



CNR des Méningocoques

CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES MENINGOCOQUES RAPPORT D'ACTIVITE 2013

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

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

Responsable Scientifique : Muhamed-Kheir TAHA
Courriel 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
Tel : 01 44 38 95 90

Responsable Administratif : Christophe MAURIET, Directeur Général Adjoint
Administration
christophe.mauriet@pasteur.fr
Tel 01 45 68 80 10

Plan

RESUME ANALYTIQUE	3
INTRODUCTION	4
1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....	5
2. ACTIVITES D'EXPERTISE.....	5
2.1. ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES AU COURS DE L'ANNEE 2013.....	5
2.1.1. <i>Techniques développées ou en développement.....</i>	5
2.1.1.1. le MATS (Meningococcal Antigen Typing System).....	5
2.1.1.2. Séquençage du gène codant pour le <i>factor H binding protein fHbp</i>	6
2.1.1.3. Le séquençage complet du génome de <i>N. meningitidis</i> (Whole genome sequencing, WGS).....	6
2.1.2. <i>Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et troussees.....</i>	6
2.2. ACTIVITES D'EXPERTISE DE L'ANNEE 2013.....	7
2.2.1. <i>Les procédures appliquées au CNRM.....</i>	8
3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....	10
3.1. SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS	10
3.2. CARACTERISTIQUES DES CAS D'IIM	11
3.3. CARACTERISTIQUES DES CAS D'IIM DE GROUPE B (IIMB)	12
3.4. CARACTERISTIQUES DES CAS D'IIM GROUPE C (IIMC).....	12
3.5. CARACTERISTIQUES DES CAS D'IIM GROUPE W (IIMW)	13
3.6. CARACTERISTIQUES DES CAS D'IIM GROUPE Y (IIMY)	13
3.7. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DU MENINGOCOQUE AUX ANTI-INFECTIONNELS : SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES	14
3.8. PARTICIPATION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE	16
3.9. ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE.....	17
3.9.1. <i>Evaluation de la réponse immunitaire contre la souche de N. meningitidis B:14 :P1.7,16 chez les sujets amenés à être vaccinés par MenBVac (cohorte de Neufchâtel-en-Bray).....</i>	17
4. ALERTE	19
5. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	20
6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR.....	22
6.1. DEVELOPPEMENT DES TESTS RAPIDES POUR LA DETECTION (TDR) DE <i>N. MENINGITIDIS</i>	22
6.2. LE DEVELOPPEMENT ET L'UTILISATION DU MATS POUR LA PREDICTION DE LA COUVERTURE VACCINALE PAR LE BEXSERO®	23
6.3. LES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS REALISEES EN 2013 EN LIEN AVEC LES ACTIVITES DU CNR.....	24
7. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2014-2015.....	26
7.1. DETECTION DE LA LIPOCALINE 2 DANS LE LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN COMME MARQUEUR DE MENINGITE BACTERIENNE AIGUE	26
7.2. DEVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE SEROLOGIQUE AFIN D'AIDER SECONDAIREMENT A LA DECISION VACCINALE FACE A DES SITUATIONS DE GRAPPES DE CAS, D'HYPERENDEMIC, OU D'EPIDEMIE A MENINGOCOQUE B	27
FIGURES.....	29
ANNEXE 1 : MISSIONS & ORGANISATION DU CNR.....	38
ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR	44

Résumé analytique

L'incidence des infections invasives à méningocoques (IIM) en France est depuis 10 ans entre 0,90 et 1,60 cas pour 100 000, avec un taux de mortalité entre 8-10%. Les *Neisseria meningitidis* de sérogroupes B et C sont responsables d'environ 90% des cas. Certaines souches (hyper-invasives) peuvent être responsables d'infections invasives à méningocoque et peuvent être à l'origine de cas groupés et/ou de poussées épidémiques. Cela souligne l'importance de la caractérisation des souches du méningocoque. Les axes majeurs de la mission du Centre National de Référence des Méningocoques (CNRM) impliquent une expertise microbiologique, la contribution à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire, les alertes et les expertises auprès des autorités de santé.

En 2013, le CNRM a validé une nouvelle méthode de diagnostic des IIM par PCR en temps réel qui remplacera la PCR « en point final » développée et utilisée par le CNR depuis plus de 10 ans.

Le CNR a également contribué à la détection et à la caractérisation des cas groupés dans la communauté des hommes ayant eu des relations sexuelles avec d'autres hommes (HSH). Lors de ces analyses, le CNR a pu utiliser le séquençage du génome entier comme outil de typage en temps réel ce qui a permis de montrer l'émergence d'un nouveau groupe de souches du méningocoque C responsable de ces cas groupés dans le monde. Une recommandation de vaccination au-delà de l'âge de 24 ans pour cette communauté a été formulée par le Haut Conseil de Santé Publique (HCSP). Un fait marquant en 2013 a été la poursuite de l'augmentation de l'incidence des IIMC, en particulier chez les sujets adultes.

Le CNR a également utilisé une nouvelle méthode d'analyse des niveaux d'expression des antigènes vaccinaux (MATS) pour évaluer la couverture des souches du méningocoque B par le nouveau vaccin recombinant contre le méningocoque B (Bexsero®). Cette étude a permis de prédire que le taux de couverture est d'environ 80%. Elle a contribué aux travaux du comité technique de vaccination pour l'Avis du Haut Conseil de la Santé Publique concernant la vaccination par le Bexsero®.

Le CNRM a piloté une étude européenne pour déterminer les valeurs critiques pour tester la susceptibilité du méningocoque à la ciprofloxacine. Cette étude rentre dans le cadre du rôle du CNRM en Europe pour la standardisation et l'harmonisation de l'antibiogramme du méningocoque.

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).

Introduction

Le méningocoque, *Neisseria meningitidis*, est une espèce bactérienne étroitement adaptée à l'homme, qui en est le seul réservoir connu et le seul hôte sensible. Elle se présente le plus souvent comme une espèce bactérienne commensale du rhino-oropharynx (portage asymptomatique chez 10% de la population générale). 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 de tomber. La taille de 10 microns de ces gouttelettes permet une rétention au niveau du rhinopharynx (porte d'entrée du méningocoque). L'acquisition d'un méningocoque 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. D'autres formes cliniques plus rares sont connues et doivent être recherchées, telles que des arthrites et des péricardites, des endophtalmies ou des pneumonies invasives, confirmées par la découverte d'une bactériémie. Le traitement antibiotique adéquat est efficace lors de la phase précoce de dissémination des bactéries. Une IIM est confirmée biologiquement (par culture et/ou par PCR) par la présence de méningocoques dans des prélèvements qui doivent corroborer les critères de définition des cas d'IIM (isolement ou détection du méningocoque à partir d'un site normalement stérile).

La détermination du sérotype d'un méningocoque isolé chez un patient atteint d'IIM est le complément indispensable de l'identification pour pouvoir instaurer la prophylaxie vaccinale des sujets contacts. Le sérotypage est effectué par agglutination des corps bactériens avec des immun-sérums spécifiques qui sont les anticorps anti-capsulaires des méningocoques. Le Centre national de référence des méningocoques (CNRM) a mis au point une technique de diagnostic *direct sur produit pathologique* permettant d'établir l'étiologie lorsque la culture a échoué. Cette technique est utilisable par tout laboratoire disposant des compétences et installations pour le diagnostic par PCR. Cette technique permet de détecter la présence de l'ADN du méningocoque et de déterminer les groupes les plus fréquents dans les IIM (A, B, C, Y, W et X). *La PCR ne remplace pas la mise en culture qui est indispensable à l'antibiogramme.* Toute souche ou tout matériel positif pour le méningocoque (échantillon clinique ou extrait d'ADN) doit être envoyé dans les meilleurs délais au CNRM pour typage complet. 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. Missions et organisation du CNR

Les missions et l'organisation du CNR sont mentionnées dans [l'Annexe 1](#) du rapport. Cependant, en 2013 des changements ont eu lieu pour le personnel du CNRM dont l'état actuel est montré dans le tableau 1

2. Activités d'expertise

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. Ces techniques sont mentionnées dans [l'Annexe 2](#).

2.1. Évolutions des techniques au cours de l'année 2013

2.1.1. Techniques développées ou en développement

2.1.1.1. le MATS (Meningococcal Antigen Typing System)

Après la phase de validation en 2012 de la technique de typage des antigènes vaccinaux (MATS Meningococcal Antigen Typing System), cette technique est maintenant utilisable en routine au laboratoire. La première phase a permis d'évaluer la couverture globale des souches du méningocoque B en France par le Bexsero®. Cela a contribué aux travaux du CTV pour l'avis du HCSP concernant ce nouveau vaccin recombinant (AMM 2013). Cette technique mesure la quantité relative de chacun des composants du vaccin dans les souches du méningocoque. Le niveau d'expression pour les trois antigènes du vaccin (fHbp, NHBA et NadA) est défini comme un ratio (*Relative Potency RP*) par rapport au niveau d'expression d'une souche référence pour chacun des antigènes. La couverture d'une souche par le vaccin 4CMenB (Bexsero®) est prédite sur la base de dépassement du seuil requis d'expression (*PBT positive bactericidal threshold*) par au moins un des trois antigènes du vaccin (fHbp, NHBP et NadA) ou la détection du sous-type P1.4 (pour PorA dans le composant OMV du Bexsero®). L'étude d'une collection des souches (n=200) isolées en France entre Juillet 2007 et Juin 2008 a permis de prédire le taux de couverture en France : 85% (avec IC95% 69–93). Ce taux n'est significativement pas différent de celui observé pour l'ensemble des souches des quatre autres pays européens (Allemagne, Angleterre, Pays de Galle et Italie). Cette technique est maintenant opérationnelle pour accompagner la mise en œuvre de l'avis du HCSP du 25 Octobre 2013. Il s'agit d'explorer les grappes de cas définies par la survenue d'au moins 2 cas d'IIM B dans une même collectivité ou un même groupe social survenus

dans un délai \leq à 4 semaines ou de situations épidémiques afin de définir si les cas sont rattachables à des souches identiques couvertes par le vaccin Bexsero®.

Dans certains cas, le MATS peut aider les travaux d'un groupe multidisciplinaire d'experts au niveau national et/ou régional quant à la pertinence et aux modalités éventuelles d'une action locale de vaccination par le vaccin Bexsero®. (C'est notamment les situations de survenue d'au moins 2 cas d'IIM B dans une même collectivité ou un même groupe social survenus dans un délai $>$ à 4 semaines et \leq 3 mois ou situations d'hyperendémie).

2.1.1.2. Séquençage du gène codant pour le *factor H binding protein fHbp*

La mise au point de l'utilisation de ce marqueur a été réalisée en 2012. Après cette phase et en 2013, ce séquençage est désormais utilisé en routine au CNRM. Il s'agit d'une approche rapide de typage de *fHbp* qui consiste en une seule réaction de séquence (au lieu de 6 réactions dans l'approche classique) permettant de définir rapidement le type de variant (Var 1, 2 ou 3). L'approche est mise à la disposition de la communauté scientifique pour le typage de méningocoque et accessible via le site web d'Oxford du typage par MLST (<http://pubmlst.org/neisseria/>). Son utilisation, en plus d'autres marqueurs, a permis d'identifier très rapidement pendant l'été 2013 l'émergence d'un nouveau clone au sein du complexe clonal ST-11 lors des cas groupés dans la communauté des HSH.

2.1.1.3. Le séquençage complet du génome de *N. meningitidis* (Whole genome sequencing, WGS)

L'évolution technique des méthodes de séquençage d'ADN et, en particulier, les méthodes de séquençage à haut débit (aussi appelées **NGS** pour *next-generation sequencing*) sont maintenant accessibles. Le développement des outils informatiques d'analyse ont rendu utilisable le WGS comme outil pour le génotypage des souches en temps réel, et donc pour l'analyse épidémiologique des cas groupés. Ainsi, le CNRM a pu utiliser cette nouvelle approche (NGS par la méthode Illumina) lors des cas groupés dans la communauté des HSH.

La comparaison de ces séquences des souches isolées en France et celles isolées en Allemagne et en Angleterre a permis de confirmer l'émergence d'un nouveau clone au sein du complexe clonal ST-11. L'analyse avec des souches du méningocoque C (complexe clonal ST-11) isolées de cas d'urétrites en France et en Allemagne a permis d'étayer l'hypothèse du CNRM sur l'introduction de ces souches dans la communauté des HSH par voie sexuelle et ensuite l'émergence des cas d'IIMC au sein de cette communauté.

2.1.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

En 2013 et en réponse à la recommandation du comité des CNR, le CNRM a évalué en 2013 un premier Kit de diagnostique des IIM par PCR en temps réel. Cette validation a été réalisée

en utilisant la méthode du CNR en référence. Le CNRM a testé 93 échantillons par les deux approches avec les résultats suivants (Tableau 2)

Tableau 2. Résultats de la validation de la PCR en temps réel

	PCR-	PCR+
PCR Temps réel -	51 a	7 b
PCR Temps réel +	0 c	35 d

Sensibilité (Se) = $d / (b+d) = 35 / (7+35) = 0.83$

Spécificité (Sp) = $a / (a+c) = 51 / (51+0) = 1$

Valeur prédictive positive (VPP) = $d / (c+d) = 35 / (0+35) = 1$

Valeur prédictive négative (VPN) = $a / (a+b) = 51 / (51+7) = 0,88$

Une bonne corrélation a été observée sur la base du coefficient Kappa qui était de 0,77. Ce kit peut maintenant être utilisé par les centres hospitaliers pour réaliser le diagnostic des IIM par PCR.

2.2. Activités d'expertise de l'année 2013

En 2013, le CNRM a reçu 540 souches bactériennes (invasives et non invasives) pour identification et typage. Parmi ces souches, l'identification « *Neisseria meningitidis* » a été confirmée pour 483 souches (481 en 2012) dont 417 souches invasives.

Toutes les souches sont également sérogroupées et testées par antibiogramme (Etest) pour la pénicilline G, l'amoxicilline, le cefotaxime, la ciprofloxacine et la rifampicine.

Tableau 3 : Souches bactériennes reçues au CNRM

Espèce/genre	2012	2013
<i>Neisseria meningitidis</i>	481	483
Autres <i>Neisseria</i> /Moraxella	8	9
Absence de <i>Neisseria</i> ou contamination	31	48

L'évolution de la distribution des sérogroupes de souches invasives en 2013 est montrée dans la **Figure 1**. Le CNR réalise en urgence (2h) une détermination du groupe par une approche moléculaire pour les souches qui ne sont pas sérogroupées ou lorsqu'un problème est signalé par le laboratoire correspondant.

Le CNR a également reçu 418 échantillons primaires pour des cas de suspicion d'IIM. Ces échantillons ont été testés par PCR pour la détection de l'ADN de *N. meningitidis* et génogroupage.

Le nombre de prélèvements reçus au CNR reste stable ainsi que la proportion des prélèvements positifs pour *N. meningitidis* (environs 45% sur les 5 dernières années) (Tableau 4).

Tableau 4. Infections invasives à méningocoques identifiées par PCR (NG= non génogroupable)

Année	N° négatifs	Génogroupe						Total	n° positifs	% des positifs
		négatif	A	B	C	W	Y			
2006	211	0	59	18	2	1	13	304	93	31%
2007	278	1	114	41	0	4	12	450	172	38%
2008	217	0	100	27	3	3	10	360	143	40%
2009	235	0	127	29	3	2	8	404	169	42%
2010	229	0	165	18	3	5	4	424	195	46%
2011	245	0	165	23	8	8	4	454	209	46%
2012	248	0	151	23	27	7	3	459	211	46%
2013	231	0	114	46	21	3	3	418	187	45%

Les proportions des génogroupes pour le cas diagnostiqué par PCR sont montrées dans la **Figure 2**.

Le pourcentage des biopsies cutanées était de 5% en 2013. Le pourcentage de PCR positives dans les biopsies cutanées était significativement plus élevé que l'ensemble des prélèvements. En effet, 100% des 22 biopsies testées étaient positives pour le méningocoque par PCR contre 45% pour l'ensemble des prélèvements. En 2012, 80% des biopsies cutanées étaient positives par PCR. Cela souligne l'intérêt de pratiquer une biopsie sur les lésions cutanées pour le diagnostic des IIM. Ces meilleures performances sont en partie liées à la meilleure communication instaurée avec nos correspondants hospitaliers pour les conditions de prélèvement et d'envoi. Le CNRM continue également à encourager et accompagner ses correspondants pour implanter la technique de détection par PCR dans les centres hospitaliers.

2.2.1. Les procédures appliquées au CNRM

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 chimioprophylaxie. 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 sérotype 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 et nous avons ajouté le séquençage du gène *fHbp*.

La caractérisation moléculaire de la résistance aux antibiotiques est réalisée par le séquençage des gènes *penA* et *rpoB* et *gyrA*. Les données de cette étude seront accessibles via le site (<http://pubmlst.org/neisseria/>).

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 sérotype (ce document est téléchargeable à partir du site internet (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 sérotype et la sensibilité aux antibiotiques d'intérêt thérapeutique et prophylactique sont communiquées extemporanément au correspondant par téléphone, télécopie ou par courriel.

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 les communications.
- le 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 CNRM n'assume aucune responsabilité quant à l'utilisation du matériel biologique par le partenaire.

3. Activités de surveillance

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

Le CNRM 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. L'ensemble des souches et prélèvements primaires correspondent à 483 cas d'IIM dont 359 cas confirmés par culture (74%), 114 (24%) par PCR et 10 par culture et PCR (2%) (**Figure 3**). Les souches et prélèvements reçus au CNRM représentent plus de 90% des cas notifiés en France. C'est le département 59 (Nord) qui arrive en tête pour le nombre de souches/prélèvements invasifs (n=34) (**Figure 4**).

3.2. Caractéristiques des cas d'IIM

La distribution en groupe était : groupe B (n=282 ; 58%), groupe C ((n=121 ; 25%), groupe Y (n=49, 10%), groupe W (n=24, 5%) et les autres groupes et non groupables (n=7, 1%). (**Figure 4**). Comme en 2012, le pourcentage des cas non groupables continue à être faible (de l'ordre de 1%).

Le ratio homme/femme était de 1. La distribution en fonction de l'âge est montrée en **Figure 5 A et B**). La proportion du groupe B est prédominante dans toutes les classes d'âge sauf chez les 25 ans et plus. La proportion groupe C représente globalement 24 % des cas mais varie en fonction de l'âge : elle est de 16% chez les 1-5 ans contre respectivement 30% et 27% chez les 16-24 ans et chez les plus de 25 ans respectivement (**Figure 6**). Le nombre de cas d'IIMY est à nouveau en hausse en 2013 après une stagnation en 2012, et cela essentiellement chez les adultes de 25 ans et plus. La proportion d'IIMY était significativement plus élevée chez les 60 ans et plus, atteignant 30%.

Le génotypage par MLST a été réalisé chez l'ensemble de 483 cas pour définir les complexes clonaux. Ces données sont obtenues pour 433 cas (90% de l'ensemble des cas reçus au CNRM). Ce pourcentage était plus important pour les cas confirmés par culture (361 cas de 369 ; 98%) que les cas confirmés seulement par PCR (le génotypage MLST disponible pour 72 cas des 114 cas confirmés seulement par PCR ; 63%).

La distribution en complexes clonaux (cc) est présentée dans les **Figures 7 et 8**.

Les cc les plus fréquents étaient, comme pour les années précédentes et par ordre de fréquence décroissante : cc11 (27%), cc41/44 (18%), cc32 (15%) et cc269 (8%). Ces pourcentages étaient en 2012 : cc11 (19%), cc41/44 (17%), cc32 (16%) et cc269 (11%). L'augmentation du cc11 reflète l'augmentation des cas d'IIMC car la grande majorité des cas d'IIMC sont dus à des souches du cc11. En 2013, ce sont les cas dus aux souches du cc11 (groupe C) et cc23 (groupe Y) qui sont en augmentation.

3.3. Caractéristiques des cas d'IIM de groupe B (IIMB)

Ces cas (souches et prélèvements) représentaient 58% de l'ensemble des cas d'IIM (195 cas par culture, 79 cas par PCR et 8 cas par culture et PCR) en 2013 (67% en 2012). Comme le montre la **Figure 9**, les souches de séro-groupe B se répartissent selon des sérotypes (immuno-spécificité de la porine PorB). Quatre sérotypes (4, 1, 14 et 15, par ordre décroissant) regroupent 71% des souches qui sont les sérotypes. Cependant, 27% 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). Les séro-sous-types (immuno-spécificité de la porine PorA) sont très divers, 20 combinaisons séro-sous-types ont été détectées. Cependant, 28% des souches invasives (21% en 2012) ne sont pas séro-sous-typables (NST : absence d'expression de PorA ou nouvel antigène non reconnu par les anticorps monoclonaux de référence). Plus de 50 combinaisons sérotype :séro-sous-type sont observées parmi les souches invasives du séro-groupe B (**Figure 9**). Ces combinaisons sont encore plus nombreuses quand les souches sont classées en fonction du séquençage de *porA* pour déterminer les régions variables VR1 et VR2. La combinaison la plus fréquente est NT:NST (13%) contre 10% en 2012. L'ensemble de ces résultats montre la grande diversité des souches du méningocoque B.

Les souches B :14 :P1.7,16 représentaient (5,4% ; n=11), valeur en diminution par rapport à 2012 (7,7% ; n=19). En 2013, 2 de ces souches ont été isolées en Seine Maritime (contre 5 en 2012). Les autres souches ont été isolées dans la Somme et les Pyrénées Atlantiques.

Les complexes clonaux cc41/44, cc32 et cc269 sont les plus fréquents (61% des cas comme en 2012 mais avec une distribution différente). Le cc269 était en baisse en 2013 en comparaison à 2012 (Fig. 7). Cette diminution reflétait en particulier la baisse des souches B, PorA VR1 = 19-1, PorA VR2 = 15-11 ; cc ST- 269 en Alsace.

Trois cas d'IIMB du complexe clonal ST-11 ont été détectés en 2013 (quatre cas en 2012). La surveillance de ces souches est importante car elle peut indiquer une commutation (Switch) de la capsule de C vers B.

3.4. Caractéristiques des cas d'IIM groupe C (IIMC)

Le pourcentage des cas dus aux sérogroupes C (culture +PCR) est de 24% en 2013 (17% en 2012). Cette augmentation importante d'IIMC est due à l'augmentation des cas chez les adolescents et adultes (**Figure 6**). Les souches/prélèvements du groupe C sont un peu moins hétérogènes que les souches/prélèvements du groupe B et 93,1% (83,8% en 2012) de ces cas sont dus à des souches qui appartiennent au complexe clonal ST-11 (**Figure 10** et **Figure 8B**). Plusieurs sérotypes sont observés parmi les souches cultivées, mais le sérotype 2a représente à lui seul 80% des souches de séro-groupe C en 2013 (55,9% en 2012, 50% en 2011 et 49% pour la

période 2006-2010). Cette augmentation est due à l'augmentation des souches C :2a :P1.5/cc11, VR1=5-1, VR2=10-8, F3-6) et C :2a :P1.5,2/cc11 VR1=5, VR2=2, F3-3) (**Figure 11**). Ce sont les marqueurs additionnels que le CNRM a utilisés tels que FetA et fHbp et la séquence complet du génome qui ont permis de détecter l'émergence des phénomènes anormaux (exemple les cas d'IIMC dans la communauté des HSH).

L'analyse phénotypique des souches cultivées a montré que les souches des phénotypes C :2a :P1.5,2 et C :2a :P1.5 sont responsables de l'augmentation du nombre de cas d'IIMC (**Figure 11**). Les souches des phénotypes C:2a :P1.7,1 ou C:NT :P1.7,1 (en augmentation jusqu'à 2010) étaient rares en 2013. Ces variations au sein des souches du complexe clonal ST-11 reflètent la capacité de ce complexe hyperinvasif à persister grâce à l'expansion de nouveaux variants au niveau des antigènes majeurs comme PorA, PorB ou le fHbp comme le suggèrent les travaux publiés par le CNRM (*Hong, E., Giorgini, D., Deghmane, A.E. & Taha, M.K. Functional impacts of the diversity of the meningococcal factor H binding protein. Vaccine 31, 183– 189 (2012).*

3.5. Caractéristiques des cas d'IIM groupe W (IIMW)

Après une réémergence en 2012 des souches du séro groupe W/cc11, le nombre de ces cas confirmés par culture et/ou par PCR s'est stabilisé en 2013 ; (n=25, 5,2% contre n=21 5,7% en 2012). En effet les souches W:2a:P1.5,2/cc11 représentaient 47% des cas d'IIMW en 2013 (**Figure 12**). Il faut donc maintenir la surveillance de ce séro groupe pour détecter toute nouvelle réémergence locale ou par importation. En effet, les souches du séro groupe W semblent en augmentation depuis 2010 dans certains pays de l'Afrique subsaharienne.

3.6. Caractéristiques des cas d'IIM groupe Y (IIMY)

L'augmentation des cas d'IIMY a repris en 2013 après une stagnation en 2012. En 2013, les IIMY représentaient 10% des cas d'IIM confirmés par culture et/ou PCR et reçus au CNRM. Depuis 2010, les IIMY augmentent dans plusieurs pays en Europe dont la France. Mais comme en 2012, ces souches restent hétérogènes phénotypiquement et génotypiquement (**Figure 13** et **Figure 14**). Les combinaisons phénotypiques les plus fréquentes étaient Y :14 :NST (27%) et Y:NT :P1.5 (23%) (**Figure 13**).

Les souches/prélèvements du groupe Y appartiennent à 5 complexes clonaux (89%) et 11% n'appartiennent pas à des complexes clonaux définis. Le complexe clonal ST-23 reste majoritaire et représentait 60% (32,1% en 2012) (**Figure 14**). L'augmentation des souches du méningocoque Y est aux dépens des souches du complexe clonal ST-23.

Les deux combinaisons génotypiques cc23:VR1=5-2:VR2=10-1:F4-1 et cc23:VR1=5-2 :VR2=10-1:F5-12 reste les plus représentées, comme en 2011, parmi les souches du cc23.

Les souches du séro groupe 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 séro groupe 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.

La baisse de l'âge médian des cas qui a été observée entre 2009 et 2011 en comparaison avec les années 2006 à 2008 et s'est inversée à partir de 2012 avec une augmentation de l'âge médian (57,6 en 2012 et 61,1 en 2013 ; Tableau 5). Il est intéressant de noter que l'âge médian en 2012 des cas dus aux souches Y du cc23 était de 23,25 ans contre 80,92 pour les autres cc d'IIMY et respectivement 25,6 contre 77,5 en 2013 (p=0,0196).

Tableau 5 Distribution des souches invasives Y en fonction de l'âge

Année	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Nombre de souches	19	17	25	30	19	25	38	28	47
Age minimum	1,4	4,4	0,3	0,0	0,3	0,7	0,3	0,8	0,1
Age médian	76,1	80,1	74,8	43,6	34,1	20,8	21	57,6	61,1
Age maximum	97,0	94,3	102,4	87,8	95,5	95,4	89,6	94,9	93,92
Moyenne d'âge	59,7	60,1	58,4	43,7	44,2	31,6	34,7	56,8	52,3

3.7. Surveillance de la résistance du méningocoque aux anti-infectieux : 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), sont systématiquement déterminés (tableau 6). Toutes les souches sont systématiquement éprouvées par E-test contre les antibiotiques d'intérêt thérapeutique (bêta-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 réalisées (*penA*, *rpoB* et *gyrA*)

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 de 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 24% des souches. Ce pourcentage était de 21% en 2012. La proportion des souches de *N. meningitidis* de sensibilité diminuée à la pénicilline G était plus élevée avant 2006 (environ 32%). La baisse constatée depuis 2006 est liée à la diminution des souches du séro groupe C du complexe clonal ST-8 (absentes en 2011) mais également au coût biologique chez le méningocoque de la diminution de la sensibilité à la pénicilline. Aucune souche de *N. meningitidis* β -lactamase (céfinaïase)- 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 15** pour l'année 2013. L'étendue des valeurs des CMI est 0,016-0,75 mg/L. De plus, les valeurs de CMI₅₀ et CMI₉₀ pour l'ensemble des souches étaient de 0,064 et 0,190 respectivement en 2013 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^e génération (céfotaxime et ceftriaxone) soient le 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), au chloramphénicol à la rifampicine et au ciprofloxacine.

Tableau 7. Profils d'antibio-sensibilité des souches d'infections invasives étudiées en 2013.

Antibiotique	Catégorie*	B	C	Y	W	autres	Total
PénicillineG**	S	140	86	42	7	3	278
	I	63	14	6	6	2	91
	R	0	0	0	0	0	0
% des souches penI		31%	14%	12,5%	46,1%	40%	24%
Céfotaxime	S	203	100	48	13	5	369
	I	0	0	0	0	0	0
Rifampicine	R	0	0	0	0	0	0
	S	203	100	48	13	5	369
Ciprofloxacine	R	0	3	0	0	0	0
	S	203	100	48	13	5	369
Chloramphénicol	R	0	0	0	1	0	0
	S	203	100	48	13	5	369
	I	0	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0	0

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

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

3.8. Participation aux réseaux de surveillance

Les infections invasives à méningocoque (IIM) sont des maladies à Déclaration Obligatoire (DO) avec un potentiel d'expansion épidémique. La surveillance des IIM repose sur la déclaration obligatoire (DO) aux Agences Régionales de la Santé (ARS). Les DO sont regroupés et analysés par l'Institut de Veille Sanitaire et la caractérisation des cas confirmés biologiquement par culture et/ou par PCR au CNRM. Les mesures de prophylaxie pour les contacts proches sont organisées par les ARS.

Pour la surveillance nationale, nous intervenons en tant que partenaires microbiologistes de l'InVS, avec qui les interactions sont constantes, lorsque nous sommes signalés par celui-ci des cas groupés, géographiquement et temporellement, repérés grâce aux déclarations obligatoires. 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 (les CIRE et ARS), nous procédons alors à un suivi extrêmement serré du clone incriminé. En dehors des situations d'alertes (où le génotypage est fait en urgence, voir Annexe 2), le CNRM envoie mensuellement et

en routine (M+1) le typage complet des souches : phénotypage (séro groupe, sérotype, sous-type et antibiogramme) et génotypage (complexe clonal, régions variables de PorA VR1 et VR2 ainsi que le marqueur FetA). D'autres marqueurs sont également proposés en fonction des cas explorés.

Sur le plan international, notre laboratoire est également un centre Collaborateur OMS pour le méningocoque (ccOMS) depuis Novembre 2011. Le CNRM est membre du groupe européen EMGM. Les données sur les méningococcies survenant en France sont régulièrement confrontées aux données européennes (EMGM) et le ECDC, Nord américaines (CDC) et africaines. Sur le plan européen, cette comparaison est réalisée via la base des données EMERT (European Meningococcal Epidemiology in Real Time de l'EMGM). De plus, les données microbiologiques du CNRM font parties des données communiquées par l'InVS au ECDC, via le système TESSY.

En 2013, le CNRM a distribué 43 souches (environ 10% des souches reçues dans le cadre de la construction d'une collection européenne représentative des souches du méningocoque actuellement en circulation. Ces souches ont été envoyées au centre collaborateur OMS à Oslo dans le cadre d'un réseau soutenu par l'ECDC. En effet, le CNRM est membre du groupe IBDlabNet qui interagit avec l'ECDC pour la surveillance des infections bactériennes invasives en Europe.

Le CNRM collabore également avec l'observatoire des méningites chez l'enfant et l'observatoire des méningites chez l'adulte.

3.9. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

3.9.1. Evaluation de la réponse immunitaire contre la souche de *N. meningitidis* B:14 :P1.7,16 chez les sujets amenés à être vaccinés par MenBvac (cohorte de Neufchâtel-en-Bray)

Une vaccination par MenBvac a été appliquée depuis 2006 en Seine-Maritime, puis dans la Somme, en réponse à une situation d'hyperendémie d'IIMB par dissémination de la souche B:14:P1.7,16/ST32. Plusieurs études d'immunogénicité à Dieppe dans un premier temps (Cohorte de Dieppe), puis à Neufchâtel (Cohorte de Neufchâtel-en-Bray) ont été réalisées et le schéma vaccinal (2+1) a été modifié suite à la première étude.

Le Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) a recommandé dans son avis du 9 septembre 2011 la réalisation d'une 4^{ème} dose de MenBvac chez les sujets antérieurement vaccinés par un schéma à 3 doses. Il a également prôné la poursuite de l'étude d'immunogénicité menée chez des enfants de 1 à 5 ans de la zone de Neufchâtel-en Bray, afin de connaître la persistance à plus long terme des anticorps contre la souche B:14P1.7,16. Une étude a été donc conçue dont l'objectif est de mesurer le pourcentage d'enfants présentant un titre hSBA ≥ 4 :

- avant l'administration de la 4^{ème} dose,
- six semaines après l'administration de la 4^{ème} dose,

- un an après l'administration de la 4^{ème} dose.

Cette étude est financée par la D.G.S. (Direction Générale de la Santé), Ministère des Affaires Sociales et de la Santé et réalisée par le CHU de Rouen et le Centre National de Référence des méningocoques de l'Institut Pasteur.

Les enfants de la cohorte de Neufchâtel ont eu au total huit prélèvements (P1 à P8):

- P1 : avant toute vaccination, (avril 2009, n=213) soit T0
- P2 : Six semaines après la 2^{ème} dose (juillet 2009, n=172) soit M3
- P3 : Avant le premier rappel (décembre 2009, n=159) soit M7,5
- P4 : Six semaines après le 1^{er} rappel (janvier 2010, n=126) soit M9
- P5 : Un an après le 1^{er} rappel (novembre 2010, n=126) soit M19,5
- P6 : Avant le 2^{ème} rappel (avril 2012, n=117) soit M36,5
- P7 : Six semaines après le 2^{ème} rappel (mai 2012, n=99) soit M38
- P8 : Un an après le 2^{ème} rappel (avril 2013, n=96) soit M50

Les prélèvements correspondant à P8 sont reçus au CNR en Septembre 2013. Les analyses des titres hSBA de l'ensemble de ces prélèvements permettent d'avoir une vision complète de l'évolution des titres (**Figure 16** et Tableau 8).

Tableau 8. Données descriptives et Moyennes Géométriques (GMT) des titres SBA contre la souche B:14 :P1.7,14 (la source de complément est le sérum humain).

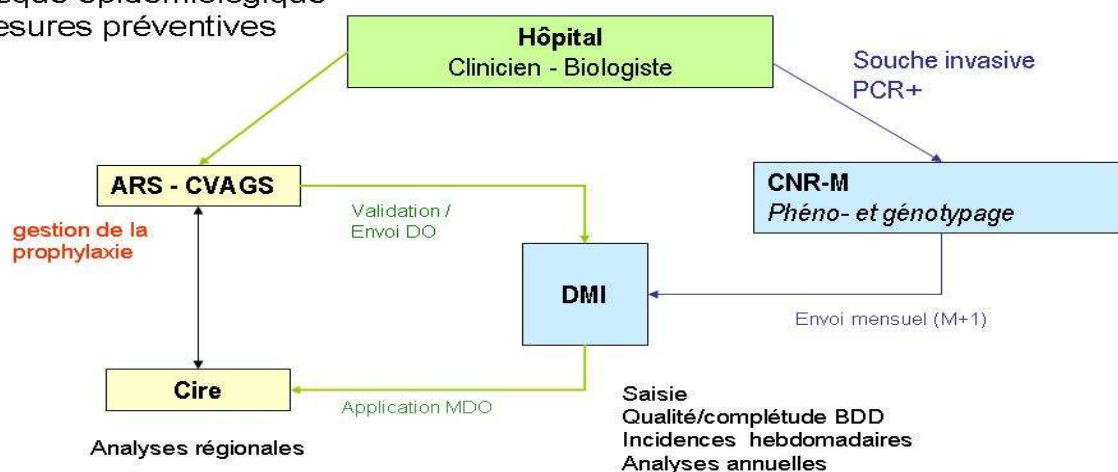
	P1-T0	P2-M3	P3-M7,5	P4-M9	P-5 M19,5	P6-M36,5	P7-M38	P8-M50
Nombre	213	172	159	126	126	117	99	96
Moyenne	3,418	5,965	4,906	27,21	10,92	4,444	41,92	12,46
Ecart-type	8,487	13,69	12,75	50,75	25,37	12,19	50,99	29,01
Médiane	2	2	2	8	2	2	16	2
Minimum	2	2	2	2	2	2	2	2
Maximum	64	128	128	256	128	128	128	128
Moyenne Géométrique	2,30	3,28	2,76	10,89	4,13	2,69	17,52	4,4
IC 95 %	2,14- 2,47	2,91- 3,70	2,47- 3,09	8,69- 13,64	3,39-5,04	2,37-3,05	13,22- 23,23	3,5-5,5

En conclusion, dans la cohorte de Neufchâtel-en-Bray, le pourcentage de sujets présentant un titre hSBA \geq 4 vis à vis du clone épidémique s'établit à 47,4 % un an après le second rappel d'un schéma à 4 doses (2+1+1). Ce taux est supérieur à l'objectif assigné de 40 %. Pour autant, ces résultats confirment le déclin rapide de la réponse bactéricide d'un vaccin OMV, donnée déjà établie dans la littérature scientifique. Ceci souligne que pour contrôler les hyperendémies/épidémies, il est crucial d'avoir rapidement une large couverture vaccinale, faute de quoi il faut ensuite multiplier les rappels. Désormais la disponibilité du vaccin recombinant 4CMenB (Bexsero®) devrait permettre l'application efficace d'une vaccination ciblée en cas d'alerte, selon les recommandations du HCSP.

4. Alerte

La surveillance des IIM en France est organisée selon le schéma suivant, qui précise le rôle de chaque partenaire ainsi que les interactions entre les différents acteurs.

- Maladie à déclaration obligatoire
- Risque épidémiologique
- Mesures préventives



Les signaux d'alerte peuvent être faits par les ARS et/ou le CNRM. La situation est alors analysée/validée pour l'émission de l'alerte par le Département des maladies infectieuses (DMI) de l'InVS et le CNRM contribue par son expertise bactériologique à cette analyse. Il existe deux étapes pour ce système d'alerte :

1. Reconnaissance du signal par la plate-forme de veille et de gestion sanitaire de l'ARS
2. Actions à mettre en place par l'ARS devant ces situations

L'investigation de l'épisode est mise en œuvre par la CVAGS, en partenariat avec la Cire, et bénéficie d'un appui du niveau national (InVS et CNRM). Il est donc crucial que les échantillons soient acheminés au CNRM le plus rapidement possible (cf. annexe 2).

- En 2013, l'analyse épidémiologique des IIM est effectuée à travers l'analyse des données de notification des cas, et la caractérisation des souches circulantes par le CNRM a permis d'alerter sur l'augmentation des infections invasives à méningocoque C en France, ceci malgré la vaccination contre le méningocoque C qui est recommandée en France depuis 2010 pour les enfants de 12-24 mois, avec un rattrapage jusqu'à 24 ans. En effet, après une diminution significative du taux de notification des IIM C entre 2002 et 2010, cette baisse ne s'est pas

poursuivie. L'incidence a augmenté de 18 % entre 2011 et 2013. L'impact de l'introduction dans le calendrier vaccinal de la vaccination avec les vaccins conjugués C en 2010 en France reste limité à ce jour et cela est dû essentiellement à l'évolution lente de la couverture vaccinale des vaccins conjugués, et en particulier chez les adolescents et les jeunes adultes.

- L'information envoyée par le CDC d'Atlanta et le typage des souches du méningocoque d'une grappe de cas d'IIMC chez les hommes qui ont des rapports sexuels avec des hommes (HSH) en région Parisienne, Juin-Juillet 2013, ont permis d'alerter sur les cas d'IIMC dans la communauté HSH.

Cinq cas d'infections invasives à méningocoque font l'objet de ce typage dont 4 cas chez des HSH et un cas chez une femme fréquentant les lieux de convivialité de la communauté gay. Quatre cas ont été confirmés par l'isolement par la culture d'une souche du méningocoque et un cas a été confirmé par la détection de l'ADN du méningocoque dans une biopsie cutanée. Les cinq cas correspondant sont dus à *N. meningitidis* groupe C.

Les analyses moléculaires ont été réalisées et ont montré qu'il s'agit de la combinaison C : PorA-VR1 5-1, PorA-VR2 10-8: Feta F3-6 (C:P 1,5 -1,10 -8:F3-6, complexe clonal cc11. Cette combinaison de marqueurs est fréquente parmi les cas d'IIMC dans la population générale en France et en Europe. Par conséquent, d'autres marqueurs moléculaires (*porB*, *fHbp*, *penA*, *gyrA* et *rpoB*) ont été utilisés et la comparaison avec les souches américaines et allemandes isolées chez les HSH a été réalisée. Cette analyse a permis de montrer la circulation des souches spécifiques du séro groupe C chez les HSH. Cela pourrait représenter une circulation limitée à réseau social HSH. Toutefois, un mécanisme unique de transmission ou une susceptibilité spécifique chez les HSH restent possible.

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

Le CNRM 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 ARS pour répondre aux interrogations pratiques des professionnels de terrain pour la gestion des cas d'infection invasive à méningocoque. En 2013, le CNR a contribué à l'élaboration d'un « Protocole pour le diagnostic Bactériologique des Infections Invasives à Méningocoques (IIM) dans la région Pays de la Loire » publié le 31/10/2013.

Le CNRM reçoit régulièrement des stagiaires pour formation (BTS, DUT, MA, M2, thésards et post-doctorants) et participe activement à leur formation. En 2013, 1 thésard et deux étudiants M2 ont travaillé dans le laboratoire.

Ainsi en 2013, le CNRM a distribué des souches du genre *Neisseria* et a participé aux travaux de la thèse de Médecine de *Raphaël Guihéneuf* (Université du droit et de la santé - Lille 2 Faculté de médecine Henri Warembourg) dont le sujet était « Identification des *Neisseria* en médecine humaine : évaluation de la spectrométrie de masse MALDI-ToF et du séquençage génétique conventionnel »

- 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 est membre du Comité Technique de Vaccination (CTV) et du groupe méningocoque du CTV et participe 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 aux correspondants.

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>.

6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

6.1. Développement des tests rapides pour la détection (TDR) de *N. meningitidis*

Un nouveau test (par des bandelettes) de diagnostic rapide utilisant la technique d'immuno-chromatographie a été développé par l'Institut Pasteur en collaboration avec le Centre de Recherche Médicale et Sanitaire (CERMES) de Niamey, au Niger (Chanteau et al., New rapid diagnostic tests for *Neisseria meningitidis* serogroups A, W135, C, and Y. (PLoS Med. 2006; 3:1579-1586).. Ce test permet de détecter rapidement certaines souches du méningocoque. Cependant, ce test ne permet pas de détecter toutes les formes (sérogroupes) du méningocoque et en particulier, les méningocoques des sérogroupes B, et X. Le séro groupe B est très répandu dans les pays du Nord (Europe et Amérique du Nord) et le séro groupe X a récemment émergé en Afrique subsaharienne (comme au Niger, au Ghana et au Burkina Faso). Nous avons démarré un nouveau projet dont l'objectif est de développer des bandelettes pour la détection de ces sérogroupes.

L'approche expérimentale comporte plusieurs étapes pour le développement de ces tests pour les sérogroupes X et B :

- Purification et caractérisation des polysides capsulaires des différents sérogroupes.
- Immunisation et préparation des anticorps monoclonaux contre la capsule du méningocoque.
- L'étude de la performance des tests au laboratoire sur une collection des souches du méningocoque.
- L'étude de la performance des tests au laboratoire sur des prélèvements cliniques (liquide céphalorachidien)
- L'étude de validation sur le terrain (y compris pendant la saison épidémique en Afrique en collaboration avec le CERMES au Niger : le CERMES fait partie du Réseau International des Institut Pasteur). Le projet mené par Alain Agnememel (thésard dans notre laboratoire) avance bien et a connu un premier succès avec l'obtention d'un sérum polyclonal anti-NmX de lapin. Une première génération de TDR anti-NmX (sous forme de bandelettes) a pu être produite et évaluée en condition de laboratoire. En parallèle, un anticorps monoclonal anti-NmX a été également obtenu chez la souris et il est en cours de caractérisation pour la production de bandelettes de deuxième génération. Une première présentation (abstract + présentation orale) au 20ème congrès de l'EMGM à Bad Loipersdorf, Autriche 17 -19 Septembre 2013.

076 | Characterization and immunogenicity of *Neisseria meningitidis* serogroup X capsular polysaccharide a step forward for rapid diagnostic tests

Presenter **Muhamed-Kheir Taha**

(1) A. Agnememel, (1) D. Giorgini, (2) F. Traincard, (2) F. Nato, (3) L. Mulard and (1) M.K Taha

(1) Institut Pasteur, Unit of Invasive bacterial infections Unit | (2) Platform for Recombinant Protein and Antibody Production PT5 | (3) Unit Chemistry of Biomolecules, Paris, France

E-Mail: mktaha@pasteur.fr

Meningococcal infections due to serogroup X (NmX) occur occasionally in the countries of the meningitis belt during the past 20 years. However, outbreaks caused by NmX were reported recently in several of these countries. Diagnostic tools for this serogroup are still lacking and there is no polysaccharide-based vaccine to protect against invasive infections due to serogroup X. We aimed in this work to characterize NmX capsular polysaccharide and to obtain monoclonal antibodies to develop diagnostic tools for serogroup X.

We purified capsular polysaccharides (CP) of an invasive strain of NmX (CPX) and characterized it by nuclear magnetic resonance (NMR). We also prepared conjugate capsule that was chemically coupled to the tetanus toxoid by 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP), CPX-TT. Female mice of different genetic backgrounds were immunized subcutaneously using 4 capsule preparations (i) purified capsule alone, (ii) CPX-TT (iii) a mixture of purified capsule with the meningococcal penicillin binding protein 2, PBP2 (that we have recently shown to act as an adjuvant) and (iv) entire NmX bacteria.

Sera were evaluated by ELISA for their reactivity with purified NmX capsule, for their cross reactivity with other capsular polysaccharides corresponding to other serogroups, for bactericidal activity and for the ability of immune-sera to passively protect mice against experimental meningococcal infection.

BALB/cJ Rj mice showed higher ELISA titres than RjOrl:SWISS mice with the four antigenic preparations. Whole bacteria showed the highest ELISA titres (IgG+IgM), however, the conjugate CPX-TT conjugate, showed the highest IgG titres and the highest IgG/IgM ratio. Monoclonal antibodies are under progress to develop dipsticks for rapid detection of CPX in CSF. Immune-sera were bactericidal and reduced bacteraemia in mice during meningococcal experimental infection.

The data obtained in mice show immunogenicity of purified serogroup X polysaccharide. The development of a new rapid diagnostic test should permit a next-to-bed use and is expected to enhance surveillance of meningococcal meningitis in Africa where NmX is involved in outbreaks in several countries. A conjugate vaccine against serogroup X may be developed.

6.2. Le développement et l'utilisation du MATS pour la prédiction de la couverture vaccinale par le Bexsero®

Travail publié dans the Lancet Infect Dis 2013

Predicted strain coverage of a meningococcal multicomponent vaccine (4CMenB) in Europe: a qualitative and quantitative assessment

Ulrich Vogel, Muhamed-Kheir Taha, Julio A Vazquez, Jamie Findlow, Heike Claus, Paola Stefanelli, Dominique A Caugant, Paula Kriz, Raquel Abad, Stefania Bambini, Anna Carannante, Ala Eddine Deghmane, Cecilia Fazio, Matthias Frosch, Giacomo Frosi, Stefanie Gilchrist, Marzia M Giuliani, Eva Hong, Morgan Ledroit, Pietro G Lovaglio, Jay Lucidarme, Martin Musilek, Alessandro Muzzi, Jan Oksnes, Fabio Rigat, Luca Orlandi, Maria Stella, Danielle Thompson, Mariagrazia Pizza, Rino Rappuoli, Davide Serruto, Maurizio Comanducci, Giuseppe Boccadifuoco, John J Donnelly, Duccio Medini, Ray Borrow

Summary

Background A novel multicomponent vaccine against meningococcal capsular group B (MenB) disease contains four major components: factor-H-binding protein, neisserial heparin binding antigen, neisserial adhesin A, and outer-membrane vesicles derived from the strain NZ98/254. Because the public health effect of the vaccine, 4CMenB (Novartis Vaccines and Diagnostics, Siena, Italy), is unclear, we assessed the predicted strain coverage in Europe.

Methods We assessed invasive MenB strains isolated mainly in the most recent full epidemiological year in England and Wales, France, Germany, Italy, and Norway. Meningococcal antigen typing system (MATS) results were linked to multilocus sequence typing and antigen sequence data. To investigate whether generalisation of coverage applied to the rest of Europe, we also assessed isolates from the Czech Republic and Spain.

Findings 1052 strains collected from July, 2007, to June, 2008, were assessed from England and Wales, France, Germany, Italy, and Norway. All MenB strains contained at least one gene encoding a major antigen in the vaccine. MATS predicted that 78% of all MenB strains would be killed by postvaccination sera (95% CI 63–90, range of point estimates 73–87% in individual country panels). Half of all strains and 64% of covered strains could be targeted by bactericidal antibodies against more than one vaccine antigen. Results for the 108 isolates from the Czech Republic and 300 from Spain were consistent with those for the other countries.

Interpretation MATS analysis showed that a multicomponent vaccine could protect against a substantial proportion of invasive MenB strains isolated in Europe. Monitoring of antigen expression, however, will be needed in the future.

6.3. Les publications et communications réalisées en 2013 en lien avec les activités du CNR

(i) Publications nationales

- 1- Barret, A.-S., Deghmane, A.-E., Lepoutre, A., Fonteneau, L., Maine, C., Taha, M.-K. & Parent du Châtelet, I. (2014). Les infections invasives à méningocoques en France en 2012 : principales caractéristiques épidémiologiques. *Bull Epidemiol Hebd*, 25-31.

(ii) Publications internationales

- 1- Collard, J.M., Issaka, B., Zaneidou, M., Hugonnet, S., Nicolas, P., Taha, M.K., Greenwood, B., and Jusot, J.F. (2013) Epidemiological changes in meningococcal meningitis in Niger from 2008 to 2011 and the impact of vaccination. *BMC Infect Dis* **13**: 576.
- 2- Delaune, D., Andriamanantena, D., Merens, A., Viant, E., Aoun, O., Ceppa, F., Taha, M.K., and Rapp, C. (2013) Management of a rifampicin-resistant meningococcal infection in a teenager. *Infection*.
- 3- Delbos, V., Lemee, L., Benichou, J., Berthelot, G., Deghmane, A.E., Leroy, J.P., Houivet, E., Hong, E., Taha, M.K., and Caron, F. (2013a) Impact of MenBvac, an outer membrane vesicle (OMV) vaccine, on the meningococcal carriage. *Vaccine* **31**: 4416-4420.
- 4- Delbos, V., Lemee, L., Benichou, J., Berthelot, G., Taha, M.K., and Caron, F. (2013b) Meningococcal carriage during a clonal meningococcal B outbreak in France. *Eur J Clin*

- 5- Gaschignard, J., Levy, C., Deghmane, A.E., Dubos, F., Muszlak, M., Cohen, R., Bingen, E., Faye, A., and Taha, M.K. (2013) Invasive serogroup w meningococcal disease in children: a national survey from 2001 to 2008 in france. *Pediatr Infect Dis J* **32**: 798-800.
 - 6- Hoiseth, S.K., Murphy, E., Andrew, L., Vogel, U., Frosch, M., Hellenbrand, W., Abad, R., Vazquez, J.A., Borrow, R., Findlow, J., Taha, M.K., Deghmane, A.E., Caugant, D.A., Kriz, P., Musilek, M., Mayer, L.W., Wang, X., Macneil, J.R., York, L., Tan, C.Y., Jansen, K.U., and Anderson, A.S. (2013) A Multi-Country Evaluation of Neisseria Meningitidis Serogroup B Factor H Binding Proteins and Implications for Vaccine Coverage in Different Age Groups. *Pediatr Infect Dis J*.
 - 7- Hong, E., Giuliani, M.M., Deghmane, A.E., Comanducci, M., Brunelli, B., Dull, P., Pizza, M., and Taha, M.K. (2013a) Could the multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB) control Neisseria meningitidis capsular group X outbreaks in Africa? *Vaccine* **31**: 1113-1116.
 - 8- Hong, E., Thulin Hedberg, S., Abad, R., Fazio, C., Enriquez, R., Deghmane, A.E., Jolley, K.A., Stefanelli, P., Unemo, M., Vazquez, J.A., Veyrier, F.J., and Taha, M.K. (2013b) Target Gene Sequencing To Define the Susceptibility of Neisseria meningitidis to Ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 1961-1964.
 - 9- Madhi, F., Levy, C., Deghmane, A.E., Bechet, S., Cohen, R., and Taha, M.K. (2013) Corticosteroid Therapy in Genotype ST-11 Meningococcal Infections. *Pediatr Infect Dis J* **32**: 291-293.
 - 10- Njanpop-Lafourcade, B.M., Hugonnet, S., Djogbe, H., Kodjo, A., N'Douba A, K., Taha, M.K., Stoeckel, P., and Gessner, B.D. (2013) Mobile microbiological laboratory support for evaluation of a meningitis epidemic in northern benin. *PLoS One* **8**: e68401.
 - 11- Taha, M.K. (2013) Immunisation against meningococcus B. *Lancet* **382**: 936.
 - 12- Taha, M.K., Kacou-N'douba, A., Hong, E., Deghmane, A.E., Giorgini, D., Okpo, S.L., Kangah, T., and Dosso, M. (2013) Travel-related Neisseria meningitidis Serogroup W135 Infection, France. *Emerg Infect Dis* **19**: 1030-1032.
 - 13- Terrade, A., Collard, J.M., Nato, F., and Taha, M.K. (2013) Laboratory evaluation of a rapid diagnostic test for Neisseria meningitidis serogroup A. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.
 - 14- Toubiana, J., Heilbronner, C., Gitiaux, C., Oualha, M., Taha, M.K., Rousseau, C., Picard, C., Mira, J.P., and Gendrel, D. (2013) Pachymeningitis after meningococcal infection. *Lancet* **381**: 1596.
 - 15- Vogel, U., Taha, M. K., Vazquez, J. A., Findlow, J., Claus, H., Stefanelli, P., Caugant, D. A., Kriz, P., Abad, R., Bambini, S., Carannante, A., Deghmane, A. E., Fazio, C., Frosch, M., Frosi, G., Gilchrist, S., Giuliani, M. M., Hong, E., Ledroit, M., Lovaglio, P. G., Lucidarme, J., Musilek, M., Muzzi, A., Oksnes, J., Rigat, F., Orlandi, L., Stella, M., Thompson, D., Pizza, M., Rappuoli, R., Serruto, D., Comanducci, M., Boccadifuoco, G., Donnelly, J. J., Medini, D. & Borrow, R. (2013). Predicted strain coverage of a meningococcal multicomponent vaccine (4CMenB) in Europe: a qualitative and quantitative assessment. *Lancet Infect Dis*.
- (iii) Communications nationales
1. Introduction de la vaccination contre le méningocoque C en France : conséquence d'une couverture vaccinale insuffisante. I. Parent du Châtelet, M-K.Taha, L. Fonteneau, D. Lévy-Bruhl. Poster aux Journées Nationales d'Infectiologie, Clermont Ferrand 12-14juin 2013
 2. Réponse vaccinale méningococcique chez 15 transplantés d'organe Wyplosz B, François H, Durrbach A, Duclos-Vallée JC, Taha M-K Poster aux Journées Nationales d'Infectiologie, Clermont Ferrand 12-14juin 2013

3. Emergence d'un clone virulent de méningocoque B en Alsace. F. Viller, M-K.Taha, C. Janin, C. Edel, T. El Mrini, I. Parent du Châtelet. Poster aux Journées Nationales d'Infectiologie, Clermont Ferrand 12-14 juin 2013

(iv) Communications internationales

- 1- Characterization and immunogenicity of *Neisseria meningitidis* serogroup X capsular polysaccharide a step forward for rapid diagnostic tests A. Agnememel, D. Giorgini, F. Traincard, F. Nato, L. Mulard and M.K Taha Présentation orale au 20^{ème} congrès de l'EMGM à Bad Loipersdorf, Autriche 17 -19 Septembre 2013.
- 2- Lipocalin 2 in cerebrospinal fluid as a maker of acute bacterial meningitis T. Guiddir, A. E. Deghmane, D. Giorgini, and M.K. Taha Présentation orale au 20^{ème} congrès de l'EMGM à Bad Loipersdorf, Autriche 17 -19 Septembre 2013.
- 3- Recent trends in the epidemiology of invasive meningococcal disease in France I. Parent du Châtelet, A.E. Deghmane, L. Fonteneau, A. Lepoutre, D.I Lévy-Bruhl, and M-K Taha. Poster au 20^{ème} congrès de l'EMGM à Bad Loipersdorf, Autriche 17 -19 Septembre 2013.
- 4- Molecular typing and animal models to define breakpoints in meningococcal antibiotic susceptibility testing. M-K. Taha Présentation orale au 20^{ème} congrès de l'EMGM à Bad Loipersdorf, Autriche 17 -19 Septembre 2013.

(v) Conférences sur invitations.

- 1- Infections Invasives à Méningocoque. M-K. Taha. 16 Octobre. Hôpital Cochin. Paris
- 2- Update on meningococcal disease : worldwide epidemiology and impact of serogroup W. M-K. Taha. 21 Octobre 2013, Buenos Aires, Argentine.
- 2- Meningococcal disease: biological aspects, diagnosis, pathogenesis and worldwide epidemiology. M-K. Taha. 22 Octobre 2013, Buenos Aires, Argentine.
- 3- Méningocoques B : nouveaux outils d'évaluation de la couverture des souches circulantes par le vaccin Bexsero. M-K. Taha. 28 Novembre, 6^{ème} séminaire des Centres nationaux de référence (CNR). Paris
4. Apport de la recherche pour définir des stratégies vaccinales contre le méningocoque M-K. Taha. 11 Décembre, Matinée Carnot, Pasteur Maladies Infectieuses, Paris.

7. Programme d'activité pour les années 2014-2015

Le CNR projette de mener des activités de référence et d'expertise permettant d'assurer un leadership pour notre laboratoire aux niveaux national et international et en particulier par le développement de nouveaux outils en matière de surveillance.

7.1. Détection de la Lipocaline 2 dans le liquide céphalo-rachidien comme marqueur de méningite bactérienne aigue

Les méningites bactériennes restent un problème de santé publique majeur de par le monde avec une morbi-mortalité élevée. Aussi, pouvoir distinguer rapidement une méningite bactérienne (nécessitant une prise en charge thérapeutique en urgence) d'une méningite virale

permettrait d'améliorer le pronostic des patients. La Lipocaline 2 (LCN2 chez l'homme et Lcn2 chez la souris) est une protéine de phase aiguë impliquée dans la réponse immunitaire innée antibactérienne par sa capacité à lier des sidérophores bactériens et ainsi induire un effet bactériostatique en empêchant l'accès au fer aux bactéries. Nous nous sommes intéressés à cette protéine pour qui récemment une analyse transcriptomique dans notre laboratoire a montré l'induction de l'expression de son gène dans la fraction cérébrale de souris transgéniques exprimant la transferrine humaine, six heures après une infection par *N. meningitidis* (Nm). L'objectif est d'étudier si la détection de la LCN2 dans le LCR peut être utilisée comme marqueur de méningite bactérienne aiguë.

Nous analyserons, par Western Blot et ELISA, une large collection de LCR humains adressés au centre national de référence des méningocoques pour diagnostic de méningite bactérienne aiguë. Cette collection sera composée des LCR correspondant à des cas de méningite bactérienne confirmée par PCR et/PCR à une méningite virale confirmée. La sensibilité et la spécificité de cette analyse seront calculées ainsi que les valeurs prédictives positive et négative. De même, la corrélation entre le génotype de la souche bactérienne et le niveau de LCN2 sera analysée. Un modèle animal d'infection méningée à méningocoque (les souris transgéniques exprimant la transferrine humaine) sera utilisé pour suivre la cinétique d'apparition de la protéine dans le LCR ainsi que la cinétique d'apparition de l'ARN.

Après cette phase au laboratoire, des études prospectives menées à l'hôpital recrutant des patients admis pour suspicion de méningite aiguë seront dessinées pour tester la validité diagnostique de la détection de la LCN2 dans cette pathologie. En effet, dans la suite du projet, nous voulons développer un test de diagnostic rapide pour distinguer la méningite bactérienne aiguë et la méningite virale pour mieux rationaliser la prise en charge et en particulier l'utilisation des antibiotiques.

7.2. Développement d'une approche sérologique afin d'aider secondairement à la décision vaccinale face à des situations de grappes de cas, d'hyperendémie, ou d'épidémie à méningocoque B

Dans son avis du 25 octobre 2013, le Haut Conseil de Santé Publique (HCSP) recommande le recours à une vaccination par Bexsero® pour la gestion de situations de grappes de cas, d'hyperendémie, ou d'épidémie. Mais un point crucial sera d'avoir la certitude que celle-ci est bien couverte par le vaccin.

Le taux de couverture potentiel vis-à-vis des souches invasives B ayant été identifiées en France en 2007-2008 a été estimé à 85 % selon la technique d'évaluation développée par la firme (méthode MATS-Elisa : Meningococcal Antigen Typing System). Cependant, l'évaluation par le

MATS reste théorique et indirecte. L'étude du pouvoir bactéricide du sérum (test SBA) reste le "gold standard" pour l'évaluation de l'efficacité des vaccins anti-méningococciques.

Or, il se trouve que Bexsero® va prochainement être appliqué à des sujets résidant aux confins de la Seine-Maritime et de la Somme pour les protéger de l'hyperendémie due à la souche B:14:P1.7,16, avec un foyer résiduel qui demeure dans quelques cantons alors que le phénomène épidémique a pu être enrayé dans tout le reste de la région, et notamment dans la zone de Dieppe, grâce à la vaccination par le vaccin OMV MenBvac (appliqué de 2006 à 2013, Bexsero® n'étant pas alors disponible).

Le principe est donc de constituer une sérothèque de sujets ayant reçu un schéma complet de Bexsero® afin d'évaluer dans les années ou décennies futures l'intérêt potentiel de ce vaccin dans la gestion des épidémies d'IIM B. Un chiffre d'une cinquantaine de participants serait déjà pleinement satisfaisant et permettrait certainement de guider les campagnes vaccinales futures

Figures

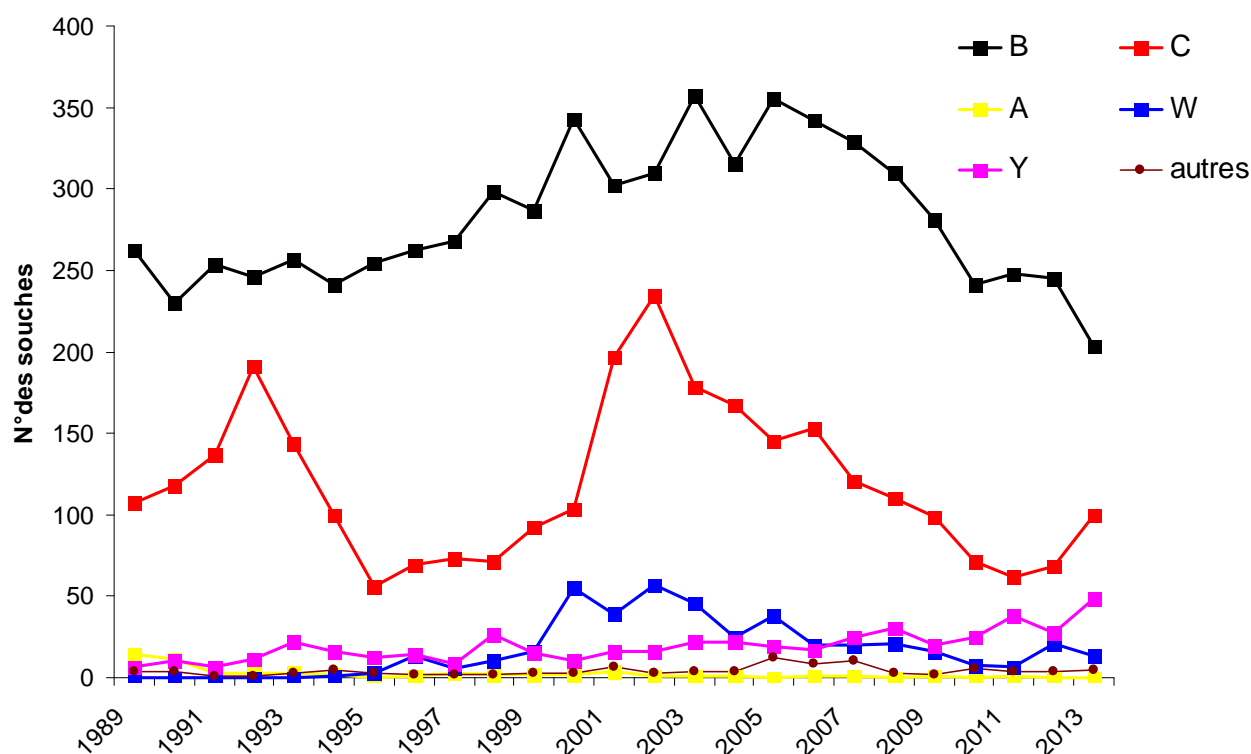


Figure 1 : Évolution de la distribution des sérogroupes des souches de méningocoques responsables d'infections invasives en France (nombre d'isolats cliniques confirmés par culture chaque année et reçus au CNR).

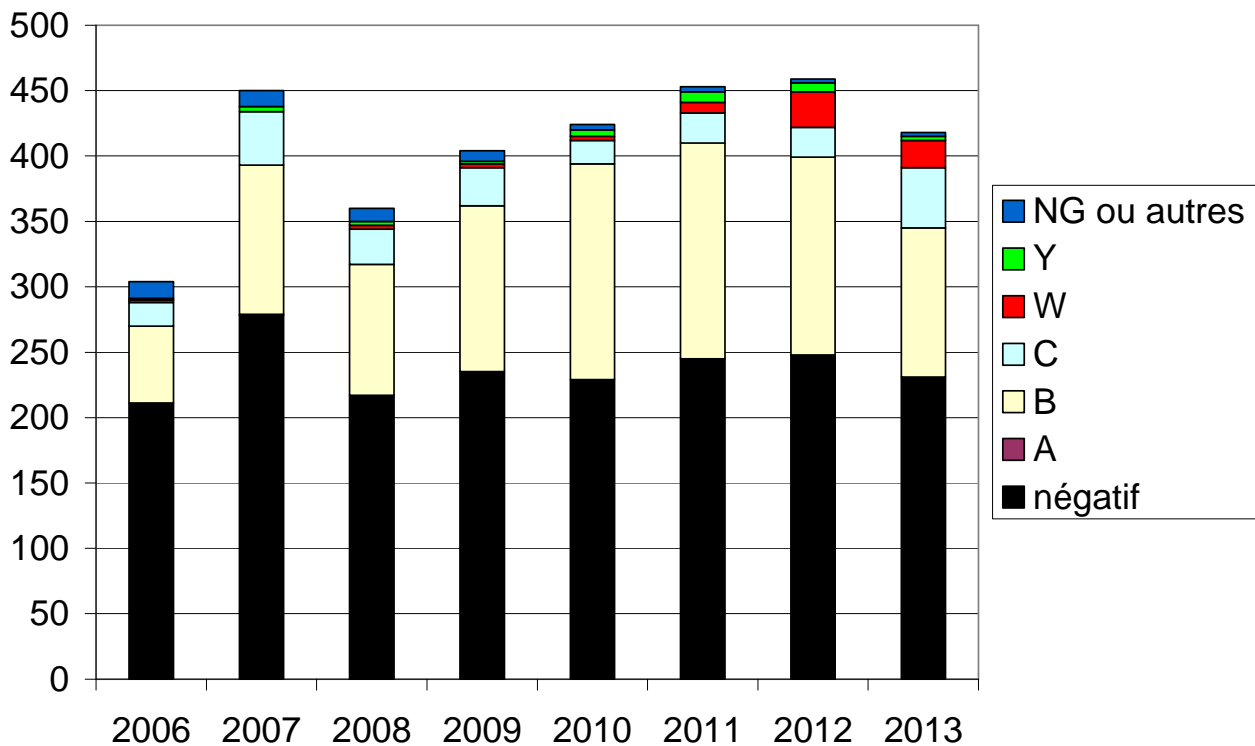


Figure 2 : Évolution de la distribution des genogroupes des cas confirmés par PCR

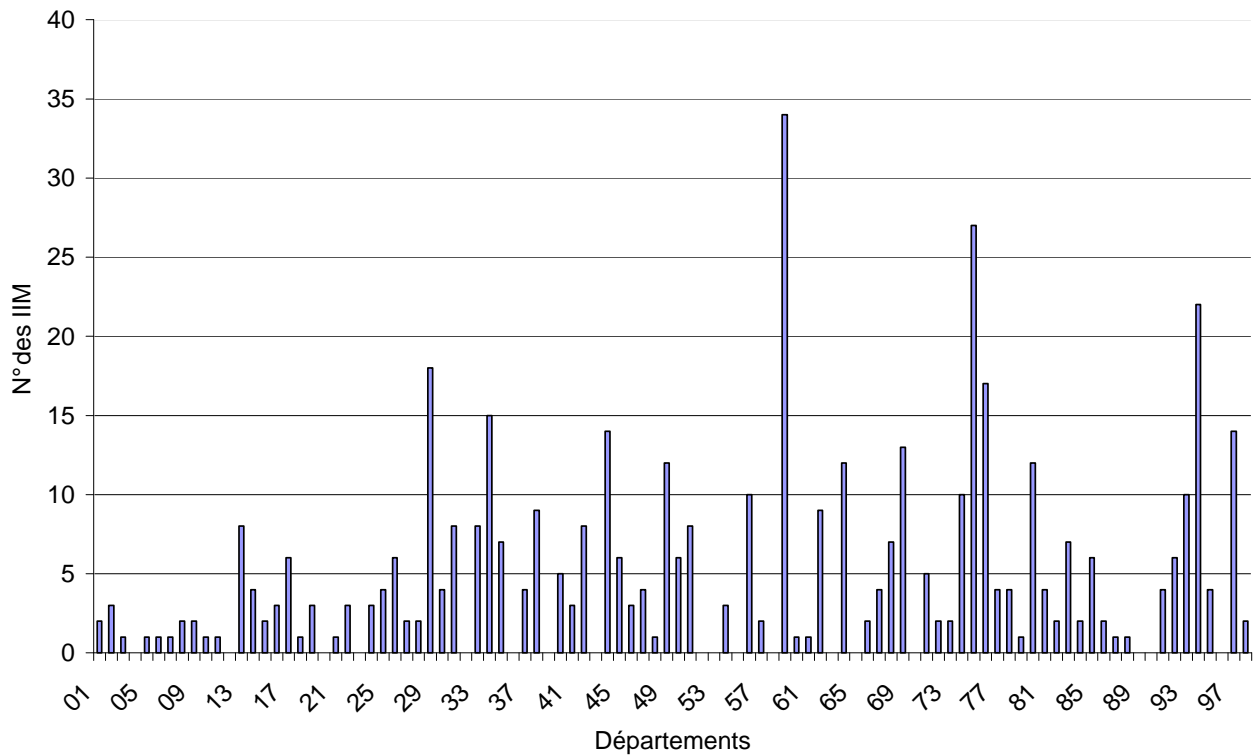


Figure 3 : Nombre des souches et prélèvements positifs par PCR (par département)

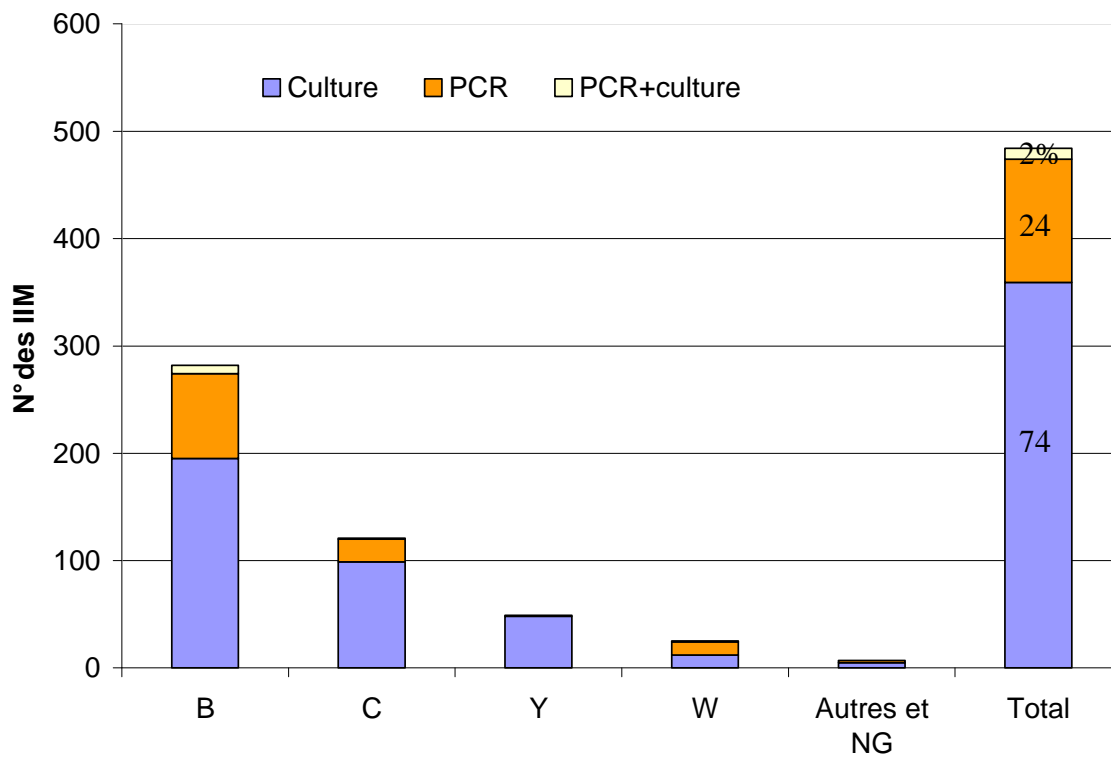


Figure 4 Distribution des cas d'IIM en fonction des groupes et de méthode de confirmation.

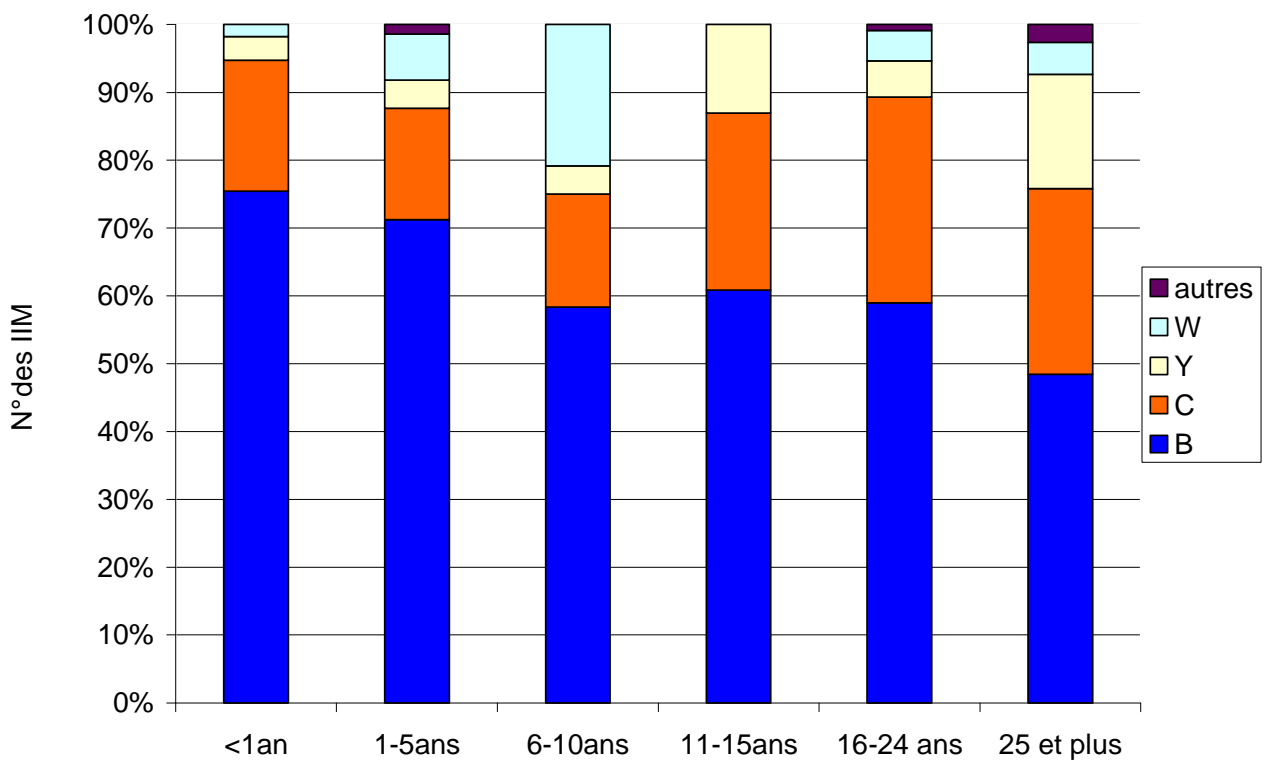
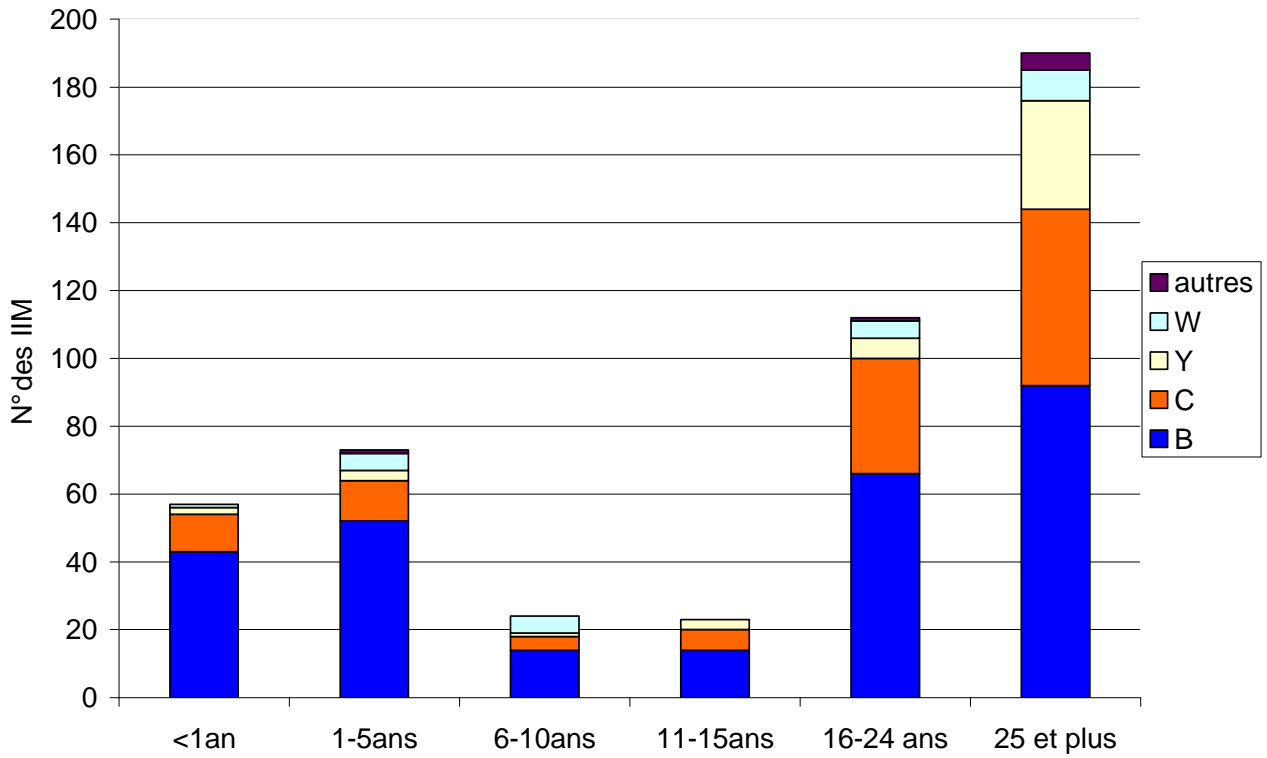


Figure 5 : Nombre des cas (5A) et pourcentage (5B) d'IIM en fonction de l'âge et du sérotype.

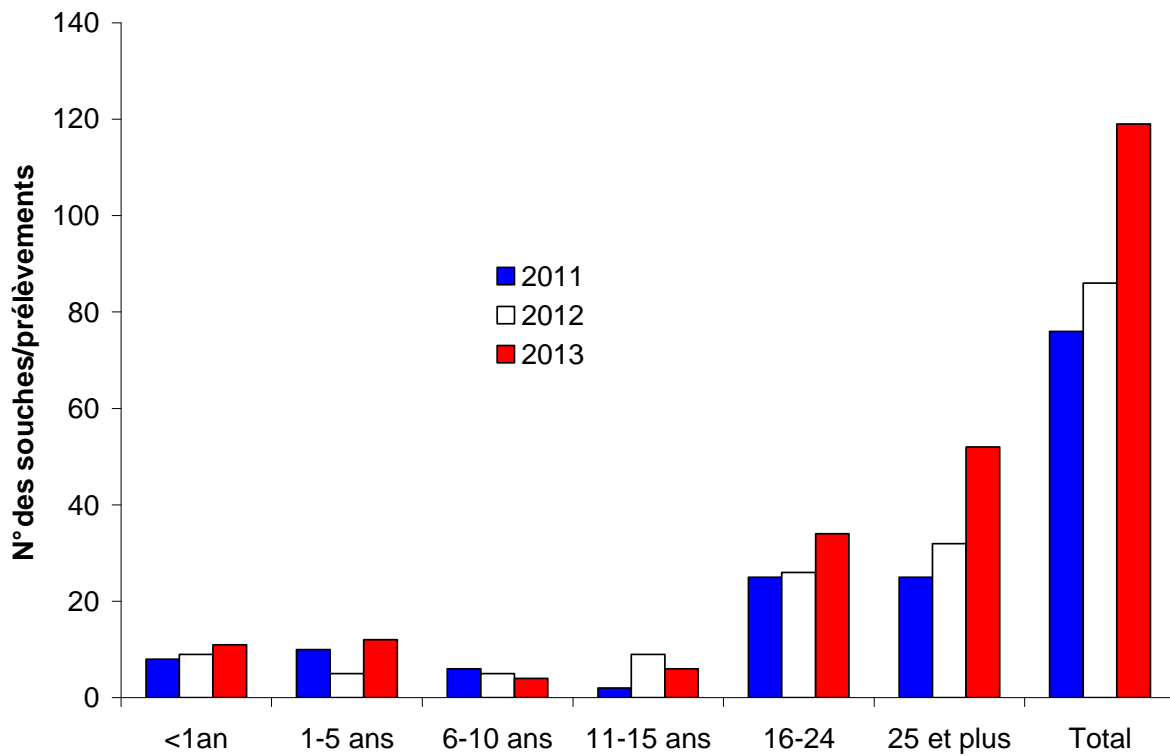


Figure 6. Nombres des cas d'IIMC confirmés par culture ou par PCR entre 2011 et en 2013

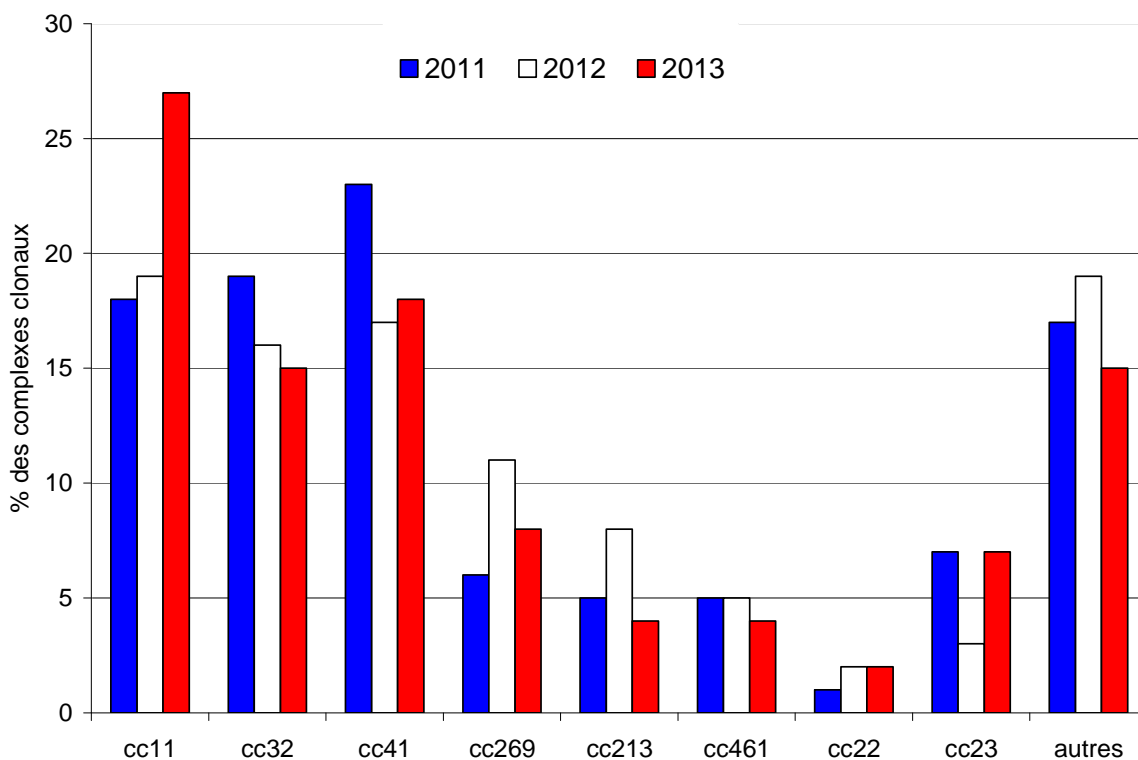


Figure 7 : Evolution de la distribution (en pourcentage) des complexes clonaux majeurs en France entre 2011 et 2013.

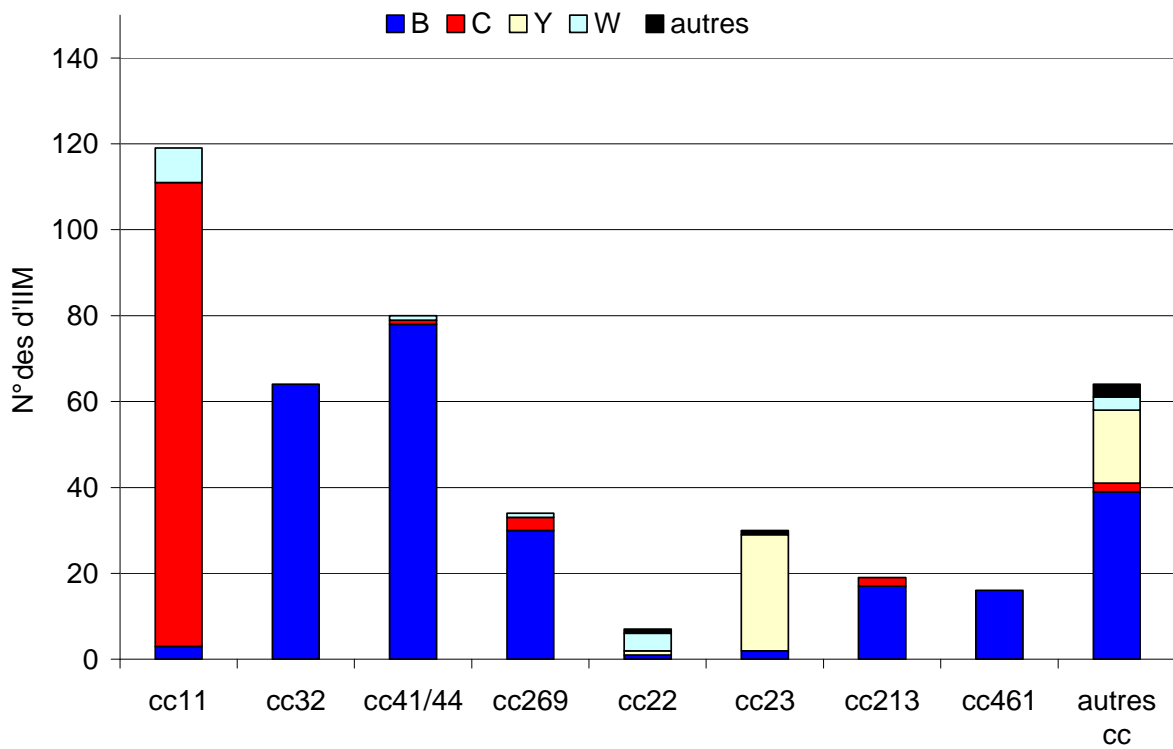
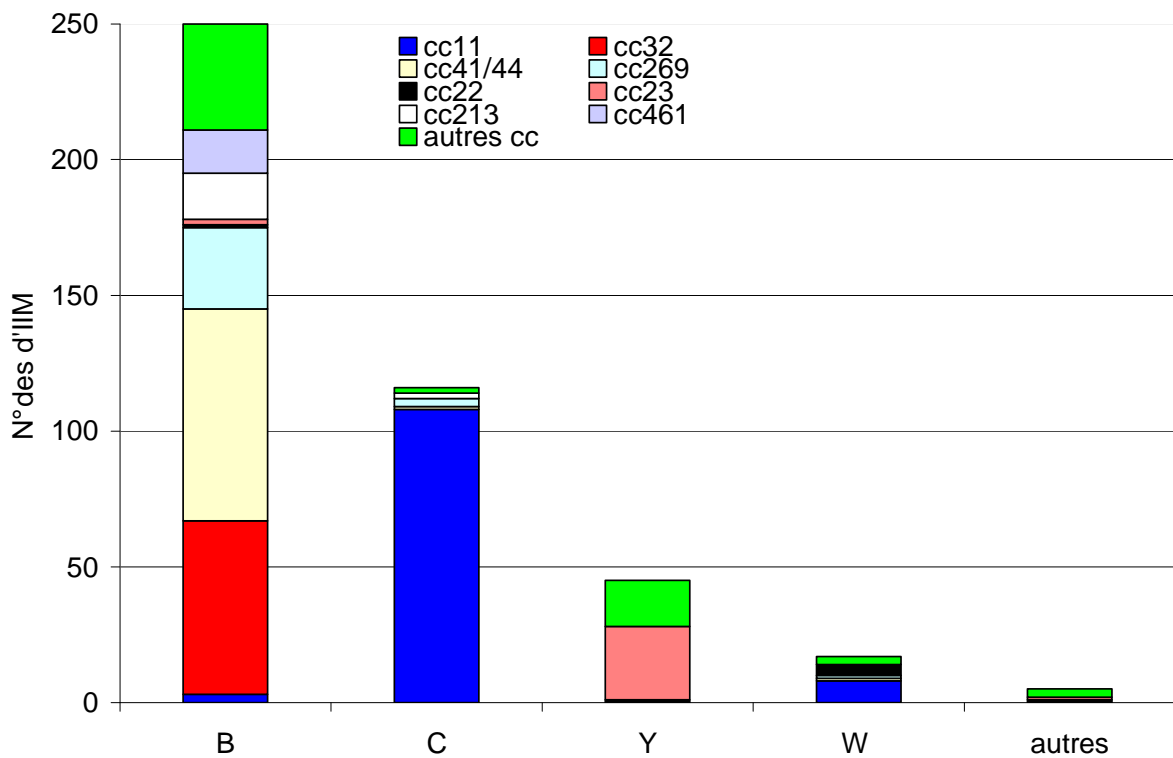
A**B**

Figure 8. A : Distribution des sérogroupes en fonction des complexes clonaux des cas d'IIM confirmés par culture ou par PCR invasives en 2012. **B** : Distribution des complexes clonaux en fonction des sérogroupes des cas d'IIM (souches ou PCR) en 2013.

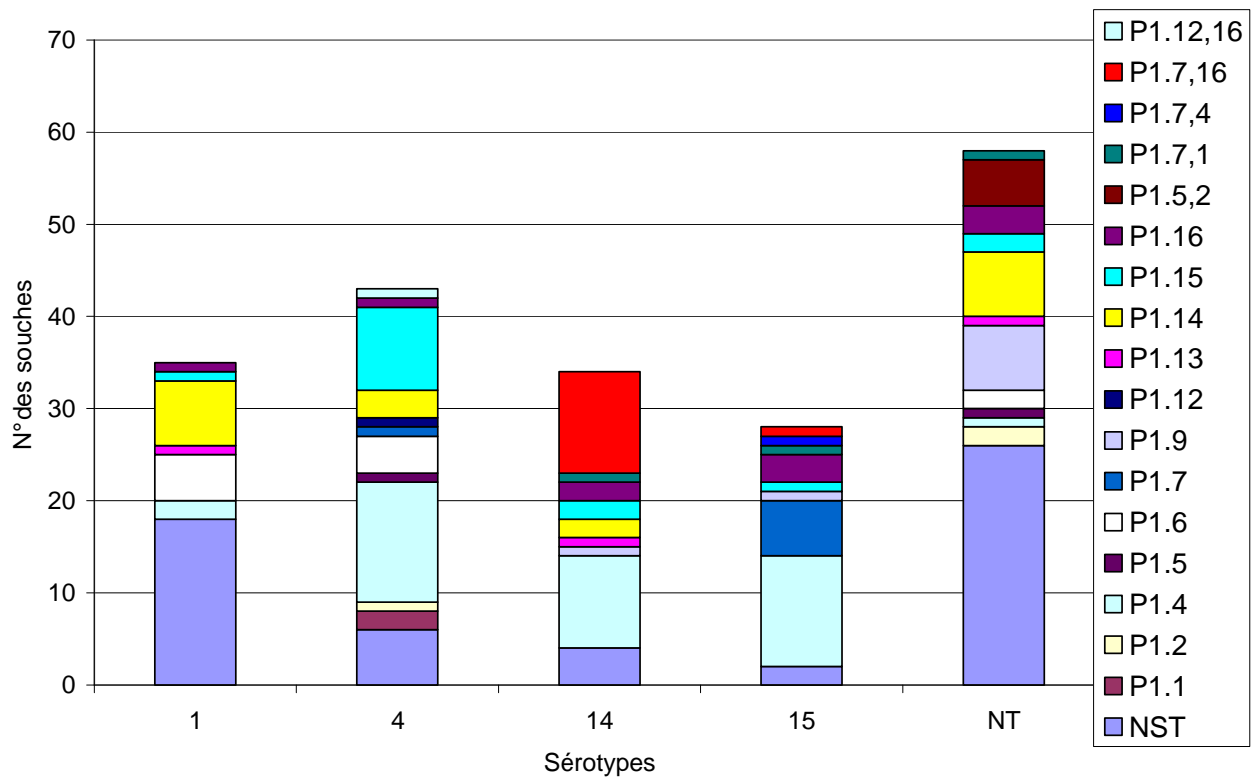


Figure 9 : Phénotypes des souches invasives du sérotype B en 2013.

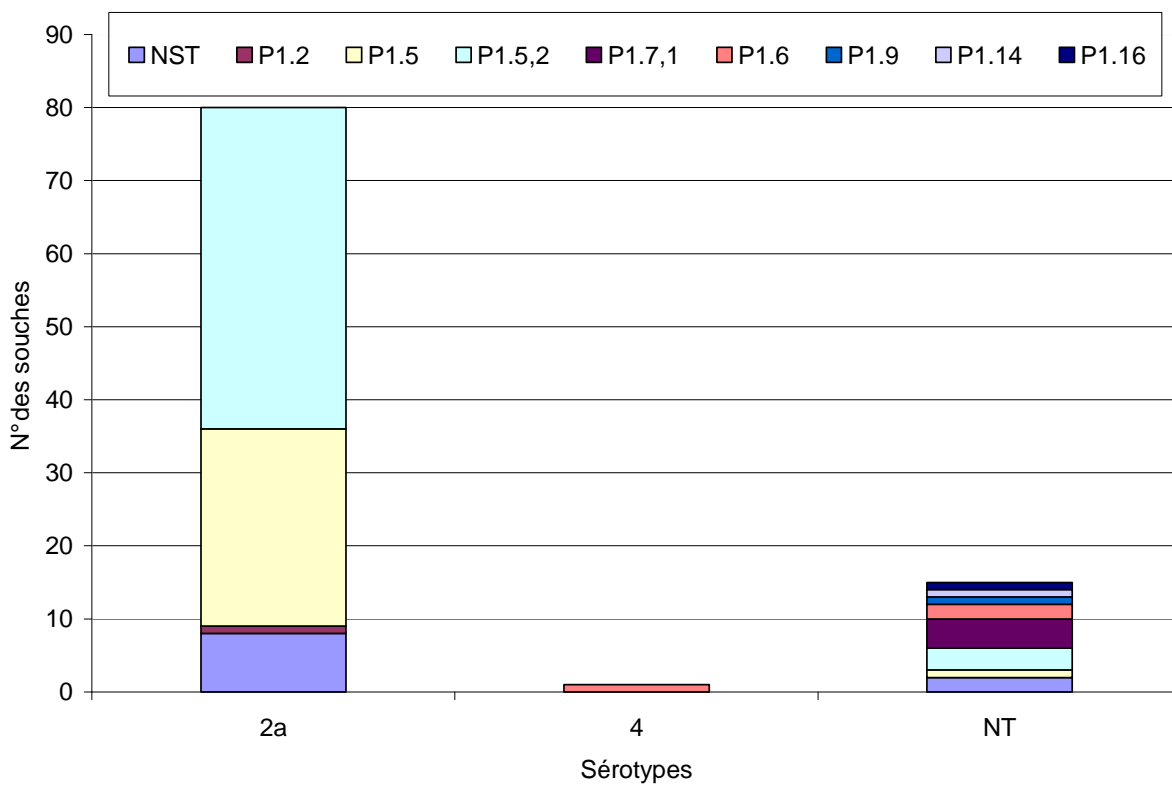


Figure 10 : Phénotypes des souches invasives du sérotype C en 2013.

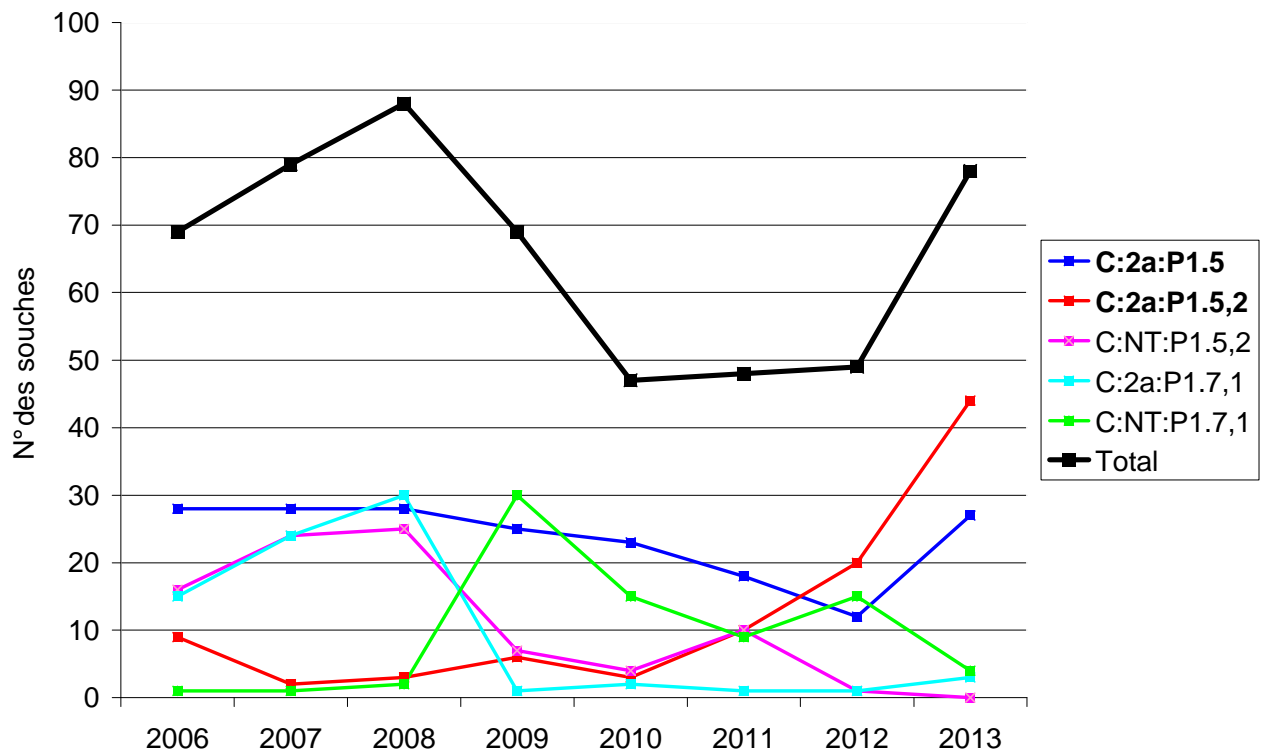


Figure 11 : Evolution des phénotypes les plus fréquents des souches invasives du sérotype C

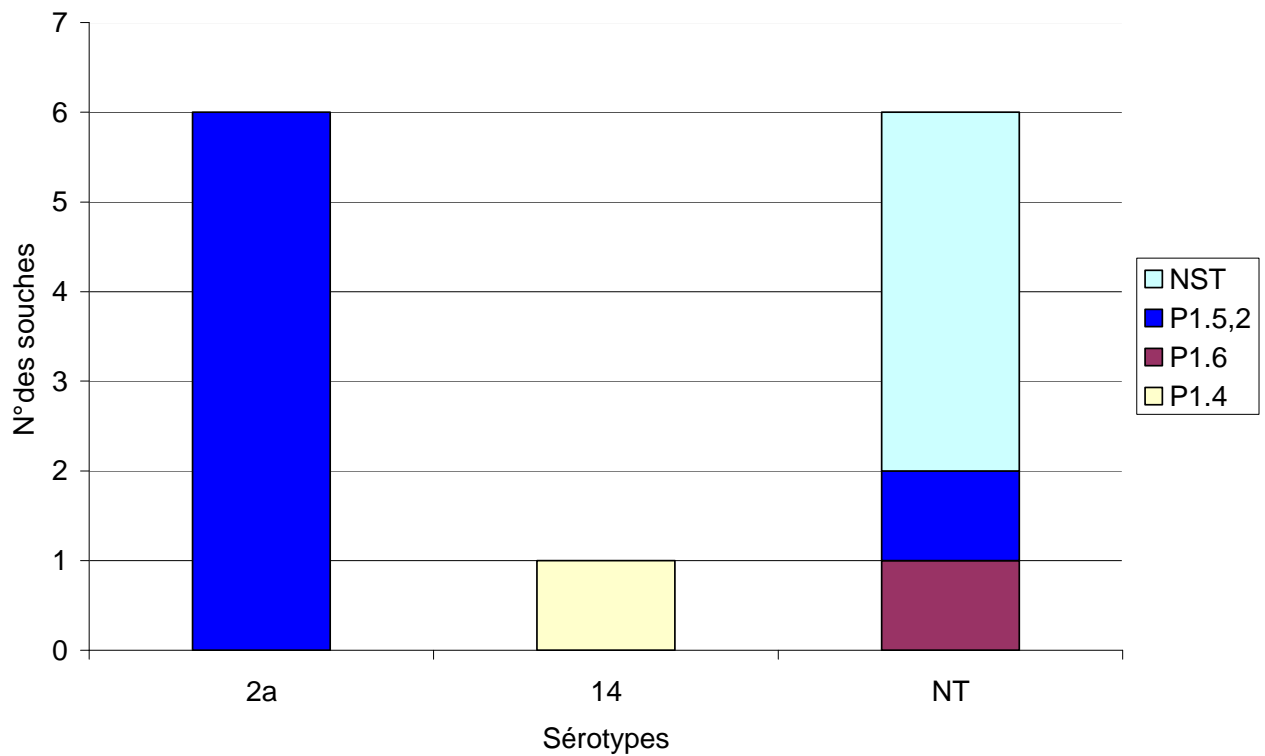


Figure 12 : Phénotypes des souches invasives du sérotype W en 2013

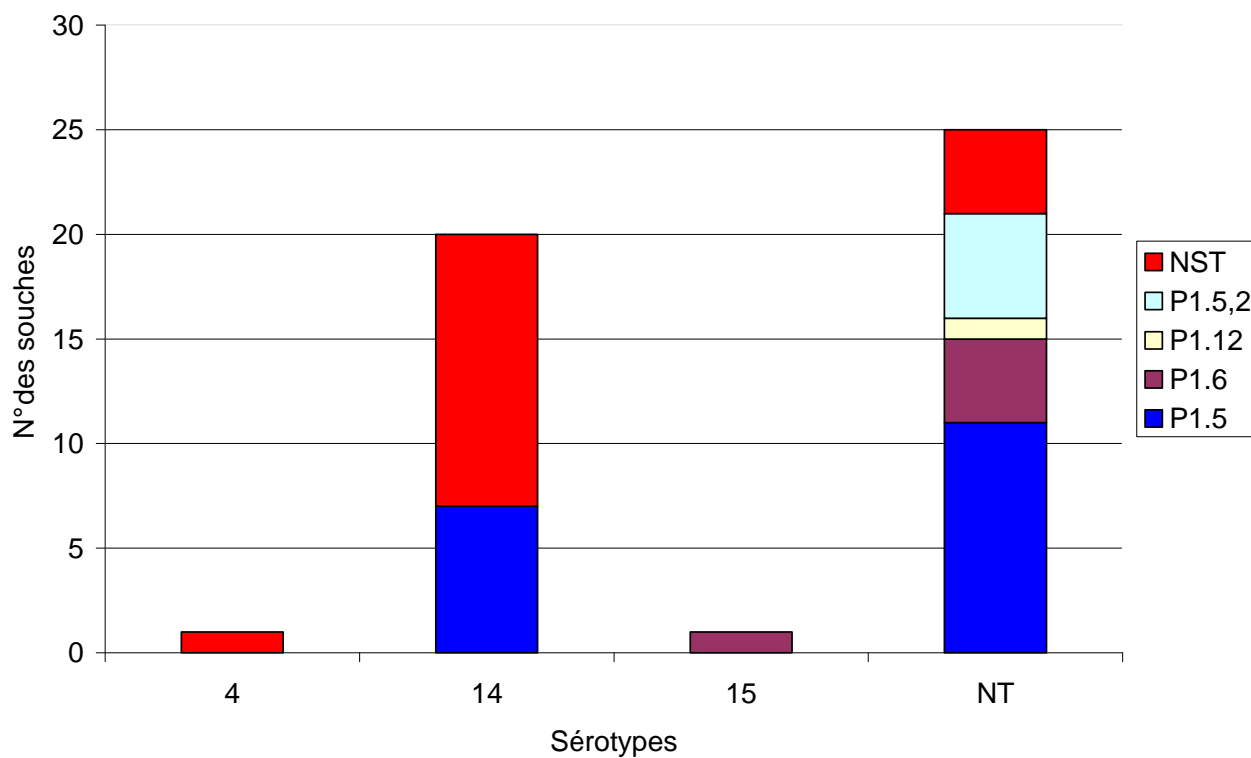


Figure 13 : Phénotypes des souches invasives du séroroupe Y en 2013

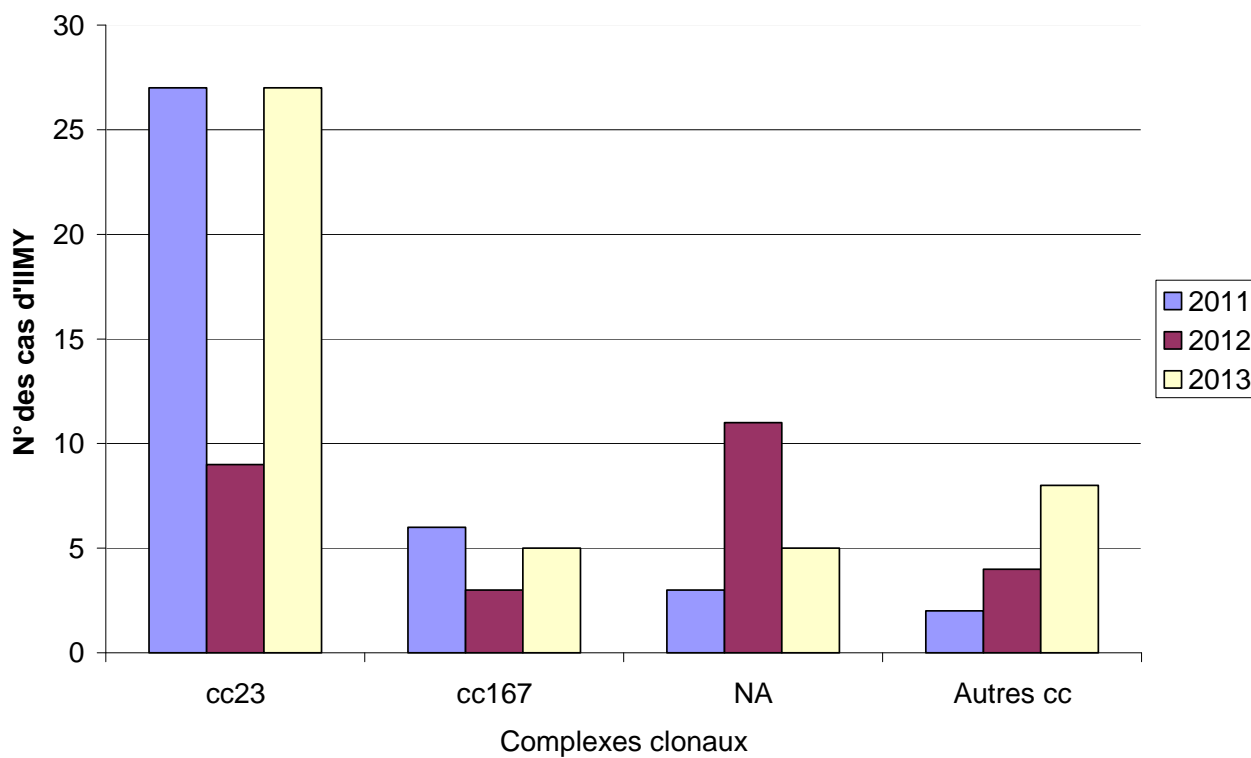


Figure 14 Complexe clonaux des souches du séroroupe Y en 2011 et 2013 (NA=non assigné)

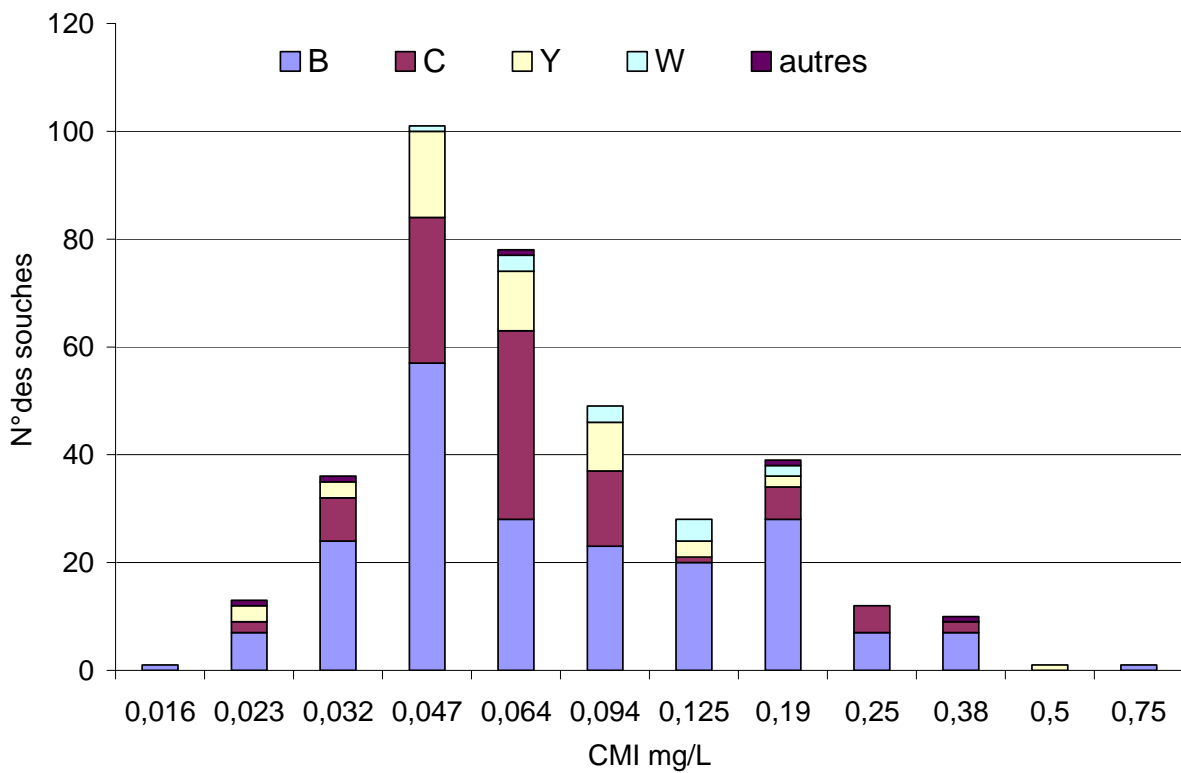


Figure 15 : Distribution des CMI de la pénicilline G parmi les souches invasives de *N. meningitidis* en 2013.

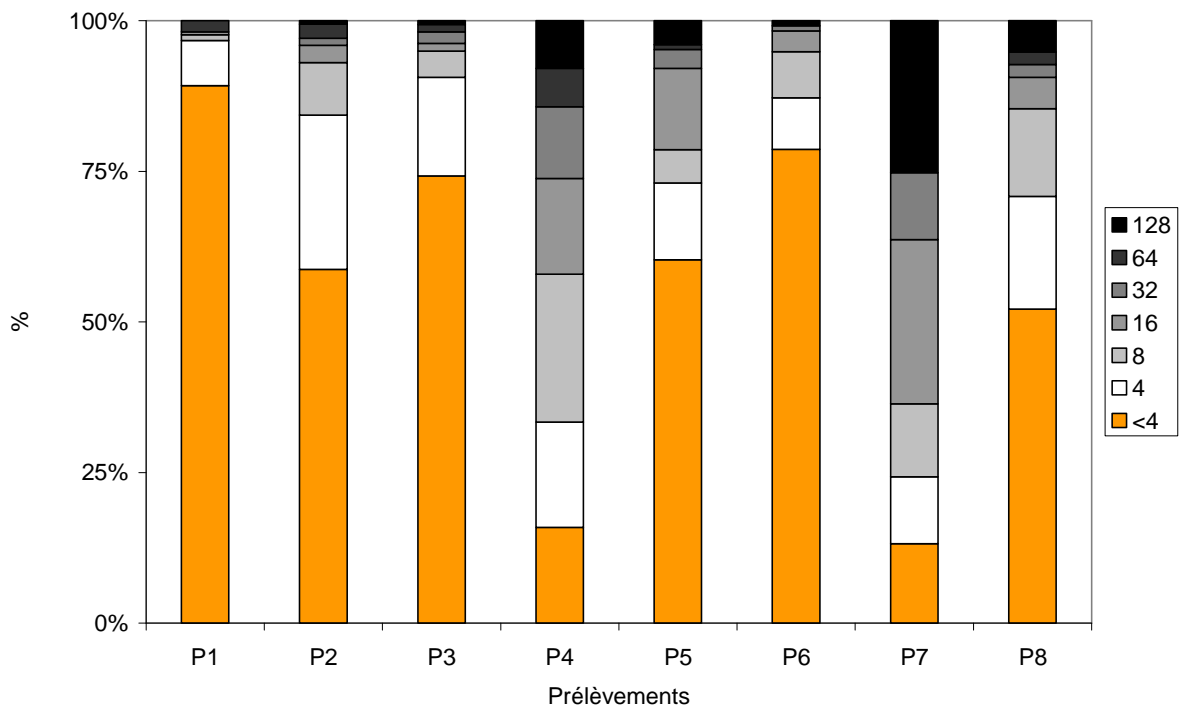


Figure 16 : Distribution des titres ≥ 4 ou < 4 pour l'ensemble des prélèvements de la cohorte Neufchâtel en Bray.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

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 dominant des souches des sérogroupes B, C, Y et W. 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. En Afrique sub-saharienne, dans la "ceinture de la méningite cérébro-spinale" décrite par Lapeyssonnie (du Sénégal à l'Ethiopie), les méningococcies sévissent périodiquement sous forme d'épidémies de méningites dues à des génotypes homogènes, majoritairement des souches des sérogroupes A, W et le plus récemment du sérogroupex qui connaissent alors une expansion clonale.

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*.

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):

Apporter une expertise microbiologique

Développer et évaluer les nouvelles techniques de confirmation du diagnostic

Développer, évaluer et diffuser des techniques moléculaires permettant le diagnostic rapide d'espèce et de séro groupe

Développer et mettre en œuvre des techniques d'analyse génétique permettant la comparaison fine des souches de *Neisseria meningitidis* au niveau national et international

Diffuser les nouvelles techniques diagnostiques validées aux laboratoires

Assurer un contrôle de qualité de la mise en œuvre des techniques moléculaires utilisées par les laboratoires hospitaliers

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 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 sérogroupes, le typage et le sous-typage et l'identification de la sensibilité aux antibiotiques.

Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire

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 visée 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 séro groupe B,

Participer à la surveillance européenne et internationale, en collaboration avec l'Institut de veille sanitaire.

Alerte

Contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de veille sanitaire les cas groupés liés à une souche commune et tout phénomène inhabituel,

Apporter son expertise aux autorités de santé

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,

Participer à la définition des politiques vaccinales et à l'évaluation de leur impact,

Contribuer à l'évaluation de l'adéquation des nouveaux vaccins avec les souches circulant en France ou impliquées dans des phénomènes épidémiques locaux.

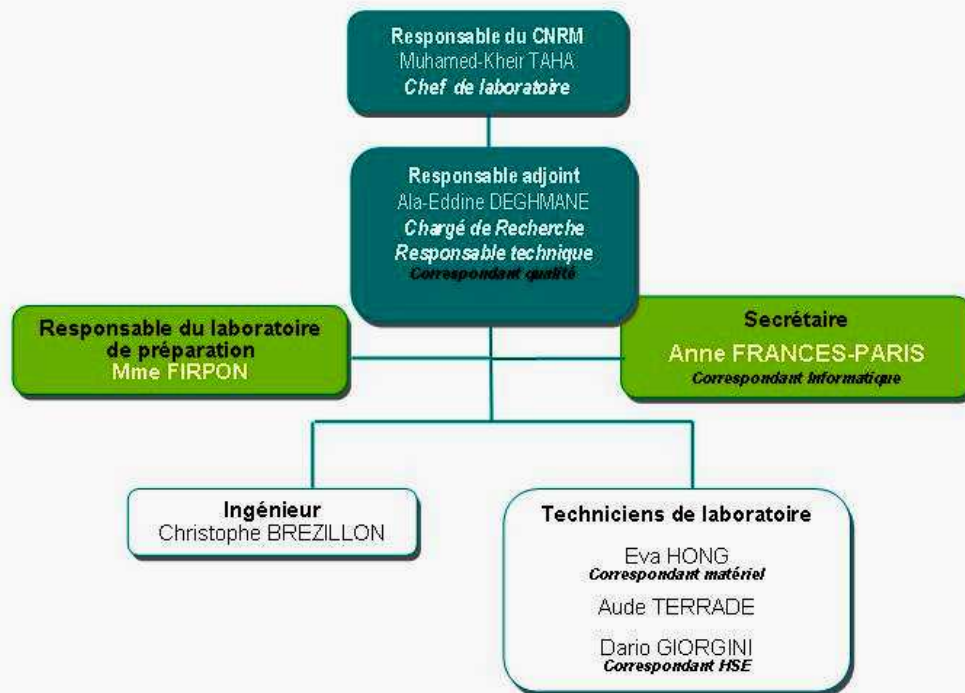
Outre ces thèmes du cahier des charges, sans cesse enrichis par les innovations du CNR, nous réalisons des recherches expérimentales visant à élucider les déterminants moléculaires qui caractérisent les infections invasives à méningocoques dans le but de trouver de nouveaux marqueurs de virulence et 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 la surveillance épidémiologique, les typages moléculaires et l'approche expérimentale fondamentale, dans les activités de CNR. La recherche est indispensable à l'activité de référence.

○ L'Équipe

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 ressources humaines

Prénoms et NOMS	Qualifications	mois	ETP pour le CNRM
Muhamed-Kheir TAHA	Scientifique	12	0,75
Ala-Eddine DEGDMANE	Scientifique	12	0,75
Christophe BRÉZILLON	Ingénieur (arrivé 07/01/2013)	12	0,75
Dario GIORGINI	Technicien supérieur de laboratoire	12	0,25
Eva HONG	Technicien supérieur de laboratoire	12	1,00
Aude TERRADE	Technicien supérieur de laboratoire (CDD jusqu'au 20/12/2013) puis CDI.	12	1,00
Christine FANAUD	Secrétaire de direction CDD jusqu'au 02/10/2013. Arrivée d'Anne FRANCES-PARIS en Janvier 2014	10	0,25
Labo PREPA	Aide de laboratoire	12	0,5



o **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/ANSM, 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.

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 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.

Projet ISO 15189 du LREMS de l'Institut Pasteur :

➤ **Bilan des actions réalisées en 2013 :**

Paris/Lyon :

- Groupe de Travail Technique pour les validations de méthode (biologie moléculaire et sérologie)
- Formations : WebCampus, Manuel Qualité LREMS et Kalilab
- Audits internes techniques ISO 15189 pour les sites concernés par l'audit ISO 15189 (CIBU, CNR Leptospirose, CNR coqueluche et autres bordetelloses, CNR Corynebactéries du complexe *Diphtheriae*, CNR Virus *Influenzae* et CNR Rage)
- Revue de direction LREMS
- Inclusion de la vague 2 (CNR Hantavirus, CNR FHV, CNR *Listeria* et **CNR Méningocoques**) dans la démarche d'accréditation ISO 15189

Guyane :

- Dépôt de la demande d'accréditation au COFRAC
- Organisation en multi-site (4 LRE et LABM)
- Missions d'accompagnement sur site (service QEDD et prestataire)
- Audits qualité internes ISO 15189 (technique et organisation)
- Définition des besoins pour la gestion des équipements et des paramètres environnementaux critiques

▪ **Evènements d'importance 2014 :**

Paris :

- Accréditation ISO 15189 du LREMS (CIBU, CNR Leptospirose, CNR coqueluche et autres bordetelloses, CNR Corynebactéries du complexe *Diphtheriae*, CNR Virus *Influenzae* et CNR Rage) par le COFRAC

Guyane :

- Audit initial d'accréditation ISO 15189 du Laboratoire associé au CNR des Arbovirus

➤ **Perspectives 2014 :**

- i. Audits internes qualité et technique ISO 15189 : Mars 2014
- ii. Revue de direction LREMS : 8 Avril 2014
- iii. Poursuite du groupe de travail technique pour les validations de méthode : Juin et octobre 2014
- iv. Finalisation dossiers de validation de méthode (1^{ère} et 2^{ème} vagues) : Juin 2014
- v. Audit de suivi ISO 15189 avec extension du périmètre (nouvelles techniques et nouveaux sites) : Novembre/décembre 2014

Locaux et équipements

Le CRN des méningocoques est hébergé dans l'Unité: 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 M². 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.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

Analyses effectuées par le CNR

Techniques	Type	Cadre et délais après réception de la souche/prélèvement
Identification bactériologique	identification	1-3 j selon la qualité du matériel reçu
Sérogroupage pour l'ensemble des 12 sérogroupes	typage phénotypique	1-2j. 2h par génogroupage si la souche n'est pas sérogroupée 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	1 à 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. 1-2 jours en cas d'alerte
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. 1-2 jours en cas d'alerte
Tests bactéricide	exploration immunologique	Cas d'échec vaccinal, étude d'immunogénicité
MATS	Typage phénotypique et moléculaire	Exploration de la couverture des souches par le vaccin Bexsero®

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* et *fetA* complète ce génotypage.

Les résistances à la rifampicine et à la ciprofloxacine sont confirmées par séquençage des gènes *rpoB* et *gyrA* respectivement.

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 2013 est de 27480 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. En 2013, le CNRM a transféré 43 souches à une collection Européenne (la collection de l'IBDlabNet). 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.