exemple : le CNR participe régulièrement à la formation organisée par l'InVS sur l'épidémiologie moléculaire appliquée à la surveillance et au contrôle des maladies infectieuses.

## **6. Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR**

### **6.1. Etude de la couverture des souches invasives en France par le vaccin recombinant contre le méningocoque du séro groupe B**

La prévention des maladies invasives causées par les souches du séro groupe capsulaire méningocoques B (MenB) est un besoin médical non satisfait. Un obstacle majeur au développement d'un vaccin B Men est que la capsule polysaccharidique n'est pas immunogène, comme il est pour d'autres groupes capsulaires, ce qui rend nécessaire d'utiliser des protéines de surface comme immunogènes vaccinaux. Un nouveau vaccin multicomposant MenB (4CMenB) est en cours de développement. Il contient trois antigènes : le facteur H protéine de liaison (fHbp), la protéine de Neisseria de liaison à l'héparine (NHBA) adhésine A de Neisseria (NadA) ; de plus, ce vaccin contient un quatrième composant qui est la préparation OMV-NZ (PorA P1.4).

Les protéines de surface à méningocoques ont une variabilité inhérente qui découle de nombreux mécanismes, y compris la recombinaison et la variation de phase. Par conséquent, l'impact potentiel d'un vaccin à base de protéines circulant sur les bactéries MenB dépend de l'ampleur de l'immunité induite, la capacité de tuer les souches MenB ayant des séquences

différentes d'antigènes et les niveaux d'expression de ces protéines dans les différentes souches. Pour surmonter ces problèmes, un nouveau test a été développé (Le *Meningococcal Antigen Typing System* MATS).

Ce test utilise des anticorps polyclonaux dirigés contre trois composantes du vaccin (fHbp, NHBA et NadA) pour la détection des antigènes dans un test ELISA. Les souches qui répondent à un seuil minimum de réactivité à fHbp, NadA ou NHBA dans le test ELISA-MATS ou qui expriment la PorA P1.4 devraient être couverts par 4CMenB.

Le CNR a contribué à la première application du MATS à grande échelle (France, Allemagne, Angleterre et Pays de Galles, l'Italie et la Norvège) afin d'estimer la couverture vaccinale par le vaccin 4CMenB.

Le MATS a prédit que sur les souches étudiées en France la couverture est de 84.5% (95% IC : 73.5 – 96.5). En Europe (sur l'ensemble des pays de l'étude), cette couverture est de 78% de toutes les souches MenB (95% IC :66-91%).

## **7. Liste des publications 2011 en lien direct avec l'activité du CNR**

### **Publication nationales**

- 1- Parent du Châtelet I, Taha M-K, Lepoutre A, Maine C, Deghmane AE, Lévy-Bruhl D. Les infections invasives à méningocoques en France en 2010. Bull Epidemiol Hebd **2011**; (45-46): 475-480.
- 2- Taha M-K. President of the working group for the redaction of the manual of the management of invasive meningococcal infections in France: "INSTRUCTION N° DGS/RI1/2011/33 du 27 janvier 2011 relative à la prophylaxie des infections invasives à méningocoque" [http://www.circulaires.gouv.fr/pdf/2011/02/cir\\_32603.pdf](http://www.circulaires.gouv.fr/pdf/2011/02/cir_32603.pdf)

### **Publications internationales**

1. Basmaci R, Mariani P, Delacroix G, Azib S, Faye A, Taha M-K, Bingen E, Bonacorsi S, Romero JR, Rotbart HA, Nyquist AC, Nolte FS. Enteroviral meningitis does not exclude concurrent bacterial meningitis. J Clin Microbiol **2011**; 49(9): 3442-3.
2. Bertrand S, Van Meervenne E, De Baere T, Vanhoof R, Collard JM, Ruckly C, Taha M-K, Carion F. Detection of a geographical and endemic cluster of hyper-invasive meningococcal strains. Microbes Infect **2011**; 13(7): 684-90.
3. Caron F, du Chatelet IP, Leroy JP, Ruckly C, Blanchard M, Bohic N, Massy N, Morer I, Floret D, Delbos V, Hong E, Revillion M, Berthelot G, Lemee L, Deghmane AE, Benichou J, Levy-Bruhl D, Taha M-K. From tailor-made to ready-to-wear meningococcal B vaccines: longitudinal study of a clonal meningococcal B outbreak. Lancet Infect Dis **2011**; 11(6): 455-63.
4. Harrison LH, Pelton SI, Wilder-Smith A, Holst J, Safadi MA, Vazquez JA, Taha M-K, LaForce FM, von Gottberg A, Borrow R, Plotkin SA. The Global Meningococcal Initiative: recommendations for reducing the global burden of meningococcal disease. Vaccine **2011**; 29(18): 3363-71.
5. Harrison OB, Brueggemann AB, Caugant DA, van der Ende A, Frosch M, Gray S, Heuberger S, Krizova P, Olcen P, Slack M, Taha M-K, Maiden MC. Molecular typing

methods for outbreak detection and surveillance of invasive disease caused by *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*, a review. *Microbiology* **2011**; 157(Pt 8): 2181-95.

### **Communications internationales**

1. Vazquez JA, Abad R, Claus H, Deghmane AE, Enríquez R, Fazio C, Ronkiewicz P, Skoczynska A, Stefanelli P, Taha M-K, Thulin S, Unemo M, Vogel U, Wasko I. The mtrcde operon: an unstable region in *Neisseria meningitidis*. In 11th EMGM Congress. **2011**. Ljubljana, Slovenia.
2. Taha M-K, Abad R, Deghmane AE, Enríquez R, Fazio C, Stefanelli P, Thulin-Hedberg S, Unemo M, Vazquez JA. Target gene sequencing to define the meningococcal breakpoints for ciprofloxacin. In 11th EMGM Congress. **2011**. Ljubljana, Slovenia.
3. Bambini, S Muzzi1 A, Comandi S, Lucidarme J, Klaus H, Taha M-K, Stefanelli P, Caugant D, Borrow R, Vogel U, Mastrantonio P, Mayer L, Donnelly JJ, Rappuoli R,, Pizza, M, Comanducci M. . Variation of the *Neisseria heparin* binding antigen of meningococcus. In 11th EMGM Congress. **2011**. Ljubljana, Slovenia.

### **Conférences sur invitation**

1. Taha M-K. L'infection par le virus influenza A fait-elle le lit de l'infection invasive à méningocoque? 10<sup>ème</sup> journée du Groupe Transplantation et Infection **Paris 4 Mars 2011**.

## **8- Programme d'activité N+1 et N+2**

### **Typage des souches pour l'évaluation de l'efficacité des futurs vaccins contre le méningocoque B**

Nous allons travailler sur le transfert du typage par le MATS vers l'utilisation en routine au CNR pour la future surveillance des infections invasives à méningocoque. En effet, la mise sur le marché des vaccins contre le méningocoque B posera la question de la recommandation des ces vaccins (utilisation en routine ou en vaccination ciblée).

L'évaluation de l'expression des protéines bactériennes ciblées par le vaccin dans les différentes souches sera déterminante.

De plus, des techniques de typage de la variation génétique des composants du vaccin 4CMenB seront également développées afin d'évaluer cette diversité avant l'introduction du vaccin et apprécier l'impact du vaccin sur l'écologie bactérienne. Des bases de données des polymorphismes des gènes codant pour Fhbp, NadA et NHBA seront développées. Notre objectif est de détecter de nouveaux marqueurs qui permettront une meilleure surveillance

bactériologique en fonction de l'introduction des nouveaux vaccins.

Sur un plan plus fondamental, Nous allons aborder l'étude de l'impact de la variation des antigènes fHbp, NadA et NHBA sur le pouvoir invasif des souches du méningocoque. Des approches de biologie cellulaire et le modèle animal seront utilisés.

Le CNR participera avec plusieurs autres laboratoires de référence en Europe à un projet de surveillance des infections bactériennes invasives (*N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*) en partenariat avec le eCDC. Ce projet a pour but de construire un réseau européen de laboratoires pour la surveillance de ces infections, évaluer l'utilisation des approches moléculaires dans les analyses épidémiologiques et élaborer et conduire des études de contrôle de qualité. Dans le cadre de ce projet, nous projetons de mener une action concertée avec nos collègues européens pour le développement de ce type de test

### **Typage moléculaire pour la surveillance de la sensibilité aux antibiotiques**

Les perspectives et grandes lignes du programme d'activité des années futures portent tout naturellement sur l'amélioration constante des techniques d'expertise des isolats cliniques (souches et échantillons pathologiques pour diagnostics moléculaires).

Nous allons travailler à la standardisation de typage des souches du méningocoque. Nous allons également entreprendre l'introduction d'une nouvelle approche moléculaire pour la détection de la résistance à la ciprofloxacine (analyse des gènes *gyrA*, *parC* et *parE*). Cette étude doit compléter les deux autres études déjà pilotées par le CNR pour l'analyse de la résistance à la rifampicine et la diminution de la sensibilité à la pénicilline G.

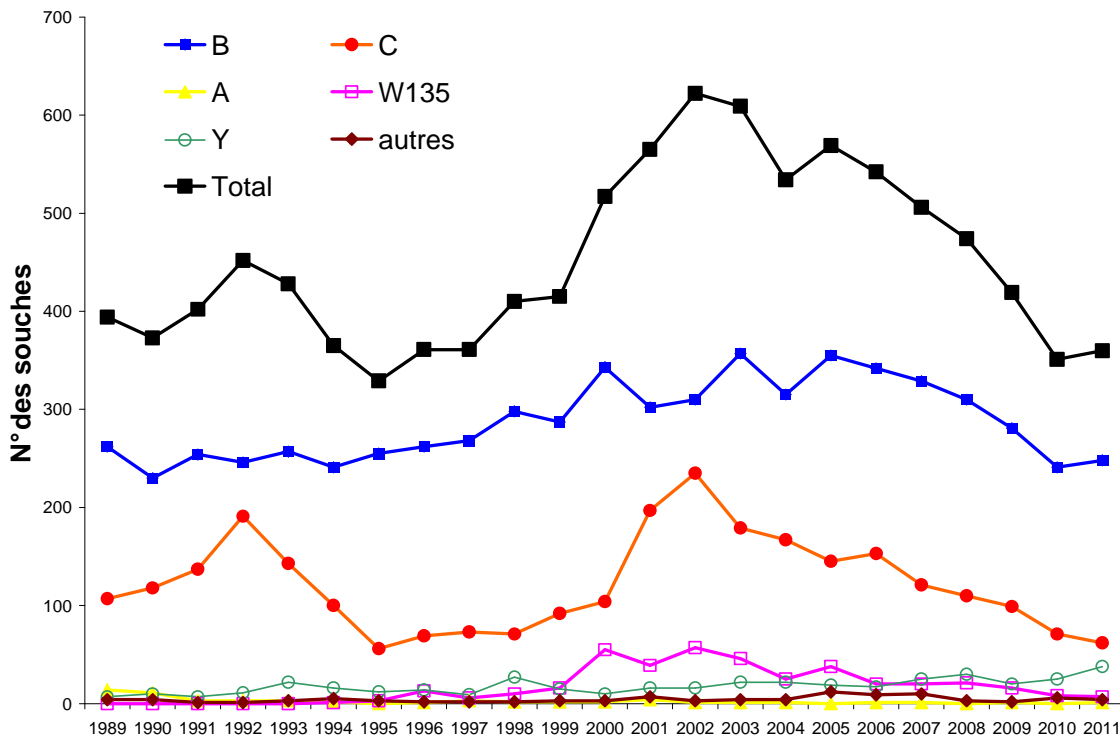
### **Corrélation entre phénotype et virulence**

le méningocoque, est une espèce bactérienne très variable et adaptée à l'homme. L'acquisition de la bactérie conduit souvent à un portage asymptomatique du rhinopharynx, sa porte d'entrée, mais rarement à des infections invasives (essentiellement des méningococcémies accompagnées ou non de choc septique mortel, et des méningites). Les souches invasives, contrairement aux souches de portage, sont capables d'induire l'apoptose des cellules épithéliales infectées. Cette induction semble impliquer au moins deux molécules bactériennes, l'endotoxine ou lipooligosacharride et la protéine de membrane externe PorB. Des variants de la protéine PorB peuvent donc avoir un impact sur la capacité de la bactérie à induire l'apoptose et donc modifier le pouvoir invasif de la bactérie.

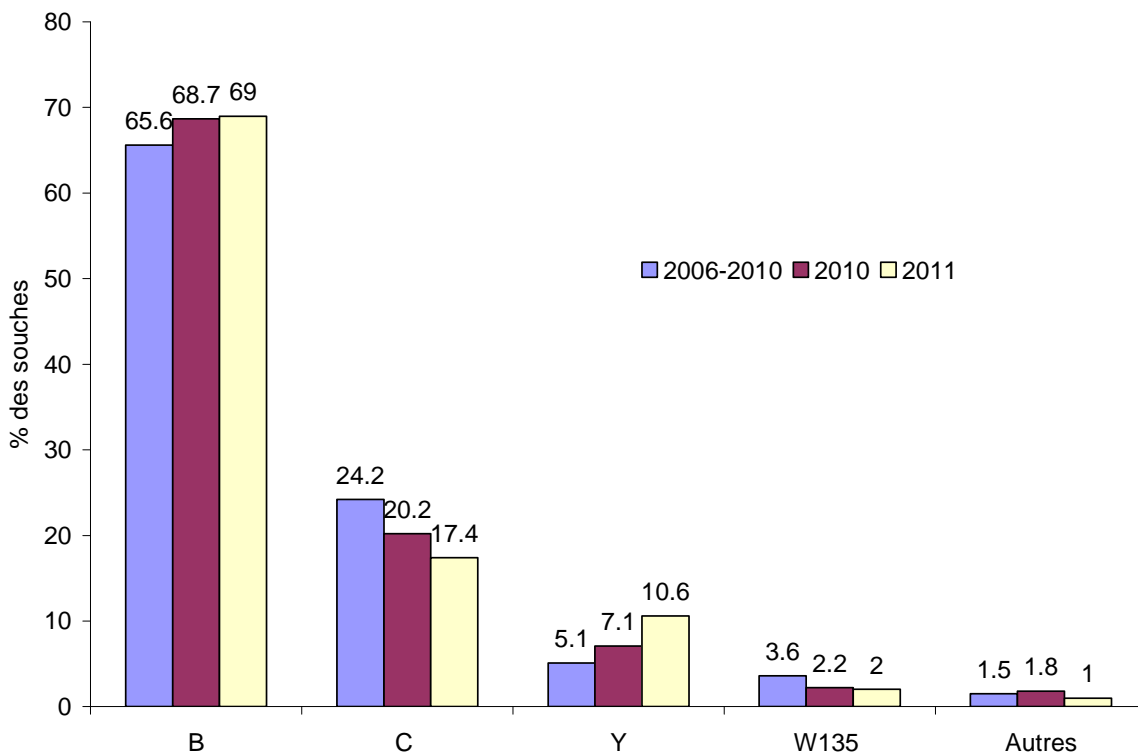
Nous avons décrit l'émergence d'un nouveau clone du phénotype C:2a:P1.7,1 en France depuis 2005. Cette émergence était un élément dans le changement de recommandation concernant la vaccination contre le méningocoque C en France en 2009. Cependant, et depuis 2009, une



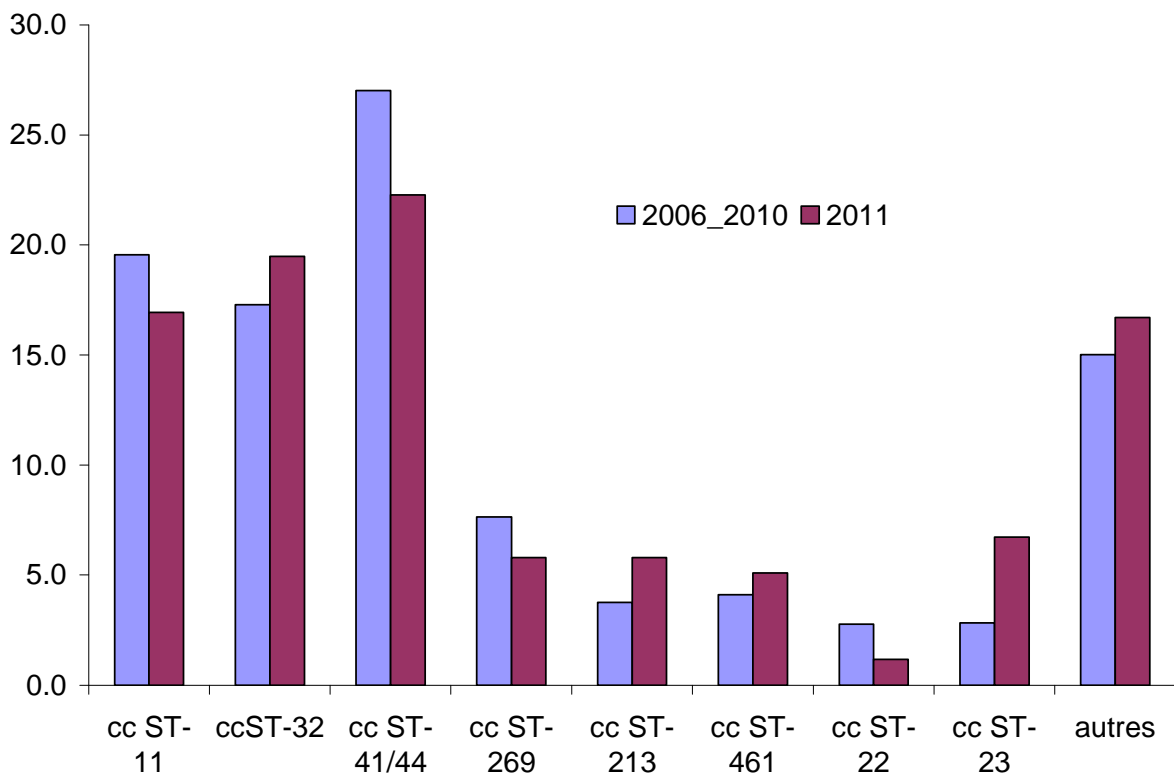
autre combinaison (séro groupe :sérotype :sérosoustype C :NT :P1.7,1) semble remplacer les souches C :2a :P1.7,1. En effet, le séquençage du gène porB révèle que la boucle V de la protéine PorB a changé (par l'insertion d'un acide aminé dans cette boucle) dans les souches C :NT :P1.7,1 en comparaison aux souches C :2a :P1.7,1. Nous projetons d'explorer la pertinence de cette observation sur le plan épidémiologique et sur le plan physiopathologique. Le projet consiste à purifier la protéine PorB de ces variants et de comparer leur capacité d'induire l'apoptose des cellules épithéliales à celle d'autres variants de PorB. La comparaison de la virulence des ces souches sera également entreprise dans le modèle animal développé dans notre laboratoire (la souris transgénique exprimant la transferrine humaine).



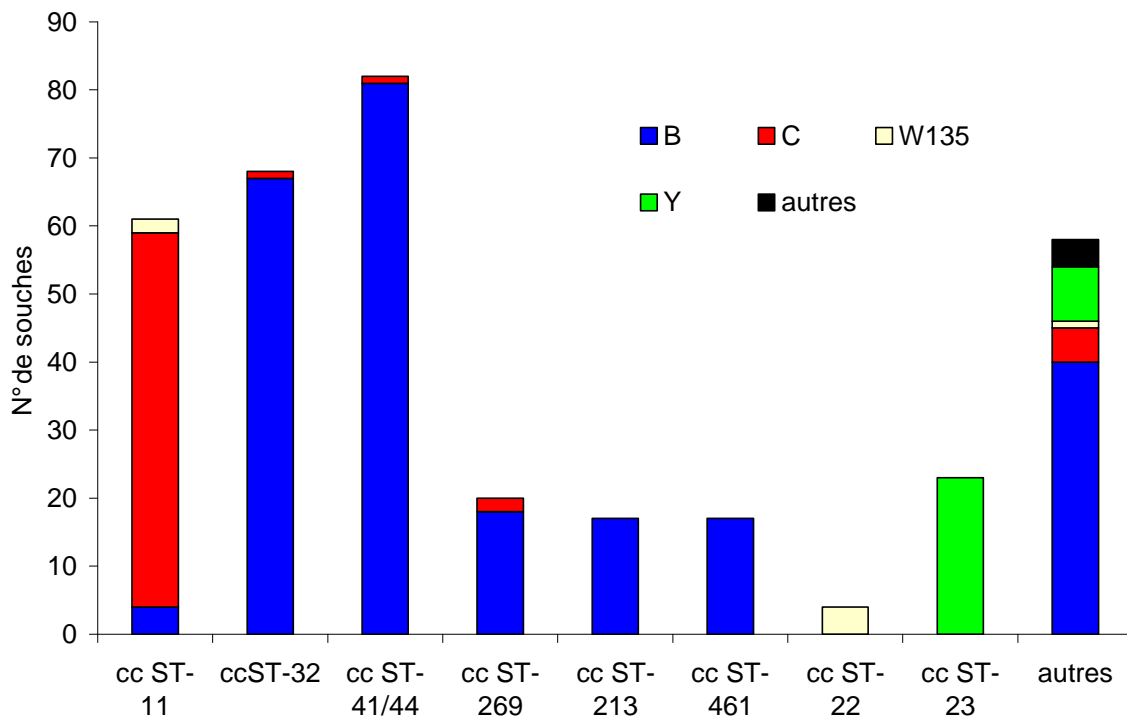
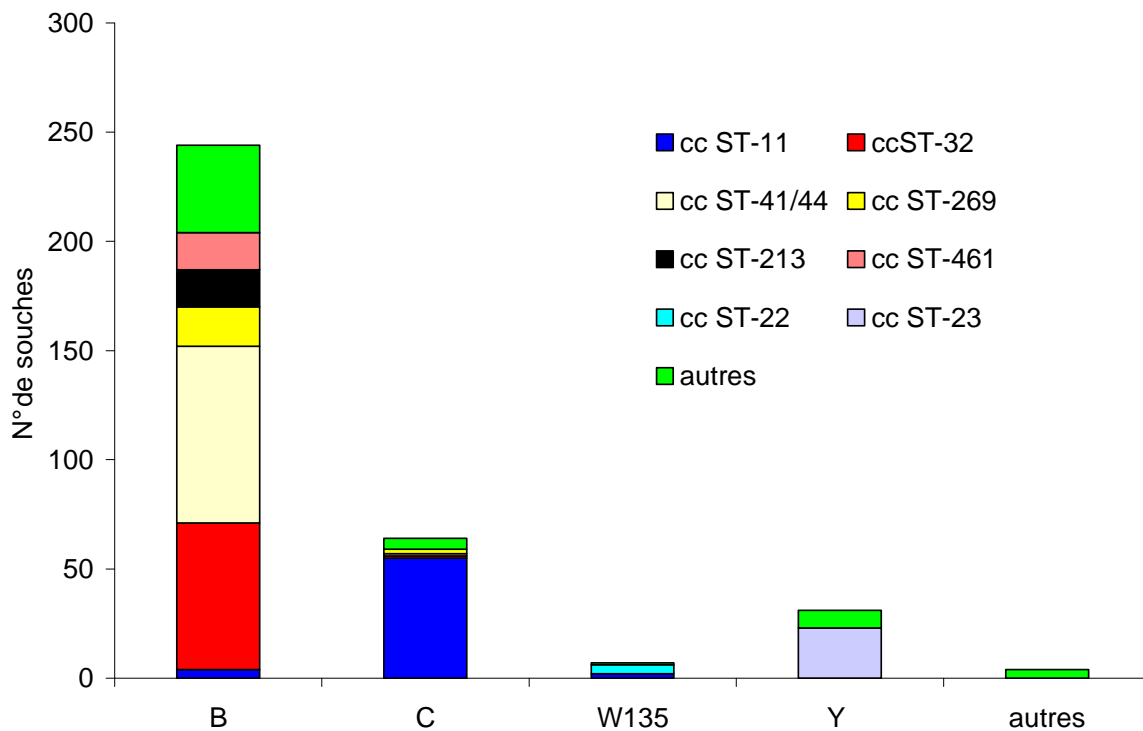
**Figure 1** : Évolution de la distribution des sérogroupes des souches de méningocoques responsables d'infections invasives en France (nombre d'isolats cliniques confirmés par culture chaque année et reçus au CNR).



**Figure 2.** Pourcentages des souches invasives en fonction de leurs sérogroupes en 2010 et en 2011 et une comparaison avec l'ensemble des souches invasives de la période 2006-2010



**Figure 3** : Evolution de la distribution (en pourcentage) des complexes clonaux majeurs en France entre 2006 -2010 et 2011.

**A****B**

**Figure 4 A** : Distribution des complexes clonaux en fonction des sérogroupes des souches invasives en 2011. **B** : Distribution des sérogroupes en fonction des complexes clonaux des souches invasives en 2011

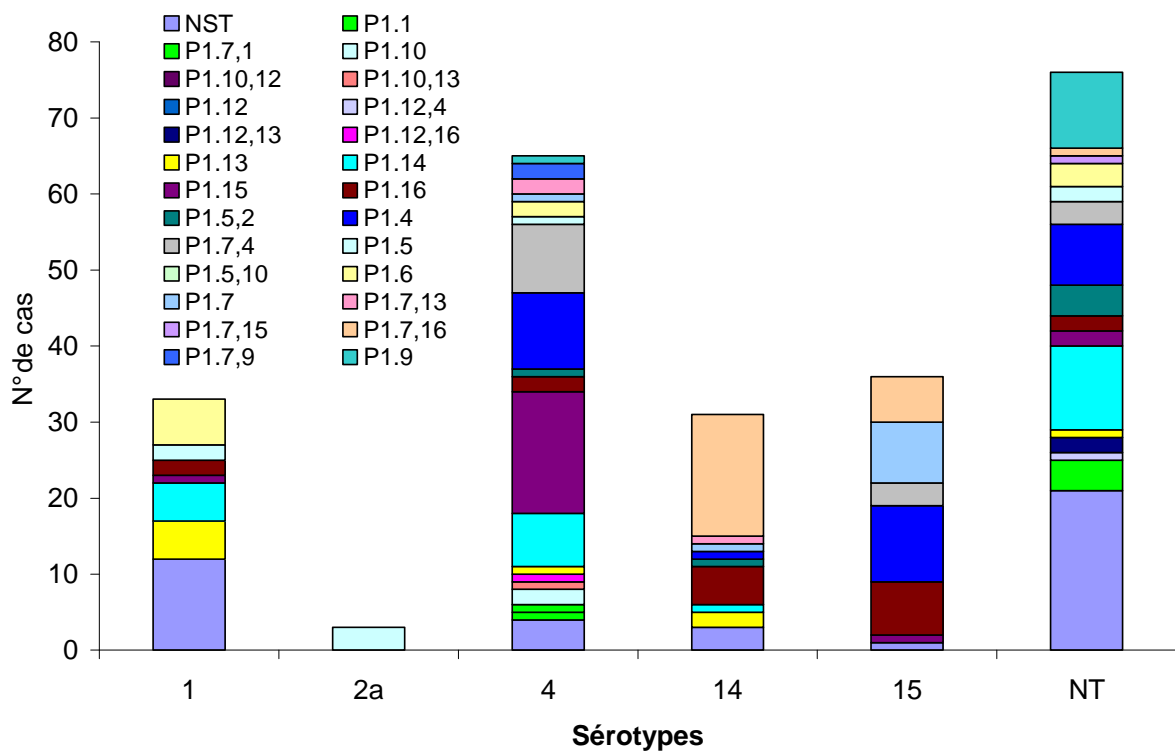


Figure 5 : Phénotypes des souches invasives du sérotype B en 2011.

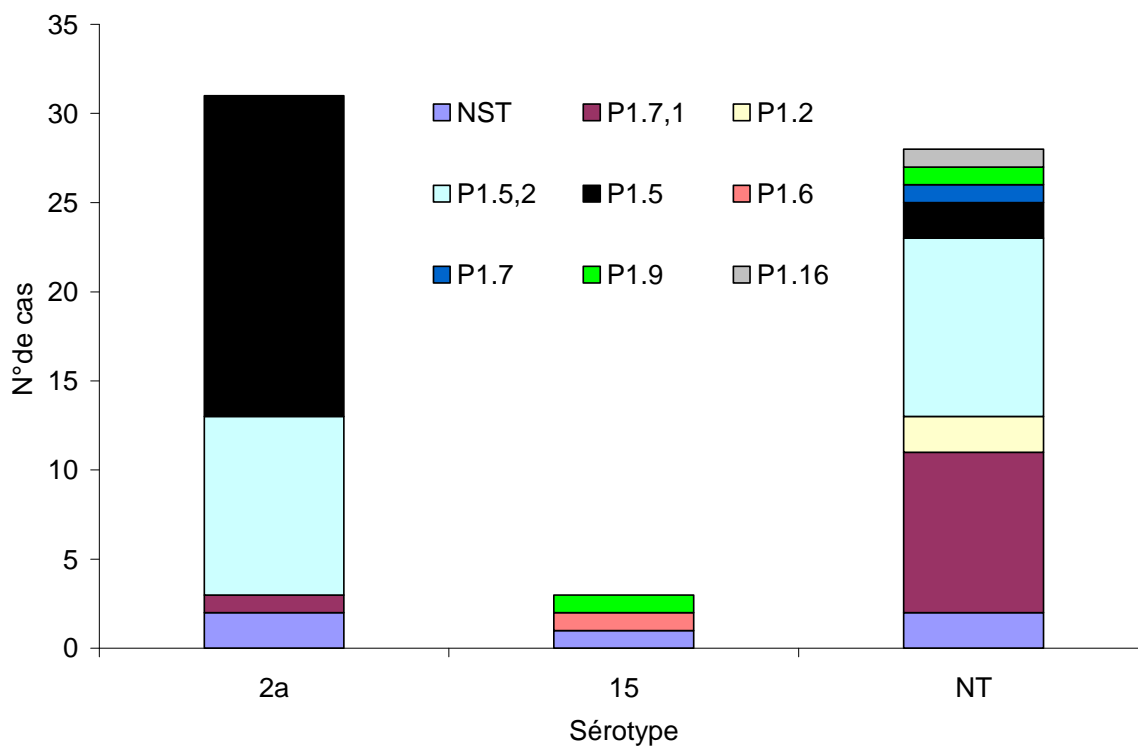


Figure 6 : Phénotypes des souches invasives du sérotype C en 2011.

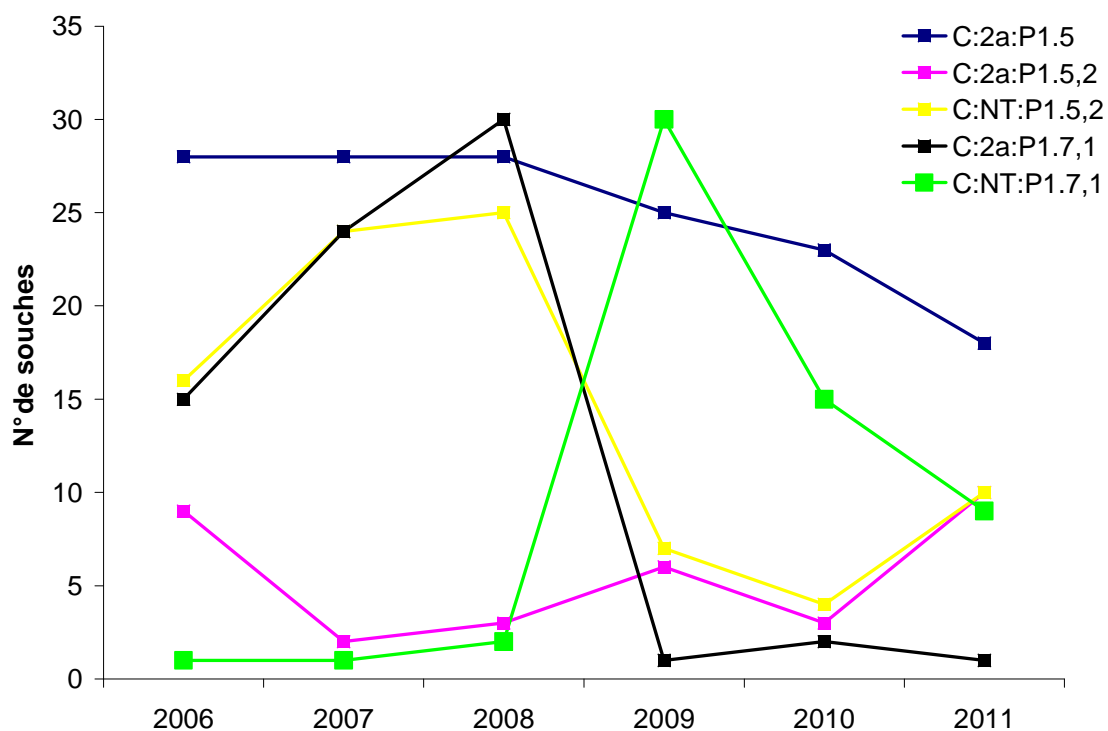
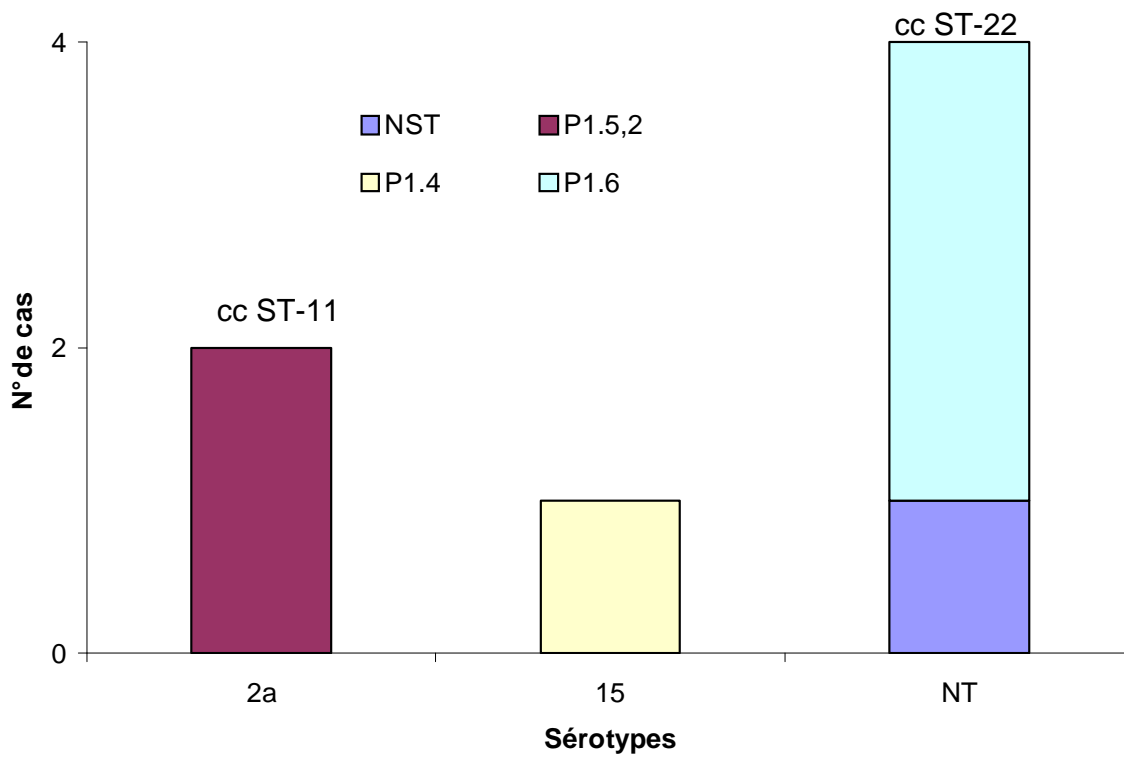
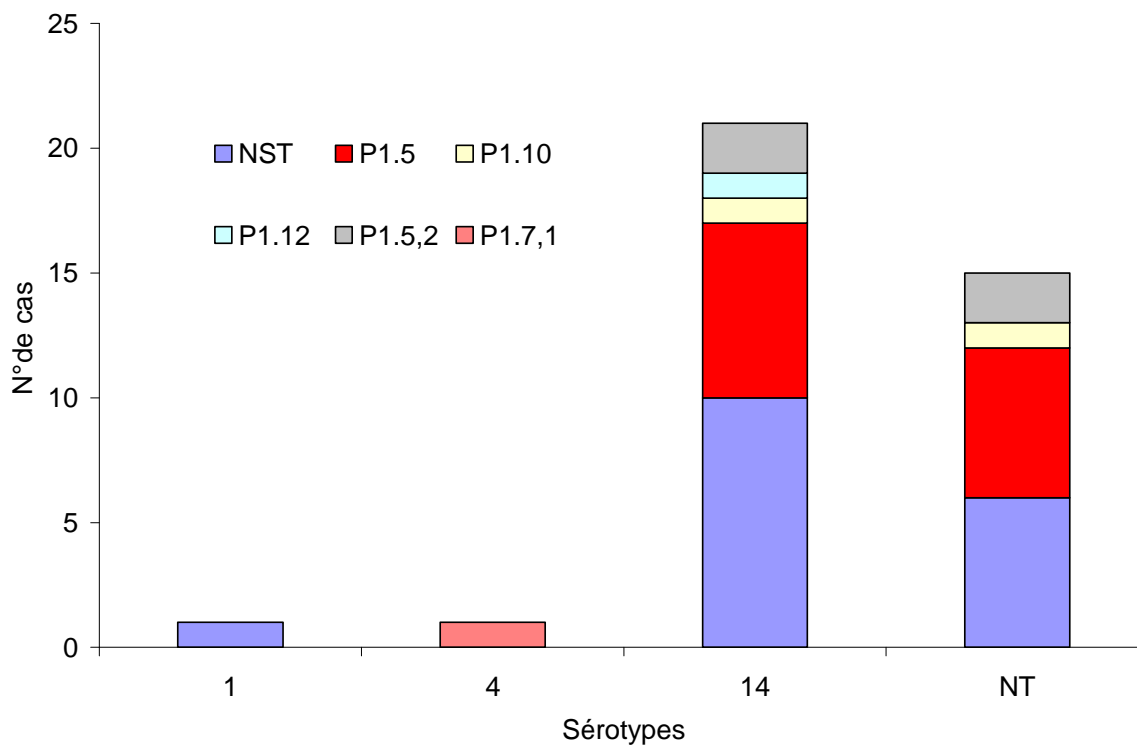


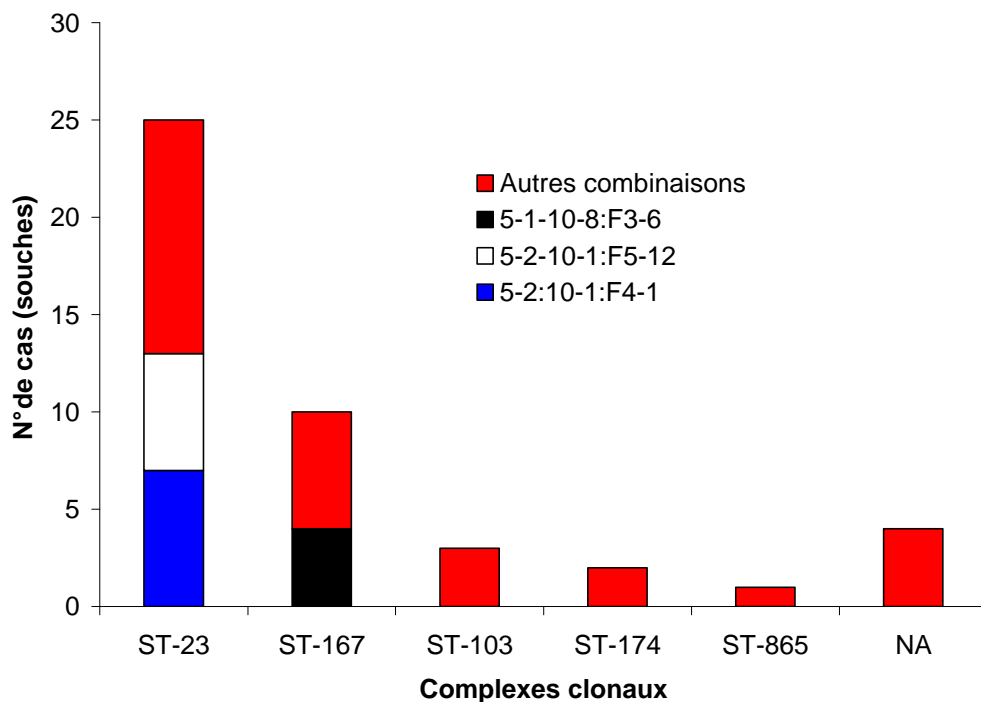
Figure 7 : Evolution des phénotypes les plus fréquents des souches invasives du sérotype C



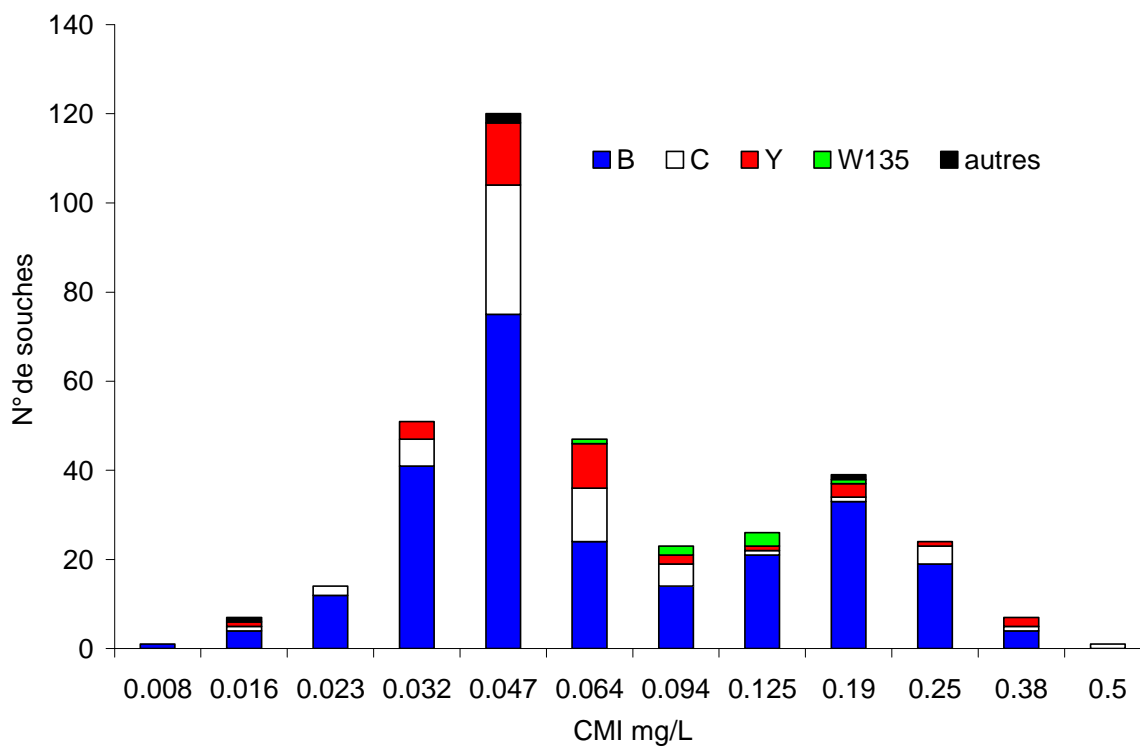
**Figure 8** : Phénotypes des souches invasives du sérotype W135 en 2011



**Figure 9** : Phénotypes des souches invasives du sérotype Y en 2011

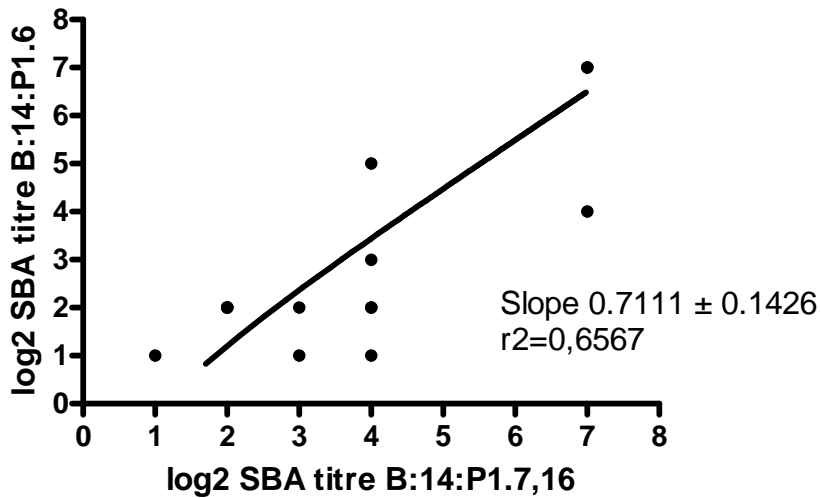
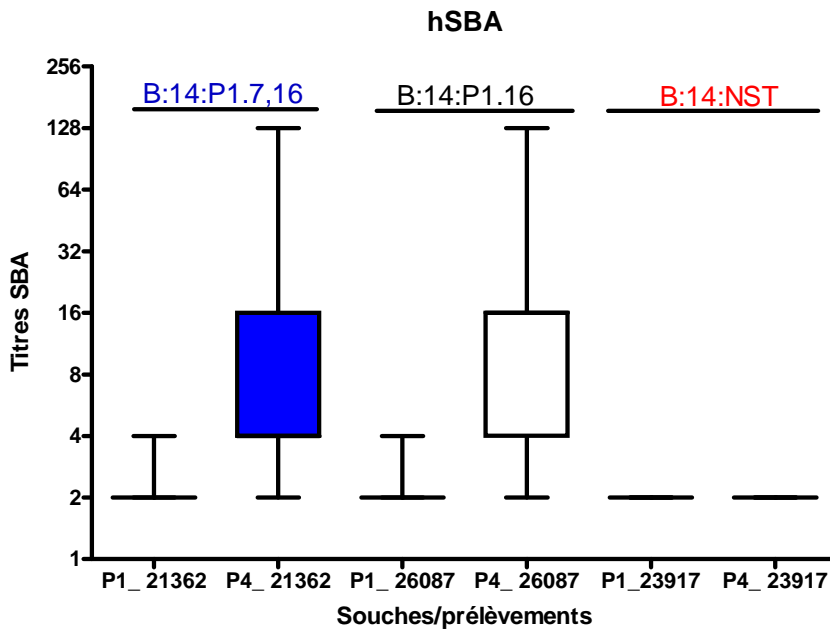


**Figure 10** Complexe clonaux, caractéristiques microbiologiques 2010-2011 (CNR)  
Combinaison des marqueurs VR1 :VR2 :FetA parmi les différents complexes clonaux détectés



**Figure 11** : Distribution des CMI de la pénicilline G parmi les souches invasives de *N. meningitidis* en 2011.





**Figure 12 :** Immunogénicité du MenBvac® contre la souche B :14 :P1.16 du département du Nord. A : Représentation des titres hSBA, la source de complément est le sérum humain. (Médian, percentiles 25% -75% et étendue). B : Corrélation des titres SBA des 15 sérums testés contre les souches B :14 :P1.7,16 et B :14 :P.16 (sérums après la troisième dose).