

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

**ANNEE : 2017**

**THESE 2017/TOU3/2003**

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement  
par

**BOIJOUT HUGO**

**INFECTIONS INVASIVES A MENINGOCOQUES DU SEROGROUPE B EN NOUVELLE-  
CALEDONIE  
ETUDE PRELIMINAIRE A L'INSTAURATION DU VACCIN BEXSERO**

Date de soutenance  
3 février 2017

Directeur de thèse : Dr Julien COLOT

**JURY**

Président : Madame le Professeur Cécile BEBEAR  
1er assesseur : Madame le Professeur Véronique DUBOIS  
2ème assesseur : Monsieur le Professeur Charles CAZANAVE  
3ème assesseur : Monsieur le Professeur Philippe LEHOURS

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

**ANNEE : 2017**

**THESE 2017/TOU3/2003**

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement  
par

**BOIJOUT HUGO**

**INFECTIONS INVASIVES A MENINGOCOQUES DU SEROGROUPE B EN NOUVELLE-  
CALEDONIE  
ETUDE PRELIMINAIRE A L'INSTAURATION DU VACCIN BEXSERO**

Date de soutenance  
3 février 2017

Directeur de thèse : Dr Julien COLOT

**JURY**

Président : Madame le Professeur Cécile BEBEAR  
1er assesseur : Madame le Professeur Véronique DUBOIS  
2ème assesseur : Monsieur le Professeur Charles CAZANAVE  
3ème assesseur : Monsieur le Professeur Philippe LEHOURS

**PERSONNEL ENSEIGNANT**  
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier  
au 1<sup>er</sup> octobre 2015

**Professeurs Émérites**

M. BASTIDE R	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G	Physiologie
M. CHAVANT L	Mycologie
Mme FOURASTÉ I	Pharmacognosie
M. MOULIS C	Pharmacognosie
M. ROUGE P	Biologie Cellulaire

**Professeurs des Universités**

**Hospitalo-Universitaires**

M. CHATELUT E	Pharmacologie
M. FAVRE G	Biochimie
M. HOUIN G	Pharmacologie
M. PARINI A	Physiologie
M. PASQUIER C (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A	Pharmacologie
Mme SALLERIN B	Pharmacie Clinique
M. SIÉ P	Hématologie
M. VALENTIN A	Parasitologie

**Universitaires**

Mme BARRE A	Biologie
Mme BAZIARD G	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S	Mathématiques – Biostat.
M. BENOIST H	Immunologie
Mme BERNARDES-GÉNISSON V	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B	Biochimie
M. CUSSAC D (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S	Biochimie
M. FABRE N	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E	Pharmacologie
Mme MULLER-STAUMONT C	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F	Chimie analytique
M. SALLES B	Toxicologie
M. SÉGUI B	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P	Chimie analytique
Mme TABOULET F	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P	Chimie Thérapeutique

## Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P	Pharmacie Clinique	Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme GANDIA-MAILLY P (*)	Pharmacologie	Mme AUTHIER H	Parasitologie
Mme JUILLARD-CONDAT B	Droit Pharmaceutique	M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F	Pharmacie Clinique	Mme BON C	Biophysique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S	Biochimie	M. BOUJILA J (*)	Chimie analytique
Mme THOMAS F	Pharmacologie	Mme BOUTET E	Toxicologie - Sémiologie
		M. BROUILLET F	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C	Physiologie
		Mme CAZALBOU S (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S	Bactériologie - Virologie
		Mme COSTE A (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N	Biochimie
		Mme DERAÈVE C	Chimie Thérapeutique
		Mme ÉCHINARD-DOUIN V	Physiologie
		Mme EL GARAH F	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A	Toxicologie
		Mme GIROD-FULLANA S (*)	Pharmacie Galénique
		Mme HALOVA-LAJOIE B	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I	Biochimie
		Mme LEFEVRE L	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A	Biochimie
		M. MARTI G	Pharmacognosie
		Mme MIREY G (*)	Toxicologie
		Mme MONTFERRAN S	Biochimie
		M. Olichon A	Biochimie
		M. PERE D	Pharmacognosie
		Mme PORTHE G	Immunologie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K (*)	Chimie Analytique
		M. SAINTE-MARIE Y	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D	Hématologie
		Mme TOURRETTE A	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M	Mathématiques

(\*) titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

## Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires	
Mme COOL C	Physiologie
Mme FONTAN C	Biophysique
Mme KELLER L	Biochimie
Mme PALUDETTO M.N (**)	Chimie thérapeutique
M. PÉRES M.	Immunologie
Mme ROUCH L	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique

(\*\*) Nomination au 1<sup>er</sup> novembre 2015

## REMERCIEMENTS

Aux membres du jury :

Mme le Professeur Cécile Bébéar,

Vous avez été d'une grande disponibilité au cours de mon internat à Bordeaux et vous avez toujours apporté votre soutien lorsqu'il était nécessaire. C'est aujourd'hui un honneur pour moi de vous voir siéger en tant que présidente du jury.

Mme le Professeur Véronique Dubois,

Je vous remercie de votre présence au sein du jury et de l'intérêt immédiat que vous avez porté à mon travail.

Mr le Professeur Charles Cazanave,

Vous avez immédiatement accepté de faire partie de ce jury et je vous en remercie. Votre point de vue clinique sur cette étude apporte un bénéfice indéniable.

Mr le Professeur Philippe Lehours,

Je suis honoré de votre présence pour évaluer mon travail de thèse. Merci d'avoir accepté de siéger parmi le jury.

Mr le Docteur Julien Colot,

Merci d'avoir encadré cette thèse. Malgré l'étendue du travail qui s'est révélée bien plus importante que prévu, tu es toujours resté optimiste et rassurant, et tu as bien fait !

A toute l'équipe de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie :

Julien encore pour avoir encadré ma thèse (et mes débuts au poker). Un grand merci pour la confiance que tu m'as accordée en tant que biologiste, et pour le temps que tu as pu me consacrer malgré la montagne de travail qui te tombe perpétuellement dessus !

Merci Cyrille pour ta disponibilité, tes conseils et ta relecture attentive en un temps record !

Antoine et Marie-Amélie pour les excellents moments passés ensemble, et votre compétence dans vos spécialités respectives. J'aurais aimé avoir le temps d'apprendre plus de choses à vos côtés.

Benjamin qui m'a fait entrevoir entre deux pauses café ses grandes compétences techniques et Julia qui a amplement contribué aux manipulations techniques et sans qui ce travail n'aurait jamais été fini à temps.

Tous les techniciens avec qui j'ai eu le plaisir de travailler, qui réalisent un travail de qualité dans une super ambiance.

Et bien sûr :

A l'ensemble des biologistes qui ont pris le temps d'assurer ma formation, de répondre à mes questions, de répéter quand il le fallait.

A mes parents, soutien de toujours, à qui je dois d'être arrivé jusqu'ici, et à mon petit frère.

A Marie, qui a le mérite indiscutable de m'avoir supporté quand finir cette thèse en temps et en heure s'est rapproché de l'obsession. Merci de ta présence au quotidien, et d'avoir un peu plus les pieds sur terre que moi...

Aux srilankano-colombiens, sportifs de l'extrême (surtout pour lever le coude), piliers inébranlables de ces années d'internat : Barni, Fab et Flo.

A tous ceux qui ont fait de ces 4 années une période intense, sportive, riche en émotions, bref, extraordinaire : Serri, Ludo, Sylvain, Alex, Arnaud, Laurent, Morgane, Sami, Marine(s), Florence, Yannick, JB, Aurélie, France, Pierre... et tous mes anciens co-internes.

Aux copains de la fac, aux anciens montpelliérains : Chloé, Laure, Manu, Miguel l'éternel binôme...

A la formidable équipe toulousaine qui m'a fait entrer de plein pied dans l'internat.

Aux vieux copains de la Réunion.

## Sommaire

<b>ABBREVIATIONS</b> .....	10
<b>INTRODUCTION</b> .....	11
<b>PARTIE I : Généralités</b> .....	12
I. <i>Neisseria meningitidis</i> : caractéristiques microbiologiques et importance en pathologie humaine.....	12
A. Microbiologie.....	12
1) <i>Neisseria meningitidis</i> : hôte, habitat, transmission.....	12
2) Caractères bactériologiques.....	13
3) Caractéristiques structurales et typage des souches de <i>N. meningitidis</i> .....	14
a) Capsule et sérotype.....	14
b) Membrane externe et sérotype.....	15
c) Caractéristiques génétiques et typage moléculaire.....	16
B. Infections Invasives à Méningocoque.....	17
1) Physiopathologie.....	17
a) Souches commensales et souches invasives.....	17
b) Facteurs de risque.....	18
c) Histoire naturelle de l'infection et facteurs de pathogénicité.....	20
2) Aspects cliniques.....	25
3) Diagnostic biologique.....	26
4) Antibiogramme et résistance aux antibiotiques.....	28
5) Prise en charge thérapeutique.....	29
6) Prophylaxie.....	30
C. Epidémiologie.....	31
1) Situation au niveau mondial.....	31
2) Epidémiologie locale en Nouvelle-Calédonie.....	34
a) Particularités liées à la population.....	34
b) Répartition des sérogroupes.....	35
II. Stratégies vaccinales.....	36
A. Vaccins anti-méningococciques polysaccharidiques.....	36
B. Particularité du sérotype B et vaccins existants.....	37
C. Vaccinologie inverse et nouveaux vaccins anti-méningococciques.....	38
1) Principe de la vaccinologie inverse.....	38
2) Composition et développement du vaccin Bexsero®.....	39
D. Données actuelles sur l'efficacité du vaccin Bexsero®.....	42

III.	Nouvelle-Calédonie et système de soins.....	45
	A. Situation géographique, démographique, sanitaire.....	45
	B. Organisation du système de soins.....	46
	C. Aspects administratifs de la prise en charge des IMM.....	49
	1) Déclaration des cas.....	49
	2) Recommandations vaccinales françaises, spécificités de la Nouvelle-Calédonie.....	50

**PARTIE II : Description de l'étude.....52**

I.	Rationnel du projet et élaboration du protocole.....	52
II.	Recensement et récupération des souches correspondant aux critères de l'étude.....	53
III.	Protocole.....	54
	A. Extraction de l'ADN.....	54
	B. Multilocus Sequence Typing (MLST) .....	55
	1) Amplification des gènes d'intérêt.....	55
	2) Séquençage.....	57
	C. Typage des gènes codant pour les antigènes vaccinaux.....	58
	1) Amplification des gènes d'intérêt.....	58
	2) Séquençage.....	60
IV.	Base de données Pubmlst.org.....	60

**PARTIE III : Résultats.....62**

I.	Caractérisation génétique par MLST.....	62
II.	Diversité allélique des gènes codant pour les antigènes vaccinaux.....	64
	A. Allèles obtenus pour le gène <i>fHbp</i> .....	64
	B. Allèles obtenus pour le gène <i>nhba</i> .....	68
	C. Allèles obtenus pour le gène <i>nadA</i> .....	71
	D. Allèles obtenus pour le gène <i>porA</i> .....	73
III.	Analyse phylogénétique par combinaison du Séquence-Type et du profil antigénique.....	73

IV. Efficacité estimée du vaccin Bexsero® .....	77
<b>PARTIE IV : Discussion</b> .....	80
I. Diversité génétique des méningocoques du sérogroupe B en Nouvelle-Calédonie et intégration dans le contexte mondial.....	80
II. Données préliminaires à l’instauration du vaccin Bexsero® en Nouvelle-Calédonie.....	82
A. Prédominance du cc32 et impact sur l’efficacité du vaccin.....	82
B. Portée de l’estimation d’efficacité du vaccin avant détermination du taux d’expression des antigènes.....	83
III. Limites de l’étude et perspectives.....	85
<b>CONCLUSION</b> .....	88
<b>ANNEXES</b> .....	89
<b>REFERENCES</b> .....	91
<b>ABSTRACT</b> .....	99

## **ABBREVIATIONS**

Ac : Anticorps

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

cc : complexe clonal

DASS-NC : Direction des Affaires Sanitaires et Sociales de Nouvelle-Calédonie

fHBP : factor H-Binding Protein

HCSP : Haut Conseil de Santé Publique

hSBA : human Serum Bactericidal Antibody assay

IIM : Infection Invasive à Méningocoque

IPNC : Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

MenB : Méningocoque du sérogroupe B

MenC : Méningocoque du sérogroupe C

MATS : Meningococcal Antigen Typing System

MLST : MultiLocus Sequence Typing

NadA : Neisserial adhesin A

NC : Nouvelle-Calédonie

NHBA : Neisseria Heparin Binding Antigen

PCR : Polymerase Chain Reaction

PorA : Porine A

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

ST : Séquence-Type

## INTRODUCTION

*Neisseria meningitidis* est un germe ambivalent. S'il est fréquemment présent à l'état commensal dans le rhinopharynx humain, ce germe est surtout connu et redouté pour la pathogénicité extrême qu'il développe lorsqu'il se révèle invasif. Le typage des souches impliquées dans les infections invasives à méningocoques (IIM) a longtemps fait appel aux caractères phénotypiques seuls. La caractérisation des isolats reposait sur des techniques immunologiques permettant d'associer des profils à des zones géographiques et de décrire des épidémies locales. Le Typage de Séquence MultiLocus (MLST), caractérisation génétique par séquençage de 7 gènes de ménage conservés dans l'espèce, est venu s'ajouter à ces techniques et a considérablement affiné les connaissances sur l'épidémiologie des IIM. Le typage par MLST a fait apparaître 2 types de lignées de méningocoques : la majorité des séquence-types, regroupés en complexes clonaux, est rarement incriminée dans les IIM, et une minorité de lignées dites hyperinvasives est responsable de la majeure partie des cas quelle que soit la région du monde.

Le problème de santé publique ubiquitaire que représentent les IIM a engendré la mise au point de vaccins ciblant les antigènes capsulaires du germe. Bien que cette stratégie se soit révélée efficace pour les sérogroupes A, C, W et Y, elle n'est pas applicable au séro groupe B qui est devenu le principal agent d'IIM dans les pays développés. Le vaccin Bexsero® a été développé selon une stratégie innovante, pour répondre à ce besoin de couverture du séro groupe B. Il intègre 4 protéines membranaires du méningocoque : fHBP, NHBA, NadA et PorA.

La Nouvelle-Calédonie, archipel français de l'océan Pacifique, connaît une incidence en IIM 3 fois supérieure à celle de la France métropolitaine. Ce taux serait lié à une prévalence élevée de déficits en complément, notamment parmi les individus appartenant à la population mélanésienne. La mise sur le marché du vaccin Bexsero®, dans un contexte de forte prédominance du séro groupe B dans les IIM en Nouvelle-Calédonie, est susceptible d'apporter un réel bénéfice à cette population particulièrement touchée par ces infections.

Notre étude s'est attachée à décrire les lignées de méningocoques du séro groupe B circulant en Nouvelle-Calédonie et leur profil génétique pour les 4 gènes codant pour les antigènes ciblés par le vaccin Bexsero®.

Le typage des gènes codant pour les peptides fHBP, NHBA, NadA et PorA VR2 nous donne une estimation de la correspondance entre les antigènes exhibés par les souches néo-calédoniennes de MenB et les antigènes inoculés lors de la vaccination. Ces protéines membranaires étant hypervariables, le typage de leurs gènes est une 1<sup>re</sup> étape indispensable pour évaluer la capacité potentielle des anticorps vaccinaux à se lier aux antigènes des souches invasives. Si les antigènes identifiés sont structurellement proches de ceux composant le vaccin, leur niveau d'expression sera secondairement évalué par un test de type ELISA (MATS).

## PARTIE I : Généralités

### I- *Neisseria meningitidis* : caractéristiques microbiologiques et importance en pathologie humaine

#### A. Microbiologie

##### 1) *Neisseria meningitidis* : hôte, habitat, transmission

Les bactéries du genre *Neisseria*, famille des *Neisseriaceae*, sont des cocci immobiles aérobies stricts. A la coloration de Gram, ils apparaissent sous forme de diplocoques à Gram négatif, avec un aspect typique en « grains de café ». Ce genre regroupe des bactéries majoritairement commensales du rhinopharynx humain. *Neisseria lactamica*, *N. polysaccharea*, *N. flavescens*, *N. subflava* sont des exemples de *Neisseriaceae* classiquement isolés parmi la flore normale des voies respiratoires supérieures, sans rôle pathogène établi<sup>1</sup>.

Deux espèces possèdent néanmoins un pouvoir pathogène reconnu et largement décrit : *Neisseria gonorrhoeae*, germe strictement pathogène, et *Neisseria meningitidis* qui peut être retrouvé chez des porteurs sains<sup>1</sup>. Ces deux bactéries sont retrouvées exclusivement chez l'homme et partagent plus de 80% de leur génome<sup>2</sup>.

*N. meningitidis* est une espèce commensale transitoire du rhinopharynx humain. L'homme est le seul hôte de ce germe fragile qui ne survit pas dans le milieu extérieur. A un instant donné, 10% des individus de la population générale sont porteurs sains de ce germe<sup>3,4</sup>. Son taux de portage augmente progressivement à partir de la naissance jusqu'à la fin d'adolescence où il peut atteindre 35%<sup>5</sup>. La durée moyenne de portage est difficile à estimer, variant selon les études de 4 à 10 mois<sup>4</sup>. L'espèce non pathogène la plus proche est *N. lactamica*, que l'on retrouve essentiellement chez l'enfant. Cette colonisation infantile revêt une importance particulière car on sait à présent que le portage ou l'inoculation volontaire de *N. lactamica* permettent d'augmenter la protection immunitaire envers *N. meningitidis*<sup>6</sup>. Le fait que *N. meningitidis* supplante progressivement *N. lactamica* dans la flore nasopharyngée au cours de l'adolescence pourrait être expliqué par la présence d'un îlot génomique retrouvé exclusivement chez *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* (absent chez les autres *Neisseria*), conférant la propriété d'utiliser l'acide propionique comme substrat énergétique. Cette molécule est en effet un des métabolites terminaux des germes anaérobies, tels *Porphyromonas*, dont le taux de colonisation oro-pharyngée augmente chez l'adulte<sup>5</sup>.

La transmission du méningocoque se fait exclusivement par contact rapproché, lors d'émission de gouttelettes de sécrétions naso-pharyngées par un individu porteur (gouttelettes de Pflugge). On estime qu'un contact d'au moins une heure à moins d'un

mètre de distance est nécessaire pour une transmission efficace<sup>7</sup>. La transmission se fait également par la salive lors d'un contact de bouche à bouche<sup>8</sup>.

Des facteurs socio-économiques tels que la pauvreté et la surpopulation, favorisant la promiscuité, augmentent le taux de portage asymptomatique de méningocoque, alors que la saison ou l'immunité de groupe ne semble pas jouer de rôle<sup>9</sup>.

## 2) Caractères bactériologiques

Il s'agit d'une bactérie sensible à la dessiccation et aux variations de température, qui entraînent fréquemment son autolyse. On recommande d'ensemencer les prélèvements rapidement sur des géloses à température ambiante voire réchauffées à 37°C.

Des conditions spécifiques améliorent l'efficacité de sa culture : 5-10% de CO<sub>2</sub>, milieu enrichi type chocolat (sang cuit additionné de supplément vitaminique), atmosphère humide et température de 37°C. *N. meningitidis* peut néanmoins se développer en atmosphère normale sur gélose au sang ou gélose ordinaire mais la culture est plus laborieuse.

Des milieux sélectifs associant antibiotiques et antifongiques facilitent son isolement : gélose VCAT (vancomycine, colistine, amphotéricine B, triméthoprime) ou VCN (vancomycine, colistine, nystatine). Ces milieux ont plus d'utilité pour l'isolement de *N. gonorrhoeae* qu'on trouve fréquemment au sein de prélèvements polymicrobiens. La croissance sur ces milieux de culture est également un critère d'identification car *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* sont les seuls représentants du genre *Neisseria* à être naturellement résistants à la colistine. Les colonies de *N. meningitidis* apparaissent généralement en 24h. Elles sont non hémolytiques, grisâtres, légèrement muqueuses, de taille moyenne (1 à 2mm en 24h) et s'étendent dans les jours suivants.

L'identification de *N. meningitidis* au laboratoire a longtemps reposé sur l'examen direct du prélèvement et sur les caractères biochimiques du germe après culture. Ces caractères spécifiques sont aisément identifiés en galerie (API NH, Biomérieux) ou en systèmes automatisés (Vitek, Biomérieux ou Phoenix, BD).

Toutes les bactéries du genre *Neisseria* produisent une cytochrome-oxydase et une catalase. Les caractères biochimiques permettant de les différencier sont détaillés dans le tableau 1.

Espèces	pigment jaune en culture	acidification des sucres					polysaccharides à partir du saccharose	NO3 réd.	NO2 réd.	γ-GT
		glucose	maltose	lactose	saccharose	Fructose				
<i>N. meningitidis</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>N. gonorrhoeae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>N. polysaccharea</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
<i>N. sicca</i>	-/+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>N. subflava</i>	-/+	+	+	-	V	V	V	-	+	+
<i>N. mucosa</i>	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>N. cinerea</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>N. flavescens</i>	+++	-	-	-	-	-	+	-	+	-/+

Tableau 1 : Caractères biochimiques principaux permettant l'identification de *N. meningitidis* au sein du genre *Neisseria*. + : caractère positif, - : caractère négatif, V : expression variable selon les isolats<sup>1</sup>.

L'apparition de techniques d'identification par spectrométrie de masse a totalement changé l'approche diagnostique au laboratoire, laissant généralement en désuétude les caractères biochimiques bactériens. Une fois la souche obtenue en culture, une identification fiable, reposant sur le spectre de masse de l'ensemble des protéines produites par la bactérie, est obtenue en quelques minutes.

La proximité génétique de *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* se traduit par un spectre de masse extrêmement proche, engendrant parfois des difficultés pour différencier ces deux germes. Le type de prélèvement dans lequel le germe a été isolé peut donner une orientation vers l'une ou l'autre de ces deux espèces. La différenciation se fera avec certitude en se basant sur la capacité du méningocoque à cultiver sur gélose au sang, à hydrolyser le maltose et à exprimer une gamma-glutamyltransférase (galerie API NH).

### 3) Caractéristiques structurales et typage des souches de *N. meningitidis*

#### a) Capsule et séro groupe

Ce germe peut être encapsulé ou non, avec une quasi exclusivité de souches encapsulées retrouvées dans les cas d'infection. L'identification des polysides capsulaires du méningocoque permet de déterminer son séro groupe. Douze séro groupes sont décrits (A, B, C, E [anciennement 29E], H, I, K, L, W [anciennement W135], X, Y, Z) mais seuls les séro groupes A, B, C, Y, W et X sont impliqués dans des infections<sup>10,11</sup>. Les autres séro groupes, voire des souches non capsulées, peuvent dans de très rares cas donner des infections chez l'immunodéprimé (déficits en complément).

Les séro groupes B et C ont une capsule composée de chaînes d'acide sialique (liés en α2-8 et α2-9 respectivement), les capsules des séro groupes Y et W alternent D-glucose, D-galactose

et acide sialique, la capsule du sérotype A est composée de ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)-N-acetyl-mannosamine-1-phosphate.

Le sérotype est généralement déterminé grâce à des kits commercialisés, à partir du prélèvement ou de colonies obtenues en culture mis en contact de sérums agglutinants.

Le phénomène de « capsule switching » a été décrit pour *N. meningitidis*, permettant au germe de changer de sérotype et d'échapper ainsi à l'immunité conférée par certains vaccins. Ceci est possible grâce à des transferts horizontaux et des recombinaisons touchant les gènes impliqués dans la biosynthèse des polysaccharides de la capsule<sup>12</sup>.

#### b) Membrane externe et sérotype

Comme toutes les bactéries à Gram négatif, *N. meningitidis* possède une membrane externe recouvrant sa paroi, dans laquelle sont insérées diverses protéines structurales et fonctionnelles. Deux porines majeures sont responsables du passage de nutriments hydrophiles à travers la membrane externe : la porine A (PorA) et la porine B (PorB).

Une porine apparentée à PorB est présente chez l'ensemble du genre *Neisseria*, alors que PorA n'est retrouvée que chez le méningocoque, ce qui pourrait indiquer qu'elle joue un rôle dans le caractère invasif de ce germe. Ces 2 porines ont une structure intra-membranaire en feuillet  $\beta$  relativement conservée dans l'espèce, ainsi que des boucles exposées à la surface de la bactérie qui concentrent les régions variables. Au sein de PorA, la majorité des variations sont présentes sur les boucles 1 et 4, appelées VR1 et VR2 (Variable Region). Pour PorB, 6 des 8 boucles présentent des régions variables<sup>13</sup>.

Le sérotype et le séro-sous-type sont définis par le typage immunologique des régions variables de PorB et PorA respectivement.

Le sérotypage est réalisé par technique immunoenzymatique à l'aide d'un panel d'anticorps (Ac) reconnaissant des sérotypes et sous-types définis<sup>14</sup>. Par exemple, un méningocoque du sérotype B, sérotype 15 et sous-type P1.3 sera dénommé en abrégé B : 15 : P1.3.

Actuellement, le génotypage des régions variables de ces porines a supplanté les techniques de sérotypage pour la caractérisation des isolats. Pour PorA, VR1 et VR2 sont caractérisés au niveau moléculaire. Une porine A porteuse de VR1 : 7-2 et VR2 : 4 sera dénommée P1.7-2,4.

Le lipopolysaccharide de la membrane externe de *N. meningitidis* diffère de celui généralement rencontré chez les bactéries à Gram négatif par l'absence d'antigène O (répétition de sous-unités oligosaccharidiques). On parle donc de lipo-oligosaccharide (LOS) pour cette espèce bactérienne<sup>15</sup>.

Douze types différents de LOS sont décrits pour *N. meningitidis*. Ils déterminent l'immunotype de la souche. Ces immunotypes sont associés à différents niveaux de

résistance à l'activité bactéricide du sérum humain, ce qui reflète leur importance quant à l'immunogénicité et la pathogénicité du germe<sup>16</sup>.

### c) Génome et typage moléculaire

La technique MLST (Multi Locus Sequence Typing) est une méthode de caractérisation génomique des souches au sein d'une espèce bactérienne. Elle consiste à séquencer les régions internes de 7 gènes de ménage, constamment présents dans le génome de l'espèce étudiée car impliqués dans des voies métaboliques vitales du germe. L'assemblage des allèles identifiés pour ces 7 gènes forme un « code-barre » génétique de la souche étudiée<sup>17</sup>. Ce procédé tend à remplacer les autres systèmes de typage (sérotypage, sérogroupage, immunotypage) pour le suivi épidémiologique de la dissémination des clones d'une espèce et l'identification des souches responsables d'épidémies<sup>18</sup>.

Concernant *N. meningitidis*, 7 gènes sont ciblés : *abcZ* (transporteur ABC), *adk* (kinase adénylate), *aroE* (shikimate déshydrogénase), *fumC* (fumarate hydratase), *gdh* (glucose-6-phosphate déshydrogénase), *pdhC* (sous-unité de la pyruvate déshydrogénase) et *pgm* (phosphoglucomutase). Ces gènes codent pour des enzymes impliquées dans des voies métaboliques majeures de la bactérie, sauf *abcZ* qui code pour un transporteur ABC. Ils sont donc constamment présents et non soumis à la pression de sélection<sup>19</sup>. La combinaison des allèles présents sur ces sept loci permet d'obtenir un profil allélique de la souche qu'on nomme séquence-type (ST).

Des complexes clonaux (cc) sont individualisés autour d'un profil allélique central (ST central). Toutes les souches qui partagent au moins 4 allèles communs sur 7 avec le ST central sont intégrées au complexe clonal (à moins d'avoir plus d'allèles en commun avec le ST central d'un autre complexe clonal). Par exemple, le ST-32 est le ST central du cc32, et tous les ST possédant le même allèle pour 4 des 7 gènes typés en MLST seront intégrés au cc32.

Il est important de noter que ce système de typage est indépendant des autres (sérogroupage et sérotypage). Bien que les lignées du même ST soient génétiquement apparentées, on trouve au sein du même complexe clonal et parfois du même ST des souches de sérotype et de séro groupe différents. Ainsi, le complexe clonal cc 41/44 est majoritairement composé de souches du séro groupe B, mais il en existe aussi du séro groupe C.

Un grand nombre de ST de *N. meningitidis* ont été individualisés, indiquant une variabilité génétique élevée. En effet, le transfert horizontal de gènes est un phénomène fréquent dans le genre *Neisseria*. Ainsi, *N. meningitidis* est une bactérie naturellement compétente, capable d'incorporer de l'ADN de germes apparentés présent dans son environnement<sup>20</sup>.

C'est aussi intrinsèquement une bactérie hautement variable, capable de transformation et de recombinaison intragénomique aboutissant entre autres à de fréquentes variations structurales de surface. De nombreuses souches génétiquement hétérogènes apparaissent constamment au sein de l'espèce *N. meningitidis*, ce qui crée un pool génétique très diversifié.

Comme décrit dans la partie suivante, cette plasticité génomique est considérée comme le support majeur de l'hypervirulence de certaines lignées de méningocoque.

## B. Infections Invasives à Méningocoque (IIM)

### 1) Physiopathologie

#### a) Souches commensales et souches invasives

Le méningocoque est une bactérie totalement inféodée et adaptée à l'être humain, chez qui on le retrouve fréquemment dans le nasopharynx sans aucune manifestation pathologique. Par des mécanismes partiellement élucidés, certaines souches vont traverser la barrière muqueuse et pénétrer dans la circulation sanguine, ouvrant la voie aux IIM.

De nombreuses études ont tenté de mettre en évidence des gènes de virulence propres aux souches isolées dans le cadre d'une IIM. Il apparaît clairement que les gènes de virulence identifiés comme responsables de la pathogénicité de certaines souches sont également retrouvés chez des souches non pathogènes, et même fréquemment dans le génome d'autres espèces commensales de *Neisseria*. A ce jour, aucune étude n'a pu établir avec certitude l'existence de gènes de virulence présents exclusivement chez les germes impliqués dans les IIM<sup>3,21</sup>.

Le sérotypage puis les techniques de biologie moléculaire (typage des souches par MLST) ont pourtant montré qu'il existe bien des lignées spécifiques de *N. meningitidis* à caractère invasif, dont le portage évolue fréquemment vers la dissémination et l'infection, et des souches non pathogènes, dont le portage restera asymptomatique. Un groupe de complexes clonaux, appelé lignées hyperinvasives, est responsable de la majorité des IIM dans le monde. Ces lignées sont significativement surreprésentées dans les échantillons pathologiques (hémocultures et LCR), par rapport aux souches de portage (prélèvement de nasopharynx). Au contraire, les méningocoques isolés chez des porteurs asymptomatiques présentent une diversité génétique beaucoup plus élevée, certains complexes clonaux n'étant jamais retrouvés dans des isolats pathologiques. Même au sein des complexes clonaux dits hyperinvasifs, la pathogénicité des génotypes varie ; au sein de cc41/44, les

méningocoques ST-41 sont plus souvent associés aux IIM, alors que ST-44 est plus prédictif d'un portage.<sup>21</sup>

Le génome de *N. meningitidis* est hautement conservé entre les différentes lignées de l'espèce. Moins de 0,1% du génome serait sujet à des variations<sup>21</sup>. A défaut de posséder des gènes de virulence particuliers, il semble que les souches hyperinvasives se démarquent par une adaptation de leur métabolisme leur permettant de développer ce caractère invasif, grâce à une meilleure utilisation des ressources du milieu. Ces souches posséderaient une meilleure résistance au stress oxydatif, une multiplication plus efficace en conditions d'infection<sup>3</sup>.

*N. meningitidis* possède une forte capacité d'expression génique différentielle. Les mécanismes de régulation épigénétique sont une explication de plus en plus étoffée concernant les différents phénotypes exprimés au sein de l'espèce, sans que le génome ne présente de variations majeures<sup>21</sup>. Les phénomènes de variation de phase (systèmes permettant l'activation/inactivation de l'expression de gènes) sont décrits chez *N. meningitidis* selon plusieurs mécanismes : insertion réversible d'éléments génétiques mobiles, changement du cadre de lecture, *slipped strand mispairing* (mésappariement par décalage d'un des 2 brins d'ADN). Ils influent notamment, selon un mode « ON/OFF », sur l'expression d'ADN méthyl transférases, impliquées dans la régulation épigénétique. Ces enzymes modifient l'expression de gènes codant pour des protéines de la membrane externe, des protéines de réponse au stress et d'autres composants métaboliques<sup>22</sup>. Ils permettent par exemple l'expression simultanée chez un même méningocoque de plusieurs types de LOS différents, par modulation des gènes liés à sa biosynthèse<sup>10</sup>, l'exposition maximale d'adhésines en phase d'invasion ou leur dissimulation vis-à-vis du système immunitaire dans le sang.

L'expression de la pathogénicité du germe dépend de la souche en cause mais aussi de certaines conditions liées au milieu et à l'hôte. Ce caractère invasif est considéré comme une impasse évolutive chez un germe parfaitement adapté au nasopharynx de l'homme, aisément transmissible, qui entraîne rapidement la mort de son hôte sans transmission possible lorsqu'il se révèle hypervirulent<sup>23</sup>.

## b) Facteurs de risque

### ➤ Infections respiratoires hautes :

Les infections des voies aériennes supérieures favorisent le passage du méningocoque de l'état de portage vers la dissémination. L'association entre infection respiratoire aiguë et maladie méningococcique a été mise en évidence sous des climats aussi bien tempérés que tropicaux. Lors d'une épidémie de méningites à méningocoque du sérotype A étudiée au

Tchad en 1988, les patients atteints de méningite avaient 23 fois plus de chances que les témoins d'être porteurs dans leur rhinopharynx de germes pathogènes respiratoires, dont adénovirus, virus parainfluenza, rhinovirus et virus respiratoire syncytial<sup>9</sup>. Les infections respiratoires à mycoplasmes sont aussi décrites comme facteur favorisant<sup>7</sup>.

➤ Déficit immunitaire :

L'immunité humorale est un facteur essentiel dans la prévention de la maladie méningococcique. On constate que l'incidence est faible dans les 6 premiers mois de vie grâce à la persistance d'Ac maternels puis augmente fortement durant la petite enfance en raison de l'immaturation du système immunitaire.

Dans le cas des souches encapsulées, la multiplication des portages transitoires entraîne l'immunisation contre les souches du même sérotype. Les souches commensales non virulentes permettent l'immunisation progressive contre diverses lignées de méningocoques invasifs génétiquement proches.

Le déclin de l'immunité de groupe vis-à-vis d'une souche particulière dans une population peut être nécessaire pour que survienne une épidémie. Ainsi, les populations sont plus fortement immunisées contre le type de souches associé à leur zone géographique, et plus sensibles aux souches invasives importées, comme l'a montré l'apparition de cas d'IIM chez les pèlerins de La Mecque et dans leur entourage à leur retour<sup>24</sup>.

Les facteurs génétiques de l'immunité jouent un rôle fondamental dans les IIM. Ils influencent la susceptibilité d'un sujet à développer une infection invasive mais aussi le type de présentation clinique et la sévérité de la pathologie. Les facteurs de risque principaux sont les déficits en properdine et en protéines du complément, les déficits innés ou acquis en immunoglobulines et les polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) affectant certains récepteurs des cellules immunitaires. Des SNP touchant les Toll-Like Receptor TLR2, TLR4 et le récepteur NOD2 augmentent le risque d'IIM. Au contraire, certains SNP portant sur TLR9 se sont révélés protecteurs contre la méningococcémie et confèrent une meilleure réponse immunitaire en cas d'invasion méningée<sup>11</sup>.

L'augmentation du risque d'IIM est variable selon le type de déficit en complément. Les déficits touchant la voie classique sont un facteur de risque modéré et une altération de la voie des lectines ne semble pas modifier l'incidence de la pathologie. Au contraire, les patients avec un déficit en properdine ont un risque d'IIM 250 fois plus élevé que la population générale, avec une évolution sévère. Ceux avec un déficit de la voie finale commune (facteurs C5, C6, C7, C8, C9) présentent des infections invasives plus tardivement dans leur vie, moins sévères mais parfois récurrentes. Les déficits en C3 provoquent aussi une susceptibilité accrue aux IIM<sup>15,25,26</sup>.

En conséquence, ces personnes font l'objet de recommandations de vaccination spécifiques<sup>25</sup>.

➤ Conditions climatiques :

Comme décrit précédemment, les conditions climatiques et la saison ne semblent pas avoir d'influence sur le taux de portage asymptomatique du méningocoque. Néanmoins, le taux d'infections varie, avec un nombre plus élevé d'IIM en hiver et au printemps dans les zones tempérées. En région sub-saharienne, c'est durant la saison sèche, aride et poussiéreuse que surviennent la majorité des infections. Celles-ci ont tendance à disparaître quand vient la saison humide. On suspecte donc que l'irritation des muqueuses naso-pharyngées durant certaines périodes de l'année favorise certainement l'évolution du portage vers l'infection ; l'altération de la muqueuse et l'inhibition de l'immunité de surface facilitent la dissémination du germe par voie hématogène<sup>27</sup>.

Durant l'hiver en zone tempérée, c'est donc la combinaison de la fragilisation des muqueuses et de la recrudescence des infections respiratoires qui serait responsable du pic de fréquence observé.

Selon le même mécanisme, il est établi que l'agression des muqueuses induite par le tabagisme favorise également le risque de passage sanguin du méningocoque depuis le nasopharynx<sup>27</sup>.

c) Histoire naturelle de l'infection et facteurs de pathogénicité

Après acquisition d'une souche de méningocoque hypervirulente et persistance au niveau du nasopharynx, l'histoire naturelle de l'infection invasive fait toujours état d'une dissémination bactériémique. Celle-ci apparaît généralement dans les 10 jours suivant le contage<sup>28</sup>. Elle peut évoluer vers la méningite par passage à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE), ou se limiter à la circulation sanguine avec des méningococcémies entraînant des sepsis sévères. On estime que 63% des bactériémies méningococciques entraînent une méningite, ce qui fait de *N. meningitidis* la bactérie au plus fort taux de passage méningé<sup>13</sup>.

➤ Rôle de la capsule

La proportion écrasante de souches encapsulées dans les IIM atteste du rôle prédominant de la capsule parmi les facteurs de pathogénicité de *N. meningitidis*. Elle permet à la bactérie d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte, notamment par inhibition de la phagocytose, mais aussi de l'opsonisation et de la liaison des Ac, bloquant ainsi l'action

bactéricide du complément. Elle augmente également le taux de transmission d'un individu à l'autre, par résistance accrue à la dessiccation. Les études phylogénétiques montrent que le support génétique de cette capsule aurait été acquis *via Pasteurella multocida* ou *P. haemolytica*, ce qui a représenté une évolution majeure dans la pathogénicité de *N. meningitidis*<sup>27</sup>. Les capsules des méningocoques B, C, W et Y contiennent de l'acide sialique, molécule fréquemment présente à la surface des cellules humaines, agissant donc comme un élément de dissimulation vis-à-vis du système immunitaire. Le motif le plus spécifique de l'hôte est retrouvé chez le sérotype B, dont l'acide sialique lié en  $\alpha$ 2-8 est structurellement identique à un composant de la NCAM humaine (neural cell-adhesion molecule), ce qui explique l'immunogénicité particulièrement faible de la capsule de ce sérotype.

La synthèse de la capsule n'est pas constante. Elle est régulée elle-même par des variations de phase médiées par des phénomènes d'expressions ON/OFF, des *single strand mispairing* et des interruptions de la synthèse d'acide sialique. Ceci permet l'alternance entre exposition complète des adhésines durant la phase d'adhésion et protection immune en conditions inflammatoires<sup>10</sup>.

On notera que les principales bactéries responsables de méningites (*Streptococcus pneumoniae*, *N. meningitidis*, *Escherichia coli* K1, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae* b) ont en commun la production d'une capsule, ce qui illustre son rôle prédominant parmi les facteurs de pathogénicité bactériens.

#### ➤ Colonisation du naso-pharynx et passage de la barrière muqueuse

Les méningocoques inhalés doivent d'abord adhérer à l'épithélium pharyngé pour échapper aux mécanismes de défense innée tel que le drainage par le flux de mucus. Un ensemble d'adhésines concourt à la liaison du méningocoque aux cellules épithéliales puis à son passage à travers la muqueuse. La modulation de l'expression de ces marqueurs par des phénomènes ON/OFF ou de recombinaison est un facteur clé d'échappement au système immunitaire lors de la phase d'invasion.

#### Adhésines majeures :

- Les pili sont des structures présentes chez la plupart des bactéries à Gram négatif et positif. *N. meningitidis* possède un pilus de type 4, d'extension et rétraction rapide, de plusieurs micromètres de long, composé de sous-unités de piline assemblées en structure hélicoïdale. Son extension à

travers la capsule vers son récepteur probable, le CD46, est considérée comme la première interaction avec les cellules épithéliales. Il est responsable de la « twitching mobility » (mobilité convulsive ou saccadée) du méningocoque, élément essentiel pour le passage des couches épithéliales et la formation, de microcolonies<sup>29</sup>.

- Opa et Opc sont 2 protéines de la membrane externe, dont l'expression est sujette aux variations de phase. Opa se lie majoritairement aux protéines de la famille CEACAM (carcinoembryonic antigen-related cell-adhesion molecule). Le niveau d'expression des CEACAM augmente en présence de cytokines pro-inflammatoires, ce qui pourrait faciliter l'invasion du méningocoque dans un contexte d'infection respiratoire haute. Opc se lie à un complexe de vitronectine, fibronectine et un récepteur d'intégrine, mais aussi à HSPG (heparan sulfate proteoglycan)<sup>10,27</sup>.

#### Adhésines mineures :

- NadA se lie aux cellules épithéliales humaines par interaction de protéine à protéine, mais la nature de son récepteur reste inconnue<sup>10</sup>.  
Il est probable que NadA contribue à la virulence bactérienne car elle est exprimée par environ 30 % des isolats pathogènes contre 5% des isolats commensaux. L'expression de cette protéine est également sujette aux variations de phase et augmente en conditions d'infection par levée du système de répression nadR<sup>30</sup>.
- Deux autres protéines, NhhA (Neisseria hia homologue A) et App (adhesion and penetration protein) sont largement exprimées dans les souches virulentes de *N. meningitidis*. NhhA est associée à de faibles niveaux d'adhésion aux cellules épithéliales, à HSPG et à la laminine. App, qui serait sécrétée, favoriserait la colonisation ainsi que la propagation<sup>10</sup>.

Comme pour la capsule, la partie sialylée du LOS et le lacto-N-notretraose (LNnT, composant du LOS de méningocoques virulents) miment des antigènes (Ag) de surface des cellules de l'hôte, diminuant ainsi la réponse immune.

Les variations de phase des gènes codant pour les enzymes impliquées dans l'extension de la chaîne saccharidique du LOS sont responsables d'une variabilité antigénique importante à la surface de la membrane externe. L'expression par une même souche de différents motifs de LOS contribue également à l'échappement au système immunitaire<sup>10</sup>.

Les protéines de liaison à la lactoferrine et à la transferrine permettent la capture de fer, essentiel à la phase de croissance durant la colonisation puis l'invasion.

La liaison des protéines d'opacité (opa et opc) aux CEACAMs, intégrines et HSPG déclenche des mécanismes de signalisation cellulaire aboutissant à l'internalisation du méningocoque par les cellules épithéliales<sup>27</sup>. Le méningocoque peut être retrouvé dans le tissu sous-épithélial chez des individus sains, indiquant que la traversée de l'épithélium n'est pas toujours synonyme d'invasion. Après avoir traversé l'épithélium, *N. meningitidis* peut interagir avec des protéines du milieu extracellulaire comme la fibronectine et la vitronectine. Il peut également repasser dans le nasopharynx pour être transmis à un nouvel hôte.

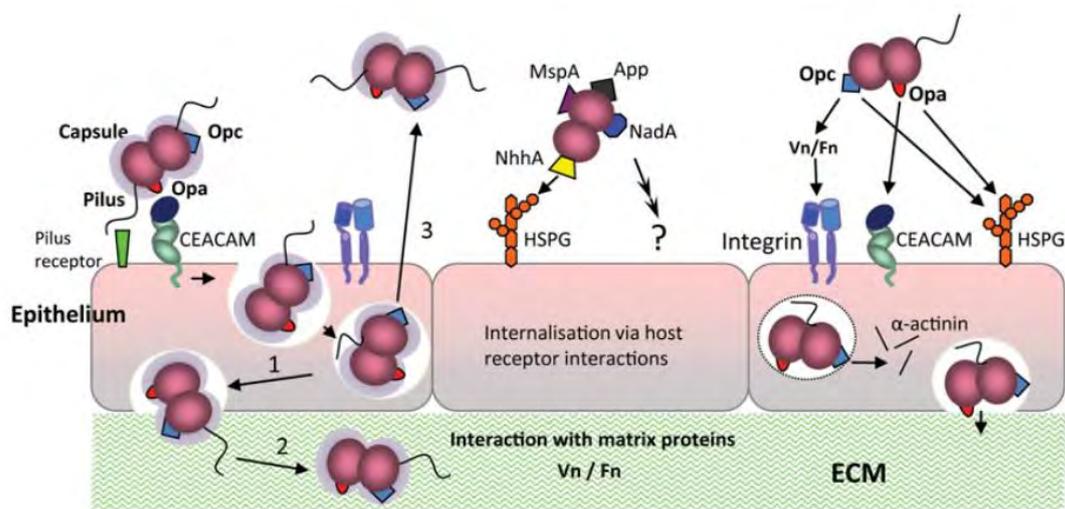


Figure 1 : Description schématique des interactions du méningocoque avec la barrière épithéliale du nasopharynx et du mode de pénétration. D'après Hill et al., 2010. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease<sup>10</sup>.

La porine PorB, en plus de son rôle dans l'homéostasie cellulaire du méningocoque, est également un inhibiteur de l'apoptose *via* la voie intrinsèque de divers types cellulaires. Elle bloquerait la dépolarisation mitochondriale et la libération de facteurs mitochondriaux pro-apoptotiques qui en résulte<sup>31</sup>. Ce mécanisme permet la survie des cellules parasitées au sein desquelles le méningocoque échappe au système immunitaire, ainsi que le maintien des cellules de l'hôte lors du passage du germe à travers les muqueuses ou l'endothélium.

#### ➤ Dissémination sanguine

La production d'endotoxines suite à l'autolyse du germe dans la circulation sanguine est à l'origine d'une forte réponse inflammatoire systémique<sup>4,7</sup>. La principale endotoxine, le lipo-

oligosaccharide, se lie au TLR-4 des monocytes-macrophages et entraîne la libération des médiateurs de l'inflammation. La production des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ...) aboutit à une inflammation aiguë aux niveaux vasculaire et méningé. Les lésions endothéliales et la fuite capillaire qui en résultent provoquent la nécrose des tissus périphériques et une défaillance multi-viscérale. La persistance du germe au niveau sanguin (méningococcémie) évolue vers le choc septique et le collapsus cardio-vasculaire. Les taux circulants de LOS ont été corrélés statistiquement avec la sévérité de la pathologie<sup>32</sup>.

Dans les cas les plus sévères, la production massive d'endotoxines associée à un fort inoculum bactérien entraîne une coagulation intra-vasculaire disséminée responsable du *purpura fulminans*<sup>33</sup>.

*N. meningitidis* exprime des molécules régulatrices du complément pour diminuer l'activité bactéricide du sérum. fHbp (factor H-binding protein) est la principale molécule inhibitrice du complément par sa liaison au facteur H<sup>34</sup>. Cette protéine de la membrane externe du méningocoque permet de recruter le facteur H et ainsi d'augmenter son activité inhibitrice sur le complément. Il a été montré que la délétion du gène *fhbp* chez le méningocoque ou la diminution des taux sériques de facteur H entraînent dans les 2 cas une susceptibilité accrue du méningocoque à l'activité bactéricide du complément<sup>35</sup>. La porine A aurait aussi un rôle inhibiteur par liaison au C4bp. La protéine de membrane externe *opc* se lie à la vitronectine, qui bloque la formation du complexe d'attaque membranaire<sup>15</sup>. NHBA (Neisserial Heparin Binding Antigen) augmente la survie des méningocoques non capsulés au contact du sérum humain, par interaction supposée avec le système du complément<sup>35</sup>. Ces interactions protègent ainsi la bactérie de l'activité du complément au niveau sanguin.

#### ➤ Passage de la barrière hémato-encéphalique

La BHE est composée des plexus choroïdes et de l'endothélium des capillaires cérébraux, dont les cellules sont liées par des jonctions serrées. Le passage du méningocoque à travers cette barrière est d'abord conditionné par l'intensité du flux sanguin et les forces de cisaillement qui doivent être faibles pour qu'il s'arrime aux cellules endothéliales. Le pilus est considéré comme la première structure d'adhésion mise en jeu. D'autres adhésines mentionnées précédemment permettent l'adhésion à l'endothélium, notamment *opc*, dont l'absence *in vitro* bloque le passage du méningocoque à travers la BHE<sup>10</sup>.

Les mécanismes de passage du méningocoque à travers la BHE ne sont que partiellement élucidés. Suite à l'adhésion, on suppose que certaines cellules bactériennes sont endocytées et peuvent ensuite atteindre l'espace sous-arachnoïdien. Une voie d'abord considérée comme alternative et qui apparaît à présent comme prédominante serait le passage paracellulaire, impliquant la rupture des jonctions serrées par l'activation de voies cellulaires médiées par la liaison du pilus.

L'invasion de l'espace méningé provoque une réaction inflammatoire locale, pouvant entraîner une hypertension intracrânienne, une ischémie et des phénomènes de nécrose purulente.

## 2) Aspects cliniques

Les infections invasives à méningocoque se présentent majoritairement sous 2 formes, possiblement associées et pouvant évoluer de l'une vers l'autre : la méningite et la méningococcémie.

D'autres types d'infections existent de façon anecdotique (moins de 5% des IIM) : arthrites, pneumopathies (séro-groupe Y), péricardites... L'évolution est alors chronique et la symptomatologie est intermittente et non spécifique : fièvre, arthralgies, rash ou céphalées.

Dans environ 45% des cas, la dissémination du germe au niveau sanguin peut entraîner le passage méningé sans méningococcémie persistante. Le tableau de méningite typique est d'apparition brutale. Il associe céphalées intenses, vomissements, raideur nucale, fièvre élevée, phono-photophobie. Plus de 95% des patients adultes présentent au moins 2 signes parmi les 4 suivants : céphalées, fièvre, raideur cervicale et troubles de la conscience. Les déficits neurologiques focaux concernent jusqu'à 20% des patients et des lésions cutanées sont présentes dans environ 60% des cas de méningite à méningocoque<sup>36</sup>.

Dans certains cas, l'infection se manifeste d'abord par un syndrome pseudo-grippal (fièvre, arthromyalgies) qui peut être trompeur et évolue en quelques heures vers le tableau de méningite.

Une méningococcémie aiguë isolée est objectivée dans environ 25% des cas d'IIM. Elle se manifeste par de la fièvre, des frissons et des arthromyalgies. Un rash purpurique ou pétéchial d'origine vasculaire est présent dans 30 à 80% des cas selon les séries<sup>7,36</sup>. Le purpura peut rester localisé, notamment aux membres, ou devenir extensif.

Le *purpura fulminans* est la présentation la plus redoutée de l'IIM. Il se traduit par un choc septique avec coagulation intravasculaire disséminée et thrombose dermique extensive provoquant une nécrose cutanée<sup>33</sup>.

L'association d'une méningite et d'une méningococcémie représente environ 30% des cas<sup>7,36</sup>.

Les signes cliniques sont moins typiques chez le nourrisson, ce qui rend parfois le diagnostic difficile. Irritabilité et léthargie sont des signes fréquents alors que la raideur nucale est rarement observée avant 2 ans. Les signes neurologiques (troubles de la conscience, crise convulsive) peuvent inaugurer les manifestations cliniques. L'évolution est plus rapide et le

choc septique plus fréquent, avec une défaillance multi-viscérale et le décès survenant dans les 24 heures. Un rash hémorragique rapidement extensif débutant sur les parties distales des membres inférieurs est fréquemment associé au sepsis. La présence de lésions cutanées (macules et maculo-papules évoluant vers des pétéchies, des ecchymoses, un purpura) est à rechercher en dénudant entièrement l'enfant<sup>28</sup>. Des observations cliniques suggèrent que des signes généraux de sepsis (douleurs des membres inférieures, extrémités froides, pâleur) apparaissent fréquemment dans les 12 premières heures des infections sévères alors que les signes classiques ont un délai d'apparition moyen de 13 à 22 heures<sup>28,36</sup>.

Le choc septique et la défaillance multi-viscérale sont responsables de 90% des décès. Le reste des cas fatals est dû à la réaction inflammatoire méningée provoquant un œdème et une ischémie cérébrale.

Dans la majorité des cas, l'évolution des IIM, méningites et/ou méningococcémies, est rapidement fatale en l'absence de traitement. Il s'agit donc d'une urgence diagnostique et thérapeutique. Les progrès thérapeutiques, notamment l'administration rapide d'antibiotiques, ont permis de réduire la létalité à 10% dans les pays développés<sup>29</sup>.

Malgré les progrès thérapeutiques, des séquelles restent possibles et concernent environ 15% des patients : surdité, paralysie faciale, atrophie cérébrale, déficit intellectuel, nécroses cutanées et amputations secondaires au *purpura fulminans*<sup>7</sup>.

### 3) Diagnostic biologique

Le caractère pathogène du germe est affirmé lorsqu'il est retrouvé dans un site anatomique normalement stérile : LCR, sang, liquide articulaire, biopsie, liquide pleural, liquide péricardique.

Le méningocoque est le plus fréquemment isolé à partir de LCR et d'hémocultures, mais il est également présent dans les lésions purpuriques qui peuvent être biopsiées. La ponction lombaire est indispensable en cas de suspicion de méningite. En raison de la sensibilité de *N. meningitidis* au froid et à la dessiccation, les prélèvements doivent être transportés rapidement au laboratoire pour ensemencement. Les variations rapides de température sont à proscrire. Afin d'augmenter les chances d'isoler ce germe fragile, le prélèvement d'hémocultures doit être systématique.

La recherche d'IIM ou de portage de méningocoque par prélèvement rhinopharyngé est à proscrire. La présence de méningocoque après culture ne permettra pas de statuer sur le caractère invasif de la souche, ni de l'incriminer en cas de suspicion d'infection<sup>8,37</sup>.

Il est impératif, lorsque cela est possible, de réaliser les prélèvements avant d'instaurer l'antibiothérapie. On estime que l'injection de céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération stérilise le LCR en 30 minutes.

Le LCR est généralement trouble voire purulent, avec une leucocytose importante composée d'une forte majorité de polynucléaires neutrophiles. On retrouve les paramètres biochimiques classiques de la méningite bactérienne : protéinorachie élevée, glycorachie effondrée, lactates élevés (valeur prédictive négative élevée d'un taux de lactates < 3,2 mmol/l<sup>7</sup>).

La présence de diplocoques à Gram négatif à l'examen direct du LCR suffit à poser le diagnostic de méningite à méningocoque. Les germes doivent être recherchés en extracellulaire et en intracellulaire, dans le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles.

Si la ponction lombaire a été effectuée précocement, il est possible d'avoir un liquide clair, sans pléïocytose mais avec des diplocoques à l'examen direct.

En cas de doute sur la présence de germes à la coloration de Gram ou pour déterminer directement le sérotype d'un méningocoque observé, des kits de diagnostic rapide permettent de réaliser une agglutination directement à partir d'un échantillon de LCR. Ils détectent les polysides capsulaires des sérotypes A, B, C, Y/W (pas de distinction) mais aussi d'*Escherichia coli* K1, *Haemophilus influenzae* b, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus agalactiae*. Néanmoins, la sensibilité de la détection n'est que de 60% et les réactions croisées sont fréquentes. Cette technique est donc déconseillée par certains auteurs<sup>8</sup>.

Des techniques de biologie moléculaire (PCR en temps réel) sont maintenant utilisées en routine pour mettre en évidence la présence de *N. meningitidis* directement à partir du LCR. Elles présentent les avantages d'avoir une sensibilité supérieure aux méthodes de culture, de fournir un résultat plus rapide et de rester positives malgré l'éventuelle mort bactérienne causée par de mauvaises conditions de transport ou l'injection d'antibiotiques préalable au prélèvement. Certaines techniques duplex ou multiplex détectent simultanément la présence de plusieurs pathogènes à tropisme central (bactéries, virus et levures)<sup>38</sup>. De nouvelles techniques de PCR permettent de détecter l'ADN de *N. meningitidis* mais aussi d'identifier son sérotype<sup>39</sup>.

Cependant, l'ensemencement du prélèvement et l'obtention du germe en culture reste le seul moyen de tester sa sensibilité aux antibiotiques en routine. L'antibiogramme doit être réalisé chaque fois que cela est possible, tant pour orienter le choix thérapeutique que dans un but épidémiologique (suivi de l'évolution des résistances bactériennes).

Les méthodes de culture sont détaillées dans la partie « Caractères culturels et biochimiques ».

#### 4) AntibioGramme et résistance aux antibiotiques

L'antibiogramme est réalisé par diffusion sur gélose polyvitex selon les dernières recommandations françaises (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie<sup>40</sup>) et européennes (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing<sup>41</sup>). Ces groupes d'experts proposent un panel d'antibiotiques pertinent vis-à-vis des molécules utilisées en clinique et des résistances bactériennes potentielles. La sensibilité est déterminée par mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque chargé d'un antibiotique ou par lecture directe de la concentration minimale inhibitrice sur bandelette E-test. A l'heure actuelle les molécules testées sont les suivantes : pénicilline G et/ou amoxicilline, cefotaxime ou ceftriaxone, rifampicine, acide nalidixique. Peuvent être ajoutés à cette liste : chloramphénicol et ciprofloxacine. Le CA-SFM recommande de dépister la résistance aux pénicillines par mesure du diamètre autour d'un disque d'oxacilline chargé à 5µg<sup>40</sup>.

La résistance aux β-lactamines doit être recherchée. Elle est caractérisée par des modifications du gène *penA* aboutissant à des substitutions d'acides aminés de la PLP2 (Protéine Liant la Pénicilline). De nombreuses substitutions sont décrites, dont 5 majoritairement retrouvées : F504L, A510V, I515V, G541N, I566V<sup>42</sup>. Le mécanisme d'acquisition de cette résistance est identique à *Streptococcus pneumoniae* : des fragments génomiques de *Neisseria* commensales résistantes à la pénicilline sont incorporés au génome de *N. meningitidis* par transformation, ce qui crée des PLP mosaïques<sup>1,42</sup>. Il en résulte une augmentation progressive des CMI, d'abord compensée par une augmentation des doses de pénicilline, puis conduisant à l'inefficacité du traitement. Cette diminution de sensibilité affecte aussi les pénicillines A (amoxicilline et ampicilline) mais ne concerne pas les céphalosporines. Aux Etats-Unis, la proportion de méningocoques de sensibilité intermédiaire à la pénicilline G est restée sensiblement stable entre 2004 et 2011, s'établissant à environ 10%<sup>42</sup>. En France, cette sensibilité diminuée aux pénicillines concernait 24% des souches de méningocoques invasifs isolées en 2014 (valeur seuil de CMI définie = 0,125mg/L)<sup>39</sup>.

La production d'une β-lactamase est un phénomène exceptionnel chez *N. meningitidis*. Elle peut être mise en évidence dès la pousse en culture par une technique chromogénique (céfinase<sup>®</sup>) et entraîne une résistance aux pénicillines G et A<sup>1</sup>.

La résistance aux quinolones et notamment à la ciprofloxacine et la lévofloxacine, molécules de 2<sup>e</sup> intention en clinique, est liée à des mutations du gène *gyrA*. Ces sont des mutations chromosomiques acquises par sélection sous traitement, puis transmises de manière verticale uniquement<sup>42,43</sup>.

De rares souches résistantes à la rifampicine ont été décrites. La résistance est conférée par des mutations du gène *rpoB*, codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase bactérienne. Une altération de la virulence et une diminution du « fitness » bactérien ont été démontrées chez les souches résistantes à la rifampicine, limitant leur capacité de dissémination<sup>44</sup>.

La résistance au chloramphénicol est exceptionnelle mais doit être recherchée notamment dans les pays en voie de développement où il reste un antibiotique de 1<sup>re</sup> ligne<sup>45</sup>.

## 5) Prise en charge thérapeutique

L'antibiothérapie doit être débutée immédiatement après la ponction lombaire et les hémocultures. Cependant, le traitement doit débuter avant la réalisation des prélèvements si le délai de prise en charge hospitalière excède les 90 minutes. Si un risque d'engagement cérébral contre-indique la ponction lombaire, l'injection de l'antibiothérapie sera faite après le prélèvement d'hémocultures et avant le scanner cérébral<sup>7</sup>.

Le traitement ne doit en aucun cas attendre la documentation biologique de l'infection ; les arguments cliniques suffisent à initier une antibiothérapie large spectre efficace sur les principales bactéries responsables de méningite<sup>36</sup>.

En cas de suspicion de *purpura fulminans*, les recommandations françaises<sup>37</sup> indiquent que tout malade présentant des signes infectieux avec à l'examen clinique, pratiqué chez un sujet totalement dénudé, la présence d'un purpura ne s'effaçant pas à la vitro pression et comportant au moins un élément nécrotique ou ecchymotique de diamètre supérieur ou égal à 3 millimètres, doit immédiatement recevoir une première dose d'un antibiotique, administrée si possible par voie intraveineuse (IV), à défaut par voie intramusculaire (IM), quel que soit l'état hémodynamique du patient.

Lorsque le diagnostic d'IIM est confirmé par le laboratoire, les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération (céfotaxime et ceftriaxone) sont l'antibiothérapie de première ligne. La ceftriaxone possède une action démontrée sur le portage rhinopharyngé du méningocoque<sup>37</sup>. En cas d'utilisation d'un autre antibiotique, il est recommandé d'administrer secondairement une chimioprophylaxie pour éradiquer le portage. L'amoxicilline pourra être prescrite en relai si l'antibiogramme confirme la sensibilité du germe.

Lévofoxacine, rifampicine et phénicolés sont des alternatives possibles en cas d'allergie sévère aux bêta-lactamines<sup>7</sup>.

La bactéricidie est obtenue rapidement et la durée de traitement varie de 4 à 7 jours en fonction de l'évolution du patient.

Une corticothérapie administrée de façon concomitante à l'antibiothérapie a démontré son efficacité dans les méningites à méningocoques de l'adulte. Elle réduit significativement le taux de séquelles neurologiques<sup>36</sup>. Cependant, son efficacité n'est pas prouvée dans les méningites à méningocoque de l'enfant<sup>7</sup>. Elle doit donc être arrêtée si un méningocoque est identifié.

La résolution complète des symptômes intervient généralement en 14 jours<sup>36</sup>.

Dans tous les cas, la prise en charge d'une IIM impose la concertation avec un service de réanimation avant même l'éventuelle apparition d'un état de choc septique. Les fonctions vitales (hémodynamique, conscience) du patient devront être suivies pendant au moins 24 heures<sup>7</sup>.

Dans les cas de nécrose causée par le *purpura fulminans*, une prise en charge chirurgicale ainsi qu'une rééducation adaptée peuvent être mises en place.

Le patient fera l'objet d'un isolement type air et gouttelettes pendant 24h après administration d'un antibiotique à action avérée contre le portage pharyngé.

## 6) Prophylaxie

En raison de l'extrême pathogénicité du germe et de son potentiel épidémique, une antibioprofylaxie doit être administrée en urgence à tous les sujets contacts.

On estime que la contagiosité débute environ 7 jours avant le début des symptômes. De ce fait, les personnes pouvant être considérées comme cas contact doivent avoir été exposées directement aux sécrétions rhinopharyngées du cas index dans les 10 jours précédant son hospitalisation. En dehors des personnes vivant sous le même toit que le malade, la définition des cas contacts répond à des critères précis<sup>37</sup> :

- Proximité : distance inférieure à un mètre.
- Type de contact : uniquement face à face.
- Durée du contact : au moins une heure, sauf si contact bouche à bouche ou si toux ou éternuement fréquent du cas index.

L'antibioprofylaxie sera administrée de préférence dans les 24 à 48h après le dernier contact. Au-delà de 10j, elle ne présente plus d'intérêt car le risque d'IIM est négligeable. La

molécule de choix reste la rifampicine (600mg x2 /j chez l'adulte, 10mg/kg/j chez l'enfant) par voie orale pendant 2j. En cas de contre-indication ou de résistance documentée à la rifampicine, la ciprofloxacine *per os* ou la ceftriaxone intra-musculaire peuvent être administrées avec une efficacité similaire<sup>7,37</sup>.

## C. Epidémiologie

### 1) Situation au niveau mondial

On estime que les IIM concernent 1.2 millions d'individus à travers le monde chaque année. Elles engendrent environ 135000 décès et autant de séquelles physiques sévères<sup>29</sup>.

Le méningocoque est la seule bactérie responsable d'épidémie de méningites. En raison de ce potentiel épidémique, de la sévérité et de l'évolution extrêmement rapide de la pathologie, ce germe représente un problème de santé publique dans toutes les régions du monde.

Le risque d'IIM varie selon les tranches d'âge. D'abord faible dans les premiers mois de vie grâce aux Ac maternels, l'incidence connaît ensuite un pic de fréquence dans la petite enfance du fait de l'immaturité du système immunitaire. On estime que 50% des cas d'IIM concernent les enfants de moins de 2 ans<sup>46</sup>. Un 2<sup>e</sup> pic est observé à l'adolescence et au début de l'âge adulte, lié à la multiplication des rapports sociaux favorisant les contacts avec de nouvelles souches. Passée cette période, l'immunité acquise assure une protection relative et le risque tend à chuter, exception faite des individus présentant un déficit en complément ou de la mise en contact avec une souche immunologiquement nouvelle lors de voyages<sup>7</sup>.

Les analyses épidémiologiques ont permis de mettre en évidence des incidences variables selon les zones géographiques, ainsi que des variations notables dans les proportions respectives des sérogroupes impliqués<sup>9</sup>.

L'Afrique sub-saharienne connaît le plus fort taux d'incidence, de l'ordre de 20 à 30 cas pour 100 000 habitants/an, avec majoritairement des cas d'infections par le séro groupe A. Cette bande géographique est appelée « ceinture de la méningite » et connaît de façon cyclique des épidémies de grande ampleur<sup>11</sup>.

Dans les zones à climat tempéré, l'incidence ne dépasse pas 5 cas pour 100 000 habitants/an. En France, l'incidence est stable et oscille entre 0,9 et 1,6 cas pour 100 000

habitants/an<sup>7,39</sup>. Les autres pays industrialisés connaissent des taux semblables. On note habituellement une légère recrudescence hivernale, parfois sous forme de petites épidémies, bien que les mesures de prophylaxie autour d'un cas d'IIM préviennent généralement l'apparition de cas parmi l'entourage du malade<sup>7</sup>.

Le risque de méningococcie épidémique diffère d'un sérotype à l'autre. Ce sont majoritairement les sérotypes A, B, C et plus récemment W qui provoquent des épidémies.

Le sérotype A est historiquement responsable des principales épidémies explosives qui sont apparues dans toutes les régions du monde : en Afrique majoritairement, mais aussi en Amérique du Sud, au Népal et en Europe et en Amérique du Nord jusque dans les années 1950<sup>11</sup>.

La vaccination contre les sérotypes A, C, W et Y a modifié cette répartition. Les cas sporadiques comme les épidémies touchant les pays industrialisés sont maintenant causés à 80% par des méningocoques du sérotype B (MenB)<sup>46</sup>.

En France, environ deux tiers des cas sont causés chaque année par le sérotype B et un quart par le sérotype C<sup>39</sup>. Les sérotypes Y et W sont responsables des cas restants, le sérotype A étant quasi-inexistant.



Figure 2 : Distribution mondiale des sérotypes de *Neisseria meningitidis*. D'après Rouphael et al., 2012. *Neisseria meningitidis*: Biology, Microbiology, and Epidemiology<sup>29</sup>.

Des facteurs démographiques ont été mis en cause dans la survenue d'épidémies d'infections à méningocoques. Les voyages et les migrations de populations favorisent la dissémination de souches virulentes vers des populations non immunisées contre ces souches. Historiquement les pèlerinages à La Mecque ont été associés à des épidémies de méningites à méningocoques du sérotype A, puis du sérotype W à partir de 2000. Les pèlerins non immunisés sont beaucoup plus touchés par ces épidémies que la population saoudienne locale. Dans plusieurs pays, le retour des pèlerins a suscité la survenue de cas de méningites à méningocoque dans leur entourage immédiat<sup>9</sup>.

L'émergence des techniques moléculaires de typage des isolats bactériens a redéfini l'approche épidémiologique des IIM. Les typages par MLST puis par séquençage du génome complet surpassent en précision les anciennes méthodes de sérotypage, sérotypage et immunotypage, bien qu'elles continuent à être utilisées en complément. La possibilité d'attribuer un profil génétique (séquence-type) à une souche circulante permet d'identifier un clone responsable d'une épidémie.

Les complexes clonaux regroupant des séquence-types dits hyperinvasifs ont pu être identifiés et sont retrouvés avec une remarquable constance parmi les isolats pathologiques. Ainsi, les complexes clonaux cc8, cc11, cc32, cc41/44, et cc269 sont responsables de la majorité des IIM dans le monde<sup>21</sup>.

Brehony et al. ont montré que seulement 3 complexes clonaux (cc11, cc32, cc41/44) intégraient 62% des germes impliqués dans les IIM en Europe entre 2000 et 2002<sup>18</sup> (figure 3).

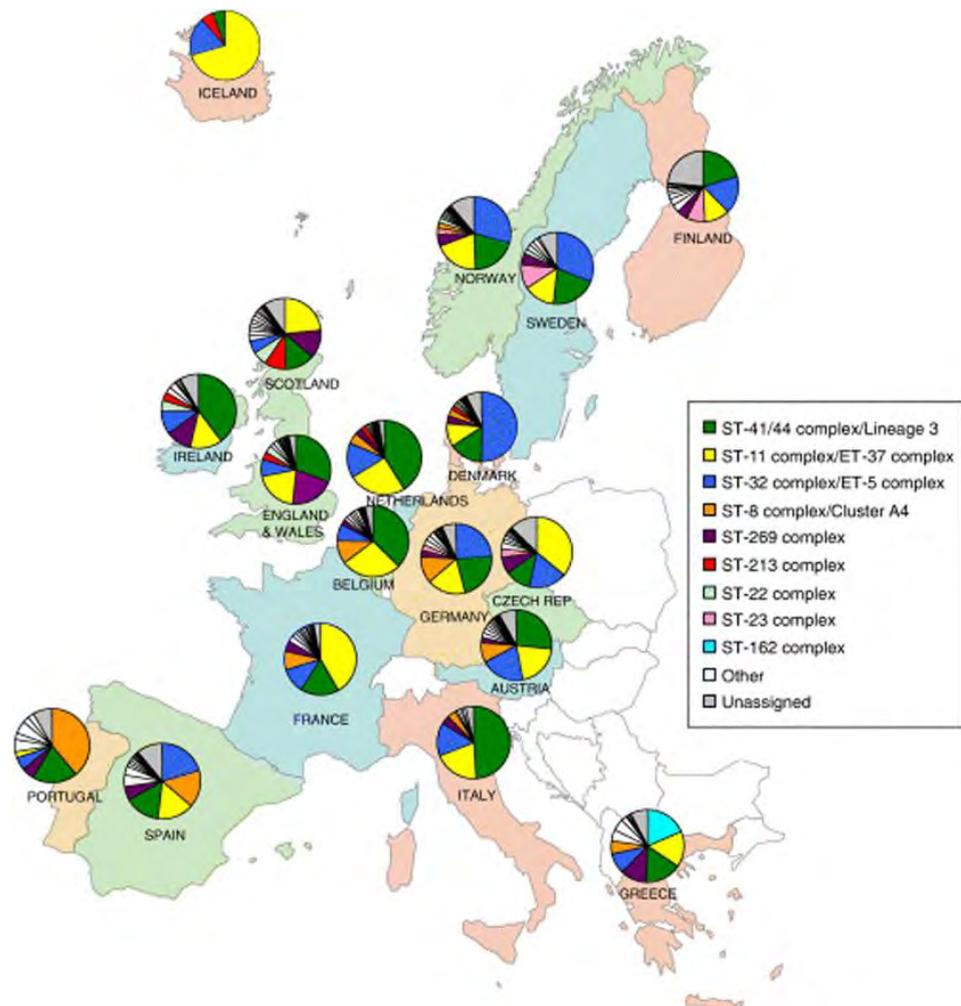


Figure 3 : Distribution des complexes clonaux responsables d'IIM en Europe, tous sérogroupes confondus. D'après Brehony et al., 2007. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease.<sup>18</sup>

## 2) Epidémiologie locale en Nouvelle-Calédonie

### a) Particularités liées à la population

L'épidémiologie des IIM en Nouvelle-Calédonie (NC) a fait l'objet d'une étude menée par un groupe de travail multidisciplinaire issu du Centre Hospitalier Territorial de Nouméa, de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie (IPNC) et de la Direction des Affaires Sanitaires et Sociales (DASS-NC). Cette étude a abouti à une publication en 2015, mettant en exergue des particularités notables par rapport à la situation en France métropolitaine<sup>26</sup>.

Entre 2005 et 2011, 66 cas d'IIM ont été recensés sur le territoire. L'incidence des IMM en NC a été de 3,7 cas pour 100 000 habitants, soit approximativement le triple du taux observé en France métropolitaine. La plus forte incidence est observée dans les îles Loyauté. La létalité globale est de 7,8% et ne présente pas d'écart significatif par rapport à la moyenne

française. L'ethnie mélanésienne était surreprésentée au sein de la cohorte de patients : 73,4% des cas, alors qu'ils ne constituent que 40% de la population de l'archipel. Plusieurs cas d'IIM au sein de mêmes familles à quelques années d'intervalle ont été identifiés, suggérant une susceptibilité familiale héréditaire.

Une exploration du système immunitaire a pu être réalisée pour 53 patients ayant présenté une IIM. Un déficit touchant le complément a été identifié chez 28 (52,8%) d'entre eux. Vingt-six (92,8%) étaient mélanésiens, un patient était d'origine mixte et un seul patient était d'origine européenne. Sur ces 28 patients, 24 présentaient un déficit quantitatif ou qualitatif de la voie finale commune (C6, C7 ou C8). Ont également été recensés : un cas de déficit en C4 (patient d'origine mixte), un cas probable de déficit en properdine ou en facteur B et un cas de déficit probable en facteur 2.

Des antécédents personnels ou familiaux de méningite ont été retrouvés pour 10 patients sur 28.

L'âge médian de survenue d'une IIM chez les patients présentant un déficit en complément était de 21,8 ans, contre 11,1 ans pour les autres patients. Il est établi que la survenue de ce type de pathologie est plus tardive chez les patients déficitaires en complément<sup>15</sup>.

Ces résultats laissent supposer que le taux élevé d'IIM en NC serait liée à une forte prévalence de déficits en facteurs du complément au sein de la population mélanésienne. Le mode de vie local favorisant la promiscuité est également un facteur de risque associé à cette ethnie spécifique.

#### b) Répartition des sérogroupes

Les données de l'IPNC, recensant la quasi-totalité des cas d'IIM depuis 2005, permettent d'obtenir une estimation précise des proportions respectives des sérogroupes circulant sur le territoire (figure 4). Le sérogroupage, réalisé uniquement par agglutination jusqu'à récemment, concerne les souches obtenues en culture et les réactions d'agglutination positives sur LCR ou hémoculture. Cette technique ne permet pas de différencier les sérogroupes Y et W. Sur 82 méningocoques ayant pu être sérogroupés entre 2005 et 2015, on dénombre 40 MenB (48,8%), 7 MenC (8,5%), 1 MenA (1,2%), 25 MenY ou W (30,5%) et 9 méningocoques non groupables (11%) (culture positive, agglutination négative).

Le MenB est donc le principal agent d'IIM en NC, avec une incidence d'environ 1,5 cas pour 100 000 habitants par an à lui seul. On note également la proportion élevée d'IIM causées par les sérogroupes Y ou W, qui nécessitent une exploration plus aboutie pour déterminer exactement quel séro groupe est en cause et expliquer cette différence marquée par rapport à l'épidémiologie française.

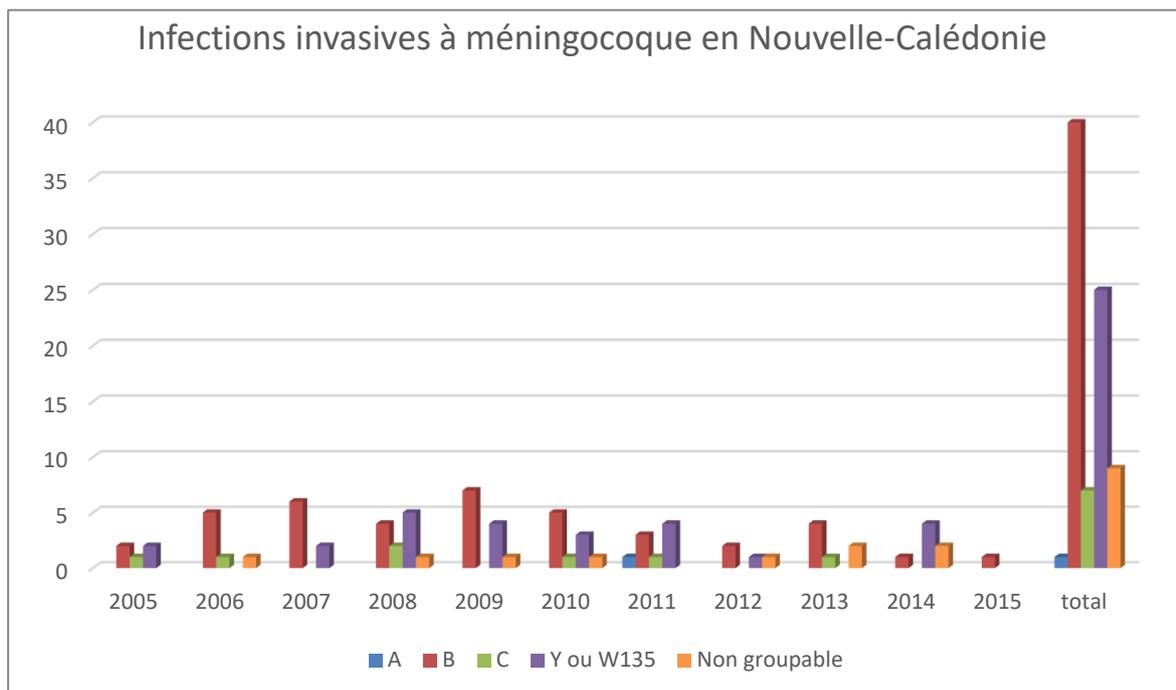


Figure 4 : Distribution annuelle des IIM en NC par sérotype. Cas confirmés d'infections pour lesquelles le sérotypage a pu être réalisé par agglutination sur culture ou sur le prélèvement (LCR, hémoculture). Données de l'IPNC.

## II- Stratégies vaccinales

### A. Vaccins anti-méningococciques polysaccharidiques

La diversité des polysaccharides capsulaires rencontrés au sein de l'espèce *N. meningitidis* reflète la variabilité de ce germe. Ils sont le support de la classification des méningocoques en sérotypes. Ces polysaccharides sont utilisés comme antigènes vaccinaux dans les vaccins développés contre les sérotypes A, C, W et Y. Ils induisent une réponse immunitaire thymo-indépendante, variable avec l'âge. Chez les adultes et les enfants de plus de 4 ans, une dose unique induit en une dizaine de jours une ascension rapide des Ac et une protection dans plus de 85% des cas. La protection dure au moins un an, souvent plusieurs années.

La réponse est plus faible chez les nourrissons et les jeunes enfants, bien que le vaccin contre le sérotype A semble avoir une meilleure efficacité<sup>9</sup>.

Il existe actuellement un vaccin contre le MenC, un vaccin bivalent (A et C) et un vaccin tétravalent. Ces vaccins s'administrent par voie intramusculaire ou sous-cutanée et sont bien tolérés<sup>9</sup>.

L'expérience acquise suite aux vaccinations dans des contextes d'épidémie, notamment en Afrique sub-saharienne, a montré qu'une vaccination de masse pouvait enrayer une épidémie en quelques semaines.

Sur le long terme, on suspecte que la capacité du méningocoque à changer son type capsulaire, et donc son sérotype, par transfert horizontal de gènes codant pour d'autres antigènes capsulaires, induirait l'émergence de lignées invasives du même sérotype mais de sérotype différent. Cette réponse à la pression de sélection pourrait entraîner une perte d'efficacité du vaccin<sup>12,47</sup>. L'émergence d'IIM du sérotype X pourrait être une conséquence de ce changement de capsule. Il a été montré que les méningocoques du sérotype X isolés en Afrique étaient historiquement des souches de portage essentiellement. Dans la dernière décennie, des épidémies d'IIM impliquant ce sérotype se sont déclarées. En Chine, les cas dus au sérotype X étaient jusqu'à récemment quasi-inexistants. En 2013, une IIM impliquant une souche du sérotype X, ST-7, a été décrite. Le ST-7 est un des profils les plus fréquents dans les IIM en Chine, mais il est habituellement associé au sérotype A. Il a donc été supposé que la vaccination de masse contre le sérotype A en Chine pourrait favoriser l'émergence de méningocoques invasifs du sérotype X par « capsule switching »<sup>47</sup>.

## B. Particularités du sérotype B et vaccins existants

L'approche « polysaccharidique » n'a jamais pu fournir de résultats satisfaisants pour l'immunisation contre le MenB. La capsule du sérotype B est composée d'un polymère d'acide sialique lié en  $\alpha$ 1-2, dont la structure est identique à l'acide sialique retrouvé sur certaines cellules humaines. Ce polysaccharide est donc non seulement faiblement immunogène, mais il présente en plus le risque d'induire des pathologies auto-immunes.

La principale stratégie adoptée jusqu'ici a été de développer des vaccins incorporant des vésicules de membrane externe (Outer Membrane Vesicles, OMV), dans lesquelles sont enchâssées des lipoprotéines de membrane.

Les OMV possèdent un panel d'antigènes complexe, dont les principales molécules immunogènes sont les porines PorA et PorB et la protéine FetA. Les 2 porines majeures sont constamment les molécules les plus abondantes dans les préparations antigéniques

vaccinales composées d'OMV. Il a été démontré que PorA est associée à une immunité protectrice plus importante que n'importe quelle autre molécule à la surface du méningocoque. Les domaines variables, notamment VR2, semblent être la cible principale du système immunitaire sur PorA<sup>48</sup>. Le rôle de PorB dans la protection immune est moins clair<sup>13</sup>.

Cette approche vaccinale s'est révélée efficace pour interrompre la propagation d'épidémies locales en Norvège, au Brésil ou encore en Nouvelle-Zélande. Néanmoins, la preuve de l'immunisation efficace chez les jeunes enfants n'a pas été faite et cette stratégie se heurte à la grande variabilité des protéines de membrane externe. La diversité de PorA et PorB au niveau des boucles variables est à l'origine du système de sérotypage<sup>49</sup> et des publications ont montré que FetA était également hautement variable<sup>50</sup>. Ces vaccins apportent donc un bénéfice au niveau local, contre des souches spécifiques, mais ne confèrent pas de protection généralisée contre tous les méningocoques. De plus, la durée d'immunisation paraît relativement courte<sup>48,51,52</sup>.

## C. Vaccinologie inverse et nouveaux vaccins anti-méningococciques

### 1) Principe de la vaccinologie inverse

L'échec des stratégies adoptées pour induire une immunisation contre l'ensemble des MenB a conduit à l'élaboration de nouvelles méthodes pour identifier des antigènes vaccinaux.

La vaccinologie inverse repose sur l'exploration du génome d'un micro-organisme pour y identifier des séquences correspondant à des protéines exposées à la surface cellulaire. L'étape suivante consiste à cloner ces gènes dans un micro-organisme dans le but de lui faire synthétiser les antigènes correspondant. Puis leur potentiel immunogène est étudié par inoculation chez l'animal, avec détermination du potentiel bactéricide des Ac produit contre le germe ciblé. Il est ensuite nécessaire d'étudier la prévalence de ces gènes dans la population et la variabilité des antigènes exprimés. Si un ou plusieurs de ces antigènes possèdent des épitopes stables dans la plupart des isolats de méningocoques, un vaccin peut être créé. Cette technique permet d'envisager le développement d'un vaccin candidat efficace sur plusieurs sérogroupes différents, voire sur l'ensemble des sérogroupes de méningocoques.

## 2) Composition et développement du vaccin Bexsero®

Le Bexsero® ou 4CMenB est un vaccin développé par Novartis Vaccine and Diagnostics, qui a reçu une autorisation de mise sur le marché européenne le 14 janvier 2013 pour l'«immunisation active des sujets à partir de l'âge de 2 mois contre l'infection invasive méningococcique causée par *Neisseria meningitidis* de groupe B»<sup>53</sup>. Il a été développé selon cette approche de vaccinologie inverse et associe 4 composants protéiques immunogènes principaux :

- La protéine NHBA peptide 2 (Neisserial Heparin Binding Antigen) fusionnée à GNA1030 (Genome-derived Neisserial Antigen)
- La protéine fHBP variant 1 peptide 1 (factor H binding protein) fusionnée à GNA2091
- NadA-3.8 (Neisserial adhesin A)
- Des vésicules de membrane externe issues d'une souche épidémique néo-zélandaise (NZ98/254, B :4 :P1.4) porteuses de PorA P1.4.

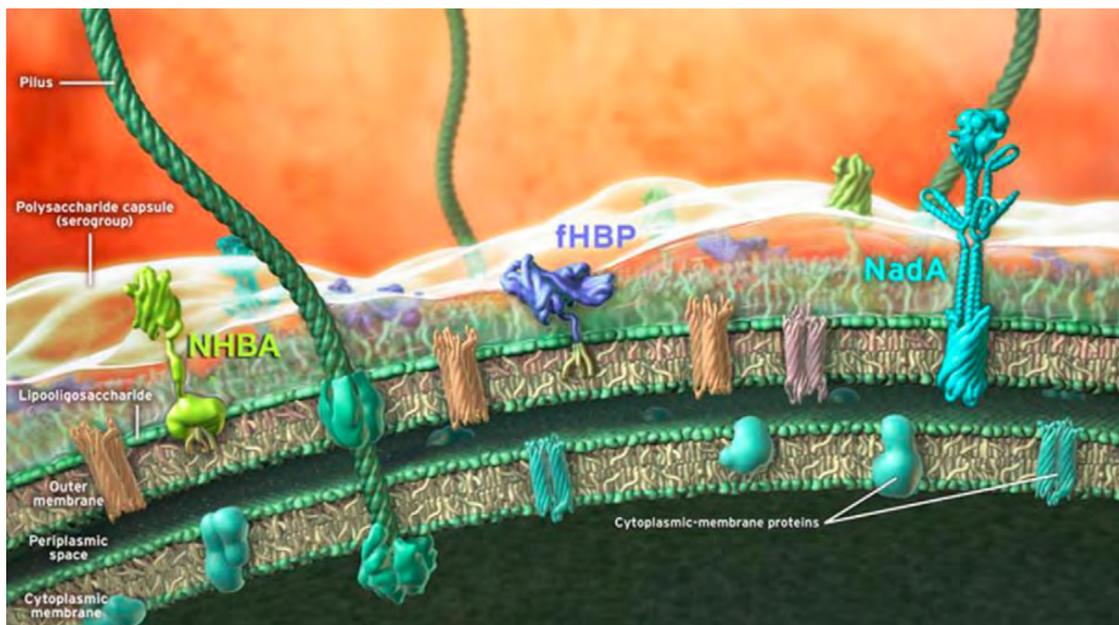


Figure 5. Représentation schématique des antigènes vaccinaux sur la membrane externe de *Neisseria meningitidis*. Selon Serruto et al., 2012. The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB : immunological, functional and structural characterization of the antigens<sup>35</sup>.

Ces antigènes protéiques sont immunogènes de façon isolée et la protection immunitaire augmente lorsqu'ils sont associés. On considère qu'une souche de méningocoque qui exprime un seul de ces antigènes est couverte par les anticorps produits suite à la vaccination par Bexsero®.

La protéine fHBP a été découverte de façon indépendante par 2 groupes d'études différents recherchant de potentiels antigènes vaccinaux exprimés par le méningocoque. Le groupe Novartis (maintenant GSK), par la technique de vaccinologie inverse, a identifié une séquence génétique codant potentiellement pour une protéine de membrane externe immunogène, puis a cloné ce gène pour le faire exprimer par *Escherichia coli* et déterminer son immunogénicité chez la souris. Le groupe Wyeth (maintenant Pfizer) est passé par des étapes d'extraction de protéines de la membrane externe du méningocoque à l'aide de détergents, puis d'immunisations séquentielles de souris pour identifier la protéine présentant le meilleur potentiel vaccinal. Cet antigène a été intégré comme un des 4 composants du vaccin Bexsero® (GSK) et représente le composant unique du vaccin Trumemba® (Pfizer) avec un peptide de la sous-famille A et un peptide de la sous-famille B.

Le gène *fhbp* codant pour la protéine fHBP est retrouvé dans quasiment 100% des isolats de méningocoque<sup>35</sup>. L'analyse structurale de cette protéine fait apparaître 3 variants (1, 2 et 3) ou 2 sous-familles (A et B) selon les groupes d'étude (GSK ou Pfizer). La sous-famille A regroupe les variants 2 et 3 et la sous-famille B équivaut au variant 1. Ces variants sont eux-mêmes divisés en peptides. Il existe une immunité croisée entre les différents types de fHBP, corrélée à la proximité structurale des peptides<sup>54</sup>. Après vaccination par le vaccin Bexsero, de fort taux d'Ac protecteurs sont obtenus pour des souches possédant fHBP 1.1 (peptide présent dans le 4CMenB). La protection immune contre les autres types de fHBP est variable, avec de meilleurs taux de réponse pour les peptides appartenant au variant 1 (sous-famille B)<sup>34</sup>.

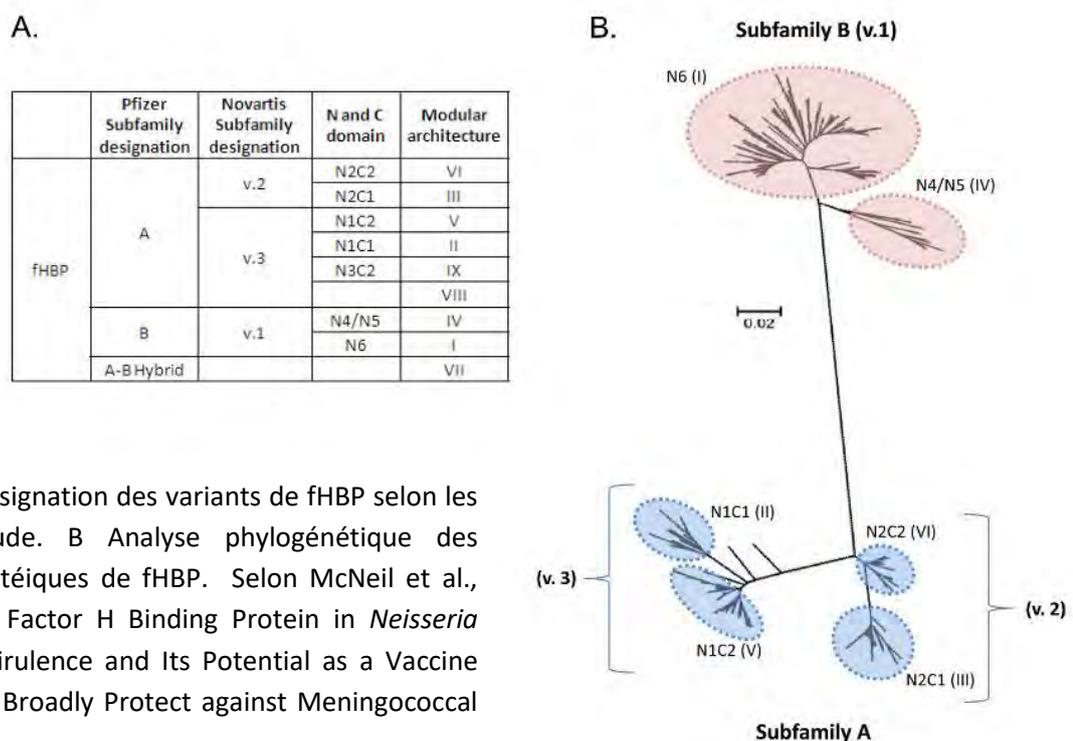


Figure 6. A. Désignation des variants de fHBP selon les groupes d'étude. B Analyse phylogénétique des séquences protéiques de fHBP. Selon McNeil et al., 2013. Role of Factor H Binding Protein in *Neisseria meningitidis* Virulence and Its Potential as a Vaccine Candidate To Broadly Protect against Meningococcal Disease<sup>34</sup>.

NadA (Neisserial adhesin A) est une adhésine qui existe sous la forme de plusieurs variants : 1, 2/3, 4/5 et 6. Les molécules appartenant aux variants 1 et 2/3 entraînent une immunité croisée, de même pour les molécules appartenant aux variants 4/5 et 6<sup>30</sup>, ce qui est en accord avec l'analyse structurale des variants de cette protéine (figure 7). Le gène *nadA* codant pour cette protéine est présent chez moins de 30% des souches analysées en Europe<sup>55</sup>. De plus son expression est sujette aux variations de phase et n'est donc pas constante<sup>56</sup>.

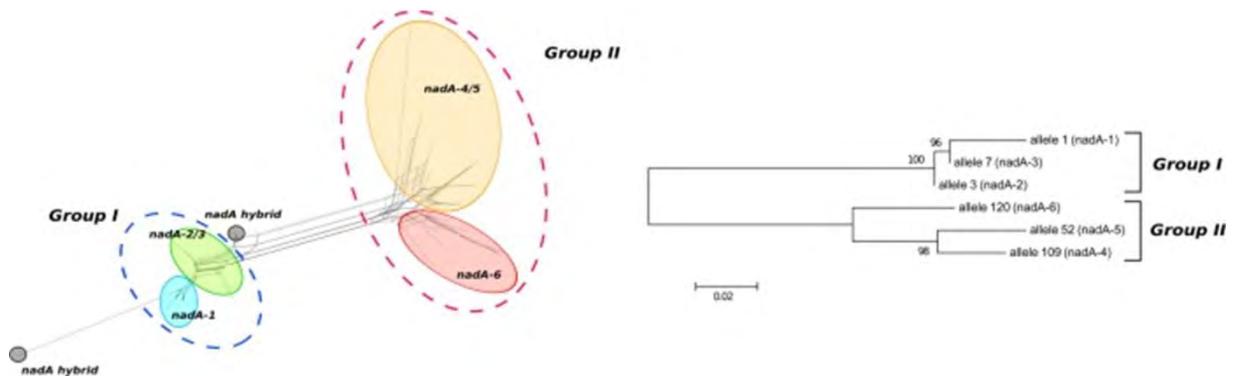


Figure 7. Représentation de la proximité structurale des différents variants de NadA. D'après Bambini *et al.*, 2014. *Neisseria* Adhesin A Variation and Revised Nomenclature Scheme<sup>30</sup>.

NHBA (Neisserial Heparin Binding Antigen) est une lipoprotéine de la membrane externe dont les différents types sont nommés peptides (pas de division en variants puis en sous-variants). L'immunité croisée entre les différents peptides NHBA est importante. Son appellation provient de sa capacité à lier l'héparine *in vitro*. Le gène *nhba* est retrouvé chez tous les méningocoques et serait exprimé par 70% des MenB.

La porine A (PorA) est constamment exprimée par *N. meningitidis*<sup>57</sup>(cf. 1-, 3), membrane externe et sérotype). Le domaine VR2 du gène *porA* code pour une boucle variable de la porine considérée comme le principal déterminant antigénique de la liaison aux Ac protecteurs. L'immunité croisée étant faible entre les différents variants de PorA, une protection immune ne peut être espérée que si la souche porte le variant 4 de VR2, qui est celui présent dans le vaccin. Ce variant (dont la dénomination complète est B : 4 : P1.7-2,4) a été utilisé avec efficacité dans un vaccin monovalent pour interrompre une épidémie néo-zélandaise<sup>51</sup>.

Au final, Por A semble être l'antigène le plus fortement ciblé par l'immunité humorale après infection par une souche de méningocoque. Cependant, sa grande variabilité et le faible taux d'immunité croisée entre ses variants ne permettent pas d'en faire un antigène vaccinal unique. NHBA présente un potentiel élevé d'immunogénicité croisée mais n'est pas exprimé par la totalité des souches de méningocoque. NadA possède le plus faible intérêt parmi ces antigènes car il est insuffisamment retrouvé à la surface des différentes souches de méningocoques et entraîne une immunité croisée limitée aux variants structurellement proches, bien que l'expression en conditions d'infection puisse être majorée. fHBP représente le meilleur antigène vaccinal, comme le suggère le choix du groupe d'étude de Pfizer qui en a fait l'unique composant du vaccin Trumemba.

Le rationnel de développement du vaccin Bexsero® a donc reposé sur la combinaison de 4 antigènes immunogènes séparément, ce qui permet d'espérer une efficacité sur un large panel de souches de MenB.

#### D. Données actuelles sur l'efficacité du vaccin Bexsero®

Si les IIM sont d'une gravité extrême, l'incidence des IIM à MenB reste néanmoins trop faible pour permettre d'étudier l'efficacité de l'immunisation chez une cohorte d'individus vaccinés. Il faudrait tester le vaccin chez plusieurs centaines de milliers de volontaires pour obtenir des résultats significatifs quant à la variation de l'incidence de la pathologie. La preuve de l'efficacité, nécessaire au développement clinique du vaccin, doit alors être apportée par d'autres méthodes.

Deux paramètres conditionnent l'efficacité du vaccin sur une souche spécifique :

- La présence des gènes codant pour les protéines qui composent le vaccin. Il faut qu'il s'agisse de l'allèle codant pour le même variant antigénique, ou pour un antigène entraînant une immunité croisée.
- Le niveau d'expression des protéines par le germe. En effet, la présence des allèles adéquats n'est pas suffisante car elle n'assure en aucun cas que les protéines sont exprimées *in vivo* et donc exposés au système immunitaire de l'hôte.

Le test de référence pour évaluer la réponse immune contre une souche de méningocoque après vaccination est la mesure de l'activité bactéricide du sérum humain (human serum bactericidal antibody, hSBA). Ce test détermine la capacité du sérum humain à lyser le méningocoque par liaison des Ac déclenchant l'activité bactéricide du complément. Cette technique présente comme limite majeure la nécessité de grandes quantités de sérum pour

étudier la réponse immune humorale vis-à-vis de chaque souche. Elle est donc difficilement applicable aux enfants, en plus d'être de réalisation laborieuse. De plus, ce test ne permet pas d'évaluer l'immunité contre chacun des antigènes vaccinaux de façon isolée ni leur activité synergique potentielle.

La technique MATS (Meningococcal Antigen Typing System) a été développée par le laboratoire Novartis spécifiquement pour pallier les limites du hSBA. Il s'agit d'un test ELISA de type sandwich qui quantifie pour une souche de MenB l'expression relative de 3 antigènes composant le vaccin Bexsero<sup>®</sup> : FHBP, NadA et NHBA. Elle permet de mesurer la réactivité des variants antigéniques vis-à-vis des Ac induits suite à la vaccination. On obtient un potentiel relatif (RP) contre chacun des 3 antigènes testés. Si ce potentiel excède un niveau défini comme le seuil de bactéricidie (Positive Bactericidal Threshold, PBT) pour un seul antigène, la souche est considérée comme lysée en hSBA, donc couverte par la vaccination par Bexsero<sup>58</sup>. Ce test a été validé par comparaison avec le hSBA et est considéré comme un marqueur conservatif du niveau d'efficacité du vaccin. Il fournit une évaluation individuelle de la bactéricidie pour chacun des 3 antigènes étudiés, mais ne prend pas en compte l'activité synergique contre l'ensemble des antigènes.

Ce test est un outil rapide et performant pour prédire l'efficacité du vaccin sur une souche responsable d'une épidémie, mais toutefois limité à un nombre réduit de laboratoires de référence.

Le génotypage de la région VR2 de *porA* est considéré comme suffisant pour estimer son efficacité en tant qu'antigène vaccinal. Le niveau d'expression n'est pas déterminé par la technique MATS car cet antigène est exprimé de façon constitutive sur la membrane externe du germe. Si la souche étudiée est porteuse de PorA P1.4 (domaine VR2 de type 4), elle est couverte par la vaccination par le Bexsero<sup>®</sup>.

Des études sur l'efficacité potentielle du vaccin Bexsero ont été conduites à l'échelle européenne<sup>55,59</sup>, aux Etats-unis, au Canada<sup>60</sup>, en Australie ou encore en Corée du Sud<sup>61</sup>. Elles montrent que l'association de ces 4 antigènes entraîne une forte probabilité d'immunisation contre une souche donnée de méningocoque du groupe B. Toutes les études ont montré une couverture estimée supérieure à 66% des souches invasives de MenB. En Europe, le taux moyen d'efficacité sur les souches isolées entre 2007 et 2008 est de 78%<sup>55</sup>. En France ce taux est de 85% et il s'élève à 91% aux Etats-Unis<sup>62</sup>. Plus proche géographiquement de la NC, une étude australienne a mis en évidence une efficacité estimée à 76% sur les MenB isolés entre 2007 et 2011<sup>62</sup>. Par contre, aucune évaluation de l'efficacité n'a été faite dans le Pacifique insulaire.



### III- Nouvelle-Calédonie et système de soins

#### A. Situation géographique, démographique, sanitaire

La Nouvelle-Calédonie est un archipel d'Océanie situé dans l'océan Pacifique à 1500 km à l'est de l'Australie et à 2000 km au nord de la Nouvelle-Zélande. Ce territoire de 18 575 km<sup>2</sup> dépend à l'heure actuelle de la République française et se situe à 17 000 km de la France métropolitaine. L'île principale, la Grande Terre, est découpée en 2 provinces : la province Sud qui regroupe 200 000 personnes dont la majorité à Nouméa et la province Nord rassemblant 50 000 personnes. Une multitude d'îles et îlots entoure la Grande Terre. Les 4 îles Loyauté forment une 3<sup>e</sup> province de 14 000 habitants, la province des îles.

Le chef-lieu, Nouméa, regroupe presque 100 000 habitants et le « Grand Nouméa » (avec les communes voisines) rassemble environ 180 000 personnes soit les deux tiers des 270 000 néo-calédoniens.

La population est pluriethnique. En 2014, 105 000 personnes, soit 39 % de la population totale, déclarent appartenir à la communauté Kanak. Les Européens représentent 73 200 habitants, soit 27 % des déclarations. Viennent ensuite les Wallisiens et Futuniens avec 22 000 personnes (8 %). Les autres communautés (Tahitiens, Indonésiens, Ni-Vanuatu, Vietnamiens et autres populations asiatiques) rassemblent au total moins de 6 % de la population. Près d'un habitant sur dix se déclare métis ou appartenir à plusieurs communautés<sup>63</sup>.

Ces communautés sont inégalement réparties sur le territoire. Alors que dans la province Sud les Kanaks ne représentent que 26% de la population (contre 33% d'Européens), la communauté Kanak représente 70% de la population de la province Nord et atteint 86% dans les communes de la côte Est. Dans les îles Loyauté, la quasi-totalité de la population se déclare Kanak (94%).

Alors que l'organisation sociétale est semblable à celle de la métropole pour la plupart des communautés, la communauté Kanak se distingue par une organisation dite tribale. Les indicateurs démographiques de cette population évoluent progressivement vers ceux de la métropole avec une diminution de la taille des ménages et de la fécondité, un vieillissement de la population. L'âge médian de la population générale est aujourd'hui de 31 ans contre 40 ans en France métropolitaine. Il n'était que de 22 ans en 1989 en NC.

L'habitat traditionnel en case mélanésienne qui représentait 24% des logements de l'archipel en 1989 ne concerne plus qu'1% des habitations en 2014. A présent, 91% des logements disposent de l'eau courante et presque 100% ont l'électricité, bien que ces taux soient plus faibles en province Nord et dans les îles Loyauté.



Figure 9. Carte de la Nouvelle-Calédonie et localisation régionale

Le climat est de type tropical, avec une température moyenne sur l'année d'environ 23°C et un taux d'humidité élevé (73 à 81% en moyenne). L'année est divisée en 2 saisons : une saison chaude et humide de novembre à avril, saison des cyclones, et une saison sèche et fraîche de mai à octobre qui correspond à l'hiver austral. Les variations de température sont relativement faibles avec des moyennes entre 24 et 29°C pour les mois les plus chauds et 18 à 26°C pour les plus froids.

## B. Organisation du système de soins

Il existe 3 structures hospitalières principales en NC :

- Le Centre Hospitalier Territorial (CHT) de Nouméa est la structure de santé la plus importante du territoire. Il est encore à l'heure actuelle divisé en 2 sites principaux, l'hôpital Gaston Bourret et l'hôpital de Magenta, qui ont une capacité d'accueil totale

de 454 lits et 28 places en hospitalisation de jour. Ces 2 sites seront prochainement (fin 2016-début 2017) rassemblés sur le site du Médipôle au nord de Nouméa.

- Le Centre Hospitalier Spécialisé (CHS) Albert Bousquet héberge les services de psychiatrie et gériatrie. Il est également localisé à Nouméa.
- En province Nord, les hôpitaux de Poindimié sur la côte Est et de Koumac sur la côte Ouest forment le Centre Hospitalier du Nord. Ces 2 hôpitaux sont de taille modeste (42 lits pour Koumac et 36 lits pour Poindimié) et réorientent les patients ayant besoin de soins spécialisés vers Nouméa.

Des centres médicaux-sociaux ou dispensaires assurent des services médicaux de proximité principalement en province Nord et dans les îles Loyauté.

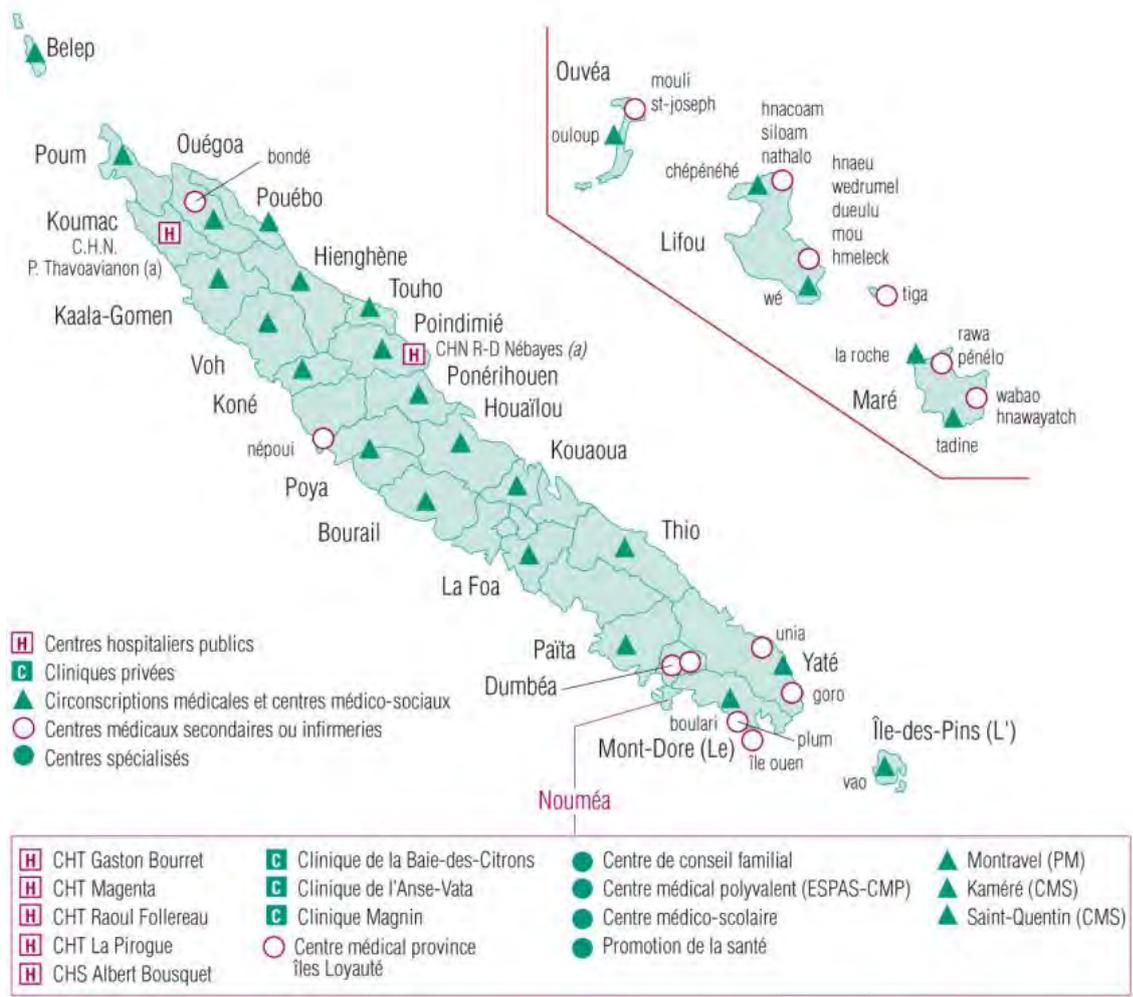
Le secteur privé s'est développé sur Nouméa avec 3 cliniques privées mais est absent du reste du territoire.

Certaines pathologies nécessitant un équipement de pointe ne peuvent pas être prises en charge sur le territoire. Il s'agit notamment des chirurgies cardiaques et neurologiques, de l'onco-hématologie. Les patients bénéficient alors d'une évacuation sanitaire vers la France métropolitaine ou vers l'Australie dans les cas les plus urgents.

L'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie (IPNC) est une fondation privée à but non lucratif située à Nouméa dont les missions sont diverses :

- Activité de biologie médicale sous contrat avec le CHT et le CHS et en tant que laboratoire privé disposant de son propre centre de prélèvement.
- Missions de Santé Publique en collaboration avec la Direction des Affaires Sanitaires et Sociales de Nouvelle-Calédonie (DASS-NC), notamment le suivi épidémiologique des maladies infectieuses (arbovirus, grippe, leptospirose, tuberculose, méningites bactériennes...) et la lutte contre l'antibiorésistance sur le territoire.
- Formation des personnels de laboratoires de biologie médicale et de recherche.
- Activités de recherche principalement axées sur les arboviroses et la leptospirose.

Les établissements de santé fonctionnent en lien avec DASS-NC, qui définit et met en œuvre la politique de santé sous l'égide du gouvernement de la NC, la compétence de la Santé Publique ayant été transférée à la NC dans le cadre de l'accord de Nouméa.



(a) Les CHN de Koumac et Poindimié disposent d'une antenne médico-psychologique rattachée au CHS Albert Bousquet.

Figure 10. Principales structures de santé en Nouvelle-Calédonie en 2011. Source : ISEE 2012

## C. Aspects administratifs de la prise en charge des IIM

### 1) Déclaration des cas

En France métropolitaine comme en NC, les IIM font partie des maladies à déclaration obligatoire. Tout cas répondant aux critères de déclaration est donc signalé dans les plus brefs délais à l'Agence Régionale de Santé (ARS) dont dépend l'établissement de santé<sup>64</sup>.

En NC, cette déclaration s'effectue auprès de la DASS-NC. Généralement, elle est effectuée de façon concertée par le biologiste médical si l'infection est diagnostiquée biologiquement, et par le clinicien si le diagnostic est purement clinique.

La déclaration d'un cas d'IIM en NC est soumise à des critères précis de définition des cas, qui correspondent aux critères mis en place en France métropolitaine par l'Institut national de Veille Sanitaire (InVS). Tout cas remplissant au moins l'un des critères suivants est considéré comme une IIM<sup>64</sup> :

1. Isolement bactériologique de méningocoques ou PCR positive à partir d'un site normalement stérile (sang, LCS, liquide articulaire, liquide pleural, liquide péritonéal, liquide péricardique, liquide de la chambre antérieure de l'œil) ou à partir d'une lésion cutanée purpurique.
2. Présence de diplocoques Gram négatif à l'examen microscopique du LCS.
3. LCS évocateur de méningite bactérienne purulente à l'exclusion de l'isolement d'une autre bactérie) ET présence d'éléments purpuriques cutanés, quel que soit leur type.
4. Présence d'un *purpura fulminans* (purpura dont les éléments s'étendent rapidement en taille et en nombre, avec au moins un élément nécrotique ou ecchymotique de plus de trois millimètres de diamètre, associé à un syndrome infectieux sévère, non attribué à une autre étiologie).

Selon la définition de l'InVS, cette procédure s'articule autour de 2 étapes : signalement et notification<sup>64</sup>. Le signalement dès le diagnostic est essentiel pour prévenir l'apparition de cas secondaires liés au potentiel épidémique du germe. Ainsi, les mesures d'isolement et la chimioprophylaxie appliquées précocement dans l'entourage du cas index font que les cas secondaires sont devenus extrêmement rares en France<sup>7</sup>. Secondairement, la notification détaillée du cas permet un suivi précis de l'incidence de la pathologie, la détection des épidémies et l'adaptation des mesures de prévention au niveau loco-régional et national.

## 2) Recommandations vaccinales françaises, spécificités de la Nouvelle-Calédonie

Le calendrier vaccinal français pour l'année 2016 recommande la vaccination généralisée des nourrissons à l'âge de 12 mois contre le méningocoque du sérotype C. Cette vaccination en une dose unique est étendue à tous les individus jusqu'à l'âge de 24 ans<sup>65</sup>.

A l'heure actuelle, aucun autre vaccin anti-méningococcique n'est recommandé pour la population générale.

Cependant, la vaccination par le vaccin tétravalent conjugué ACYW et par le vaccin Bexsero<sup>®</sup> est recommandée pour les personnes à risque, définies comme :

- les personnels des laboratoires de recherche travaillant spécifiquement sur le méningocoque ;
- les personnes porteuses d'un déficit en fraction terminale du complément ou qui reçoivent un traitement anti-C5A, notamment les personnes qui reçoivent un traitement par eculizumab (Soliris<sup>®</sup>) ;
- les personnes porteuses d'un déficit en properdine ;
- les personnes ayant une asplénie anatomique ou fonctionnelle ;
- les personnes ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques.

La vaccination des cas contacts autour d'un cas d'IIM est recommandée pour les infections à méningocoques des sérotypes A, C, Y et W. Dans le cas d'IIM à MenB, la vaccination des cas contacts n'est pour l'instant pas recommandée, seule la chimioprophylaxie doit être mise en place.

Il est néanmoins précisé qu'une vaccination anti-méningococcique B est recommandée pour des « populations cibles » dans des situations épidémiques ou hyperendémiques<sup>65</sup>.

Concernant la vaccination anti-méningococcique B, ces indications suivent l'avis relatif à l'utilisation du vaccin Bexsero<sup>®</sup> rendu par le HCSP en octobre 2013<sup>53</sup> et le rapport de décembre 2014 concernant la vaccination des personnes immunodéprimées et aspléniques<sup>25</sup>. Les personnes immunodéprimées doivent être vaccinées selon le schéma habituel décrit dans l'AMM du médicament (tableau 2).

La situation épidémiologique en NC diffère de celle de la France métropolitaine. Les MenC ne représentent que 8,5% des souches impliquées dans une IIM, ce qui ne justifie pas la vaccination généralisée contre ce sérotype. Néanmoins, les recommandations pour les personnes immunodéprimées s'appliquent selon les mêmes schémas qu'en France métropolitaine. Le vaccin quadrivalent A, C, W, Y et le Bexsero<sup>®</sup> sont ainsi administrés aux

patients ayant un déficit en complément ou une asplénie. La prévalence élevée de déficits en complément, associé à un taux local d'IIM 3 fois supérieur à celui de la métropole, justifie une investigation familiale autour des cas d'IIM. Ainsi, un dépistage de déficit en complément est réalisé parmi les membres de la famille du patient pour identifier et vacciner les individus à risque.

<b>Tranche d'âge</b>	<b>Primovaccination</b>	<b>Intervalles entre les doses de primovaccination</b>	<b>Rappel</b>
Nourrissons de 2 à 5 mois	3 doses de 0,5 mL chacune, avec une première dose administrée à l'âge de 2 mois	1 mois minimum	Une dose entre 12 et 23 mois
Nourrissons non vaccinés de 6 à 11 mois	Deux doses de 0,5 mL chacune	2 mois minimum	Une dose au cours de la deuxième année avec un intervalle d'au moins 2 mois entre la primovaccination et la dose de rappel
Enfants non vaccinés de 12 à 23 mois	Deux doses de 0,5 mL chacune	2 mois minimum	Une dose avec un intervalle de 12 à 23 mois entre la primovaccination et la dose de rappel
Enfants de 2 à 10 ans	Deux doses de 0,5 mL chacune	2 mois minimum	Besoin non établi
Adolescents (à partir de 11 ans) et adultes	Deux doses de 0,5 mL chacune	1 mois minimum	Besoin non établi

Tableau 2. Schéma vaccinal du vaccin Bexsero®

## PARTIE II : Description de l'étude

### I- Rationnel du projet et élaboration du protocole

Le vaccin Bexsero® a été développé spécifiquement pour induire une immunité contre le MenB. Il associe plusieurs composants permettant d'induire des Ac bactéricides sur la majorité des isolats testés.

Cependant, en raison de l'importante variabilité antigénique chez le méningocoque, il est nécessaire de déterminer l'efficacité du vaccin sur un panel représentatif des lignées circulant sur un territoire avant d'envisager de vacciner la population. Malgré l'obtention d'une AMM en France, l'éloignement par rapport à la métropole ne permet pas d'affirmer que les souches circulantes en NC sont identiques aux souches métropolitaines sur lesquelles le vaccin a été testé. Notre étude s'est donc attachée à identifier les souches présentes en NC, puis à évaluer l'efficacité potentielle du vaccin Bexsero® sur ces souches.

La méthode choisie pour notre étude s'est principalement inspirée des protocoles décrits par Holst et al.<sup>66</sup>, Murphy et al.<sup>54</sup> et Lucidarme et al.<sup>67</sup>. Il s'agit d'une caractérisation génétique d'un panel de MenB associant :

- Typage génétique des MenB par MLST
- Typage des 4 gènes codant pour les antigènes méningococciques inclus dans le vaccin.

Le profil (ST) obtenu en MLST permet d'affilier nos souches de MenB à un complexe clonal. Cette 1<sup>ère</sup> étape est essentielle car elle apporte une vision d'ensemble de la diversité des souches de MenB circulant sur un territoire donné. Plus la population de MenB est hétérogène, plus la diversité antigénique qui devra être couverte par le vaccin sera élevée.

Ce typage permet d'affiner l'épidémiologie en reliant les souches locales aux complexes clonaux hyperinvasifs majeurs dans le monde. De plus, grâce à certains travaux<sup>59</sup> ayant évalué le taux de couverture par le vaccin Bexsero® des différents complexes clonaux, un 1<sup>er</sup> indice sera fourni sur la couverture potentielle.

Néanmoins plusieurs études ont prouvé que le séquence-type déterminé par MLST ne pouvait pas être constamment relié à un panel d'allèles fixe pour les gènes codant pour les antigènes vaccinaux<sup>54,55,59</sup>. Bien qu'on retrouve fréquemment les mêmes variants de *fhbp*, *nadA*, *nhba* et VR2 (*porA*) chez les souches d'un même ST, il a été montré que des souches appartenant au même complexe clonal voire au même ST pouvaient posséder des variants

différents<sup>55,59</sup>. Ainsi, si une souche de méningocoque est couverte par le vaccin Bexsero<sup>®</sup>, une autre souche appartenant au même ST ne le sera pas forcément. L'analyse par MLST est donc un pré-requis indispensable, mais l'analyse des gènes codant pour les antigènes vaccinaux doit impérativement être réalisée sur toutes les souches étudiées.

Ceci s'explique par la relative stabilité des gènes ciblés par la MLST, qui sont des gènes de ménage essentiels au fonctionnement métabolique de la bactérie. Les mutations sur ces gènes apparaissent donc relativement lentement. Au contraire, les gènes codant pour les protéines de membrane composant le vaccin Bexsero<sup>®</sup> sont sujets à des mutations plus rapides et fréquentes<sup>18</sup>.

Cette étude ne pourra fournir qu'une première estimation de la susceptibilité des souches néo-calédoniennes au vaccin. En effet, la présence des allèles correspondant aux antigènes vaccinaux est un argument de poids pour prédire l'efficacité du vaccin Bexsero<sup>®</sup> sur une population de méningocoques. Néanmoins, ces gènes peuvent être présents mais non exprimés, comme le montre la capacité du méningocoque à moduler l'expression de son génome selon divers mécanismes décrits précédemment. Le laboratoire GSK a mis au point la technique MATS pour s'affranchir de ces variations dans le taux d'expression des protéines ciblées par le vaccin. A ce jour, de nombreuses études ont permis de comparer profil allélique et taux de liaison aux Ac post vaccinaux par la technique MATS. Ces études ont confirmé la variabilité de l'expression des protéines membranaires selon les souches de MenB, même pour un profil génétique identique. Il semble que certains variants antigéniques soient tout de même constamment associés à un taux d'expression suffisant pour être liés par les Ac induits par la vaccination. Pour d'autres variants, le taux d'expression devra être mesuré par la technique MATS, qui déterminera si le niveau d'expression membranaire est assez élevé pour obtenir une potentielle bactéricidie.

Notre étude aboutira donc à une estimation de l'efficacité potentielle du vaccin Bexsero<sup>®</sup> sur les souches de MenB. Cette estimation sera ultérieurement affinée par la technique MATS, appliquée sur un échantillon représentatif de nos souches. Cette technique n'est réalisable que dans certains laboratoires spécialisés en collaboration avec le laboratoire GSK.

## II- Recensement et récupération des souches correspondant aux critères de l'étude

Les cas d'IIM sont constamment adressés et diagnostiqués à l'hôpital, et non en laboratoire de ville, en raison de la gravité des symptômes. Tous les cas d'IIM en NC passent donc soit par le CHT de Nouméa, soit par le CHN (Koumac ou Poindimié). Les prélèvements du CHT

sont traités à l'IPNC. Le laboratoire de biologie médicale du CHN retransmet toutes les cultures positives à méningocoques à l'IPNC pour analyses complémentaires et conservation du germe dans le souchier.

Au final, l'IPNC conserve les souches de l'ensemble des cas d'IIM diagnostiqués sur le territoire, à l'exception des cas diagnostiqués sans obtention de la souche en culture (cocci Gram négatif en diplocoques à l'examen direct du LCR, recherche d'antigènes solubles par agglutination positive sur le LCR). Nous considérons donc que cette collection de souches est représentative des lignées de méningocoques responsables d'IIM en NC.

Le laboratoire de biologie médicale de l'IPNC est équipé du logiciel Inlog comme système informatique de laboratoire depuis 2004. Ce logiciel nous a permis de réaliser une extraction de données pour recenser tous les cas d'IIM du sérotype B diagnostiqués biologiquement depuis la mise en place d'Inlog. La base de données ainsi obtenue rassemble la grande majorité des cas survenus sur le territoire durant cette période et nous a permis d'estimer l'épidémiologie locale des IIM (avec une légère sous-estimation due aux rares cas où la culture est restée négative au laboratoire du CHN).

Depuis 2000, tous les méningocoques isolés en culture à l'IPNC ou transmis par le laboratoire du CHN sont conservés à -80°C pour une durée indéterminée.

Sur la période 2000-2015, le souchier contient 48 souches répondant aux critères de notre étude : MenB isolé dans une hémoculture ou un LCR.

Tout méningocoque issu d'un autre type de prélèvement est exclu car son caractère invasif n'est pas prouvé.

### III- Protocole

#### A. Extraction de l'ADN

Les 48 souches de méningocoques du sérotype B sélectionnées ont été remises en culture sur gélose polyvitex à 37°C, en atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>.

Quarante-six souches ont poussé en culture en 24 à 48h et 2 souches ne se sont pas développées en culture. Tous les isolats ont été identifiés par spectrométrie Maldi-TOF pour vérifier la nature du germe.

Après mise en suspension de quelques colonies dans 2mL de PBS, une extraction a été réalisée sur système automatisé MagnaPur (Roche). A partir d'une prise d'essai de 200µL, un

éluat de 50µL contenant l'ADN bactérien a été obtenu. Le reste de la suspension bactérienne (1,8 mL) a été conservé à -20°C pour analyses complémentaires si besoin.

Les 2 souches qui n'ont pas donné de colonies en culture ont été extraites directement à partir des microbilles de l'échantillon congelé, selon le même protocole. Une suspension d'ADN de concentration suffisante a ainsi été obtenue.

## B. Multi Locus Sequence Typing (MLST)

### 1) Amplification des gènes d'intérêt

Les 7 gènes à étudier pour réaliser le typage génétique des souches et les amorces nécessaires à l'amplification sont détaillés sur le site <http://pubmlst.org/neisseria/>.

Sept paires d'amorces sont nécessaires pour réaliser les 7 réactions de PCR puis 7 autres paires pour la réaction de séquence (amorces internes au 1<sup>er</sup> produit de PCR). Les amorces ont été commandées chez Eurogentec.

Gènes	Sens de l'amorce	Identification	Amorces pour la PCR
<i>abcZ</i>	Forward	abcZ-P1C	5-TGTTCCGCTTCGACTGCCAAC-3
	Reverse	abcZ-P2C	5-TCCCCGTCGTAAAAACAATC-3
<i>adk</i>	Forward	adk-P1B	5-CCAAGCCGTGTAGAATCGTAAACC-3
	Reverse	adk-P2B	5-TGCCCAATGCGCCAATAC-3
<i>aroE</i>	Forward	aroE-S1A	5-TTTGAAACAGGCGTTGCGG-3
	Reverse	aroE-S2	5-CAGCGGTAATCCAGTGCGAC-3
<i>fumC</i>	Forward	fumC-P1B	5-TCCCCGCCGTAAAAGCCCTG-3
	Reverse	fumC-P2B	5-GCCCGTCAGCAAGCCAAC-3
<i>gdh</i>	Forward	adh-P1B	5-CTGCCCCGGGGTTTTTCATCT-3
	Reverse	adh-P2B	5-TGTTGCGCGTTATTTCAAAGAAGG-3
<i>pdhC</i>	Forward	pdhC-P1B	5-CCGGCCGTACGACGCTGAAC-3
	Reverse	pdhC-P2B	5-GATGTCGGAATGGGGCAAACA-3
<i>pgm</i>	Forward	pgm-P1	5'-CTTCAAAGCCTACGACATCCG-3'
	Reverse	pgm-P2	5'-CGGATTGCTTTTCGATGACGGC-3'

Tableau 3 : amorces utilisées pour l'amplification des gènes nécessaires au typage par MLST

La PCR a été réalisée selon le même protocole pour les 7 gènes amplifiés, la température d'hybridation des amorces étant identique. Les ADN ont été amplifiés par PCR en point final avec la Red Hot Taq Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.) sur thermocycleur Veriti 96 puits (Applied Biosystems Inc.).

Réactif	Volume (µL)
H2O	14,3
Tp Taq Pol 10X	2,5
MgCl2, 25mM	2,5
dNTP 2mM mix	2,5
Primer 1 20µM	0,5
Primer 2 20µM	0,5
Platinum Taq Pol 5u/µl	0,2
ADN	2 µL

Tableau 4 : Mix réactionnel pour l'amplification des gènes de la MLST.

Au final, l'amplification des 7 gènes de ménage pour chacune des 48 souches a permis d'obtenir 336 échantillons d'ADN.

L'amplification a été contrôlée par migration sur gel d'agarose 1,2%. Aux 25 µL de mélange réactionnel ont été rajoutés 5 µL de bleu de charge pour un volume final de 30 µL. Une prise d'essai de 12 µL a été déposée dans les puits du gel d'agarose pour migration. La taille des amplicons a été comparée à celle attendue selon les données issues du site pubmlst.org (tableau 6).

Gène	Taille (pb)
<i>abcZ</i>	755
<i>adk</i>	524
<i>aroE</i>	806
<i>fumC</i>	767
<i>gdh</i>	769
<i>pdhC</i>	784
<i>pgm</i>	794

Tableau 6 : Taille attendue des fragments amplifiés telles que décrites sur pubmlst.org

94°C, 2 min	34 cycles
94°C, 1min	
56°C, 1min	
72°C, 1min	
72°C, 5min	
4°C, infini	

Tableau 5 : Cycles d'amplification pour la PCR MLST

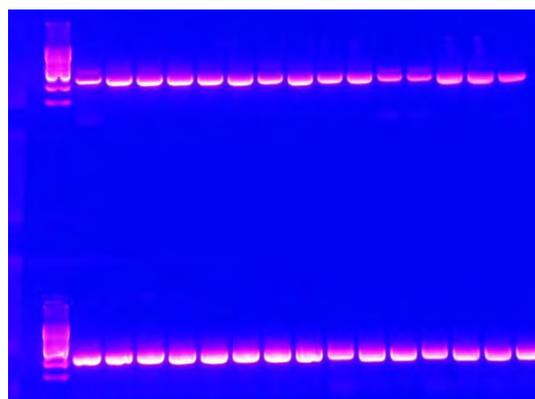


Figure 11 : contrôle de l'amplification du gène *pgm* par migration sur gel d'agarose

La migration sur gel est également une 1<sup>re</sup> étape de purification de l'ADN amplifié. Pour chaque échantillon, la bande majoritaire a été récupérée par découpe du gel, donc séparée d'éventuels amplicons non spécifiques.

Les bandes de gel contenant l'ADN amplifiée ont ensuite été purifiées sur colonne QIAquick, gel extraction kit (QIAGEN). L'ADN a été récupéré dans un volume final de 15µL.

Pour 6 des 7 gènes étudiés par MLST (*abcZ*, *adk*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* et *pgm*), la migration des produits de PCR sur gel a fait apparaître une bande de taille attendue fortement majoritaire pour les 48 ADN de méningocoques. Ces 6 gènes ont donc été correctement amplifiés pour toutes les souches de méningocoque.

Concernant le gène *aroE*, 7 isolats sur 48 n'ont pas été amplifiés.

Nous avons tenté de diminuer la spécificité de l'hybridation des amorces en abaissant la température d'hybridation de 55°C à 53°C puis 51°C, puis en augmentant la concentration en MgCl<sub>2</sub> (2,5mM à 3,5mM). Cette diminution de la stringence n'a pas permis d'amplifier le gène *aroE* pour ces 7 souches.

La PCR a donc été réalisée en remplaçant les amorces prévues pour la PCR par celles initialement dessinées pour la réaction de séquence. Nous avons obtenu une bande majoritaire à environ 800pb (correspondant à la taille attendue) et une bande secondaire à environ 200pb non prise en compte car considérée comme une amplification non spécifique. Le produit de PCR a été découpé et purifié pour séquençage.

Pour les 336 échantillons, les concentrations en ADN mesurées sur spectrophotomètre NanoDrop 2000 (ThermoFisher) étaient comprises entre 2,9 et 69,9 ng/µL. Les échantillons de concentration inférieure à 10 ng/µL ont été considérés comme trop faiblement concentrés pour assurer un séquençage de bonne qualité. Cinquante-et-une PCR sur 336 ont donc été lancées une 2<sup>de</sup> fois avec un nombre de cycles supérieur pour augmenter la concentration finale du produit de PCR (40 cycles au lieu de 34). La totalité des 30 µL du mélange réactionnel post-amplification a été déposée sur gel, puis les bandes ont été découpées et purifiées.

Des échantillons contenant le gène amplifié à une concentration supérieure à 10 ng/µL ont ainsi été obtenus pour l'ensemble des souches de méningocoques et pour tous les gènes de la MLST.

## 2) Séquençage

Les amorces nécessaires au séquençage sont également décrites sur le site [pubmlst.org](http://pubmlst.org), ainsi que le protocole de la réaction de séquence.

Gènes	Sens de l'amorce	Identification	Amorces pour la réaction de séquence
<i>abcZ</i>	Forward	abcZ-S1C	5'-AATCGTTTATGTACCGCAGR-3'
	Reverse	abcZ-P2C	5'-GAGAACGAGCCGGGATAGGA-3'
<i>adk</i>	Forward	adk-P1B	5'-AGGCWGGCACGCCCTTGG-3'
	Reverse	adk-P2B	5'-CAATACTTCGGCTTTCACGG-3'
<i>aroE</i>	Forward	aroE-S1A	5-GCGGTCAAYACGCTGRTK-3
	Reverse	aroE-S2	5-ATGATGTTGCCGTACACATA-3
<i>fumC</i>	Forward	fumC-P1B	5-TCCGGCTTGCCGTTTGTGTCAG-3
	Reverse	fumC-P2B	5-TTGTAGGCGGTTTTGGCGAC-3
<i>gdh</i>	Forward	adh-P1B	5'-CCTTGGCAAAGAAAGCCTGC-3'
	Reverse	adh-P2B	5-RCGCACGGATTCATRYGG-3
<i>pdhC</i>	Forward	pdhC-P1B	5'-TCTACTACATCACCTGATG-3'
	Reverse	pdhC-P2B	5'-ATCGGCTTTGATGCCGATTT-3'
<i>pgm</i>	Forward	pgm-P1	5'-CGGCGATGCCGACCGCTTGG-3'
	Reverse	pgm-P2	5'-GGTGATGATTCGGTYGCRCC-3'

Tableau 7 : amorces utilisées pour le séquençage des gènes nécessaires au typage par MLST

La réaction de séquence et le séquençage capillaire ont été réalisés par la société Macrogen (Corée du Sud) après envoi de nos produits de PCR purifiés. Les séquences et chromatogrammes bruts obtenus en retour ont été assemblés puis nettoyés à l'aide du logiciel Staden-Package.

## C. Typage des gènes codant pour les antigènes vaccinaux

### 1) Amplification des gènes d'intérêt

Les amorces utilisées pour l'amplification de *fHbp*, *nhba* et *nadA* ont été initialement décrites par Jacobsson et al.<sup>68</sup> en 2006 et reprises dans la majorité des publications suivantes<sup>60,66,67</sup>. Les amorces pour l'amplification du gène *porA* puis le séquençage de la région variable 2 (VR2) sont issues des travaux de Lucidarme et al.<sup>67</sup>.

Les PCR en point final et la purification ont été réalisées avec le même matériel que pour la MLST.

Gènes	Sens de l'amorce	Identification	Amorces pour la PCR
<i>nhba</i>	Forward	nhba-F	5'-GGCGTTCAGACGGCATATTTTTACA-3'
	Reverse	nbha-R	5'-GGTTTATCAACTGATGCGGACTTGA-3'
<i>nadA</i>	Forward	nadA-A	5'-GTCGACGTCCTCGATTACGAAGG-3'
	Reverse	nadA-B	5'-CGAGGCGATTGTCAAACCGTTC-3'
<i>fHbp</i>	Forward	Nmfhbp_F_Murph	5'-CTATTCTGCGTATGACTAGGAG-3'
	Reverse	Nmfhbp_R_Murph	5'-GTCCGAACGGTAAATTATCGTG-3'
<i>porA</i>	Forward	NmporA_F	5'-ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTC-3'
	Reverse	NmporA_R	5'-AATGAAGGCAAGCCGTCAAAAACA-3'

Tableau 8 : amorces utilisées pour l'amplification des gènes codant pour les antigènes vaccinaux

Les amorces utilisées en 1<sup>re</sup> intention pour amplifier *fHbp* (Holst *et al.*<sup>66</sup>) ne nous ont pas permis d'obtenir une amplification. La migration sur gel post-PCR a mis en évidence un ensemble de bandes non spécifiques sans bande majoritaire identifiable comme le gène recherché. Le protocole initial utilisant ces amorces<sup>68</sup> était réalisé à l'aide d'une technique de PCR en temps réel. L'amplification de *fHbp* a donc été tentée sur LightCycler (Roche) à 2 températures d'hybridation différentes (61 et 63°C), sans obtenir de meilleurs résultats. Une reprise de la littérature a permis d'identifier un autre couple d'amorces ciblant le gène *fHbp*. Cette paire d'amorces, détaillées dans la publication de Murphy *et al.*<sup>54</sup>, a été commandée chez Eurogentec. La PCR a été réalisée dans les conditions décrites ci-dessous.

Tableau 9 : Mélange réactionnel pour l'amplification des gènes codant pour les antigènes vaccinaux.

concentrations finales :	
MgCl <sub>2</sub> 2,5mM, dNTP 200µM, P1P2 210nM	
Mix	1 tube (µl)
H <sub>2</sub> O	24
Tp Taq Pol 10X	4
MgCl <sub>2</sub> , 25mM	4
dNTP mix 2mM	4
Primer 1 10µM	0,85
Primer 2 10µM	0,85
Platinum Taq Pol 5u/µl	0,3
ADN	2
Volume total	40

<i>fHbp</i>	<i>nadA</i>	<i>nhba</i>	<i>porA</i>	
<b>95°C, 2 min</b>				
95°C, 1min	95°C, 30sec	95°C, 30sec	95°C, 30sec	
59°C, 1min	63°C, 30sec	56°C, 30sec	68°C, 1min	<b>40 cycles</b>
72°C, 1min	72°C, 1min	72°C, 1min	72°C, 2min	
<b>72°C, 5min</b>				
<b>4°C, infini</b>				

Tableau 10 : Conditions de PCR pour l'amplification des gènes codant pour les antigènes vaccinaux

## 2) Séquençage

Le séquençage des 4 gènes a également été sous-traité à Macrogen et l'interprétation des séquences a été réalisée à l'IPNC de la même façon que pour les gènes de la MLST.

Gènes	Sens de l'amorce	Identification	Amorces pour le séquençage
<i>nhba</i>	Forward	nhba-F	5'-GGCGTTCAGACGGCATATTTTACA-3'
	Reverse	nhba-R	5'-GGTTTATCAACTGATGCGGACTTGA-3'
	Forward	nhba-4	5'-GGCGTTCTGCACGGTCGAGG-3'
	Reverse	nhba-82	5'-CCTCGACCGTGCAGAACGCC-3'
<i>nadA</i>	Forward	nadA-A	5'-GTCGACGTCCTCGATTACGAAGG-3'
	Reverse	nadA-B	5'-CGAGGCGATTGTCAAACCGTTC-3'
	Forward	nadA-2	5'-GAAATAGAAAAGTTAACAACCAAGTT-3'
	Reverse	nadA-5	5'-GTAGCGATATCAGCTTTGATGTC-3'
<i>fHbp</i>	Forward	fhbp_F_murph	5'-CTATTCTGCGTATGACTAGGAG-3'
	Reverse	fhbp_R_murph	5'-GTCCGAACGGTAAATTATCGTG-3'
	Forward	fHbp-S2	5'-CAAATCGAAGTGGACGGGACG-3'
	Reverse	fHbp-S3	5'-TGTTTCGATTTGCCGTTTCCCTG-3'
<i>porA</i>	Forward	porA_VR2_F	5'-TCCGTACGCTACGATTCTCC-3'
	Reverse	porA_VR2_R	5'-GGCGAGATTCAAGCCGCC-3'

Tableau 11 : amorces utilisées pour le séquençage des gènes codant pour les antigènes vaccinaux

## IV- Base de données Pubmlst.org

La base de données en ligne Pubmlst (<http://pubmlst.org/>) regroupe les profils génétiques de dizaines de milliers d'isolats de différentes espèces bactériennes, dont *Neisseria spp.* Cet outil en ligne permet d'obtenir l'allèle associé à une séquence génétique pour chacun des gènes étudiés en MLST, ainsi que l'allèle et le peptide associé pour chaque gène codant pour

un antigène du vaccin Bexsero® (fHBP, NHBA, NadA, domaine VR2 de PorA). Les séquences nucléotidiques obtenues après séquençage sont entrées directement sur le site qui identifie un gène, un allèle connu si la séquence est identique, et éventuellement le peptide ou variant antigénique associé à la séquence.

Une fois tous les allèles identifiés, ce site permet également d'entrer une combinaison des 7 allèles obtenus pour la MLST et d'obtenir un séquence-type ainsi que le complexe clonal auquel il appartient. Dans le cas où la combinaison d'allèle ne correspond à aucun séquence-type connu, les ST les plus proches sont identifiés et classés par ordre de proximité (1 locus de différence, puis 2 loci, puis 3...).

La base de données fournit des informations pour chaque profil génétique connu et déposé dans cette base. Il est ainsi possible, pour un ST donné, de savoir le nombre de souches recensées dans le monde, leur localisation géographique, l'année d'isolement, le caractère invasif ou de portage, le sérotype associé.

Cet outil en ligne a donc permis de réaliser le typage génétique des 48 souches de notre panel, autant pour le profil génétique par MLST que pour les 4 gènes codant pour les antigènes du vaccin.



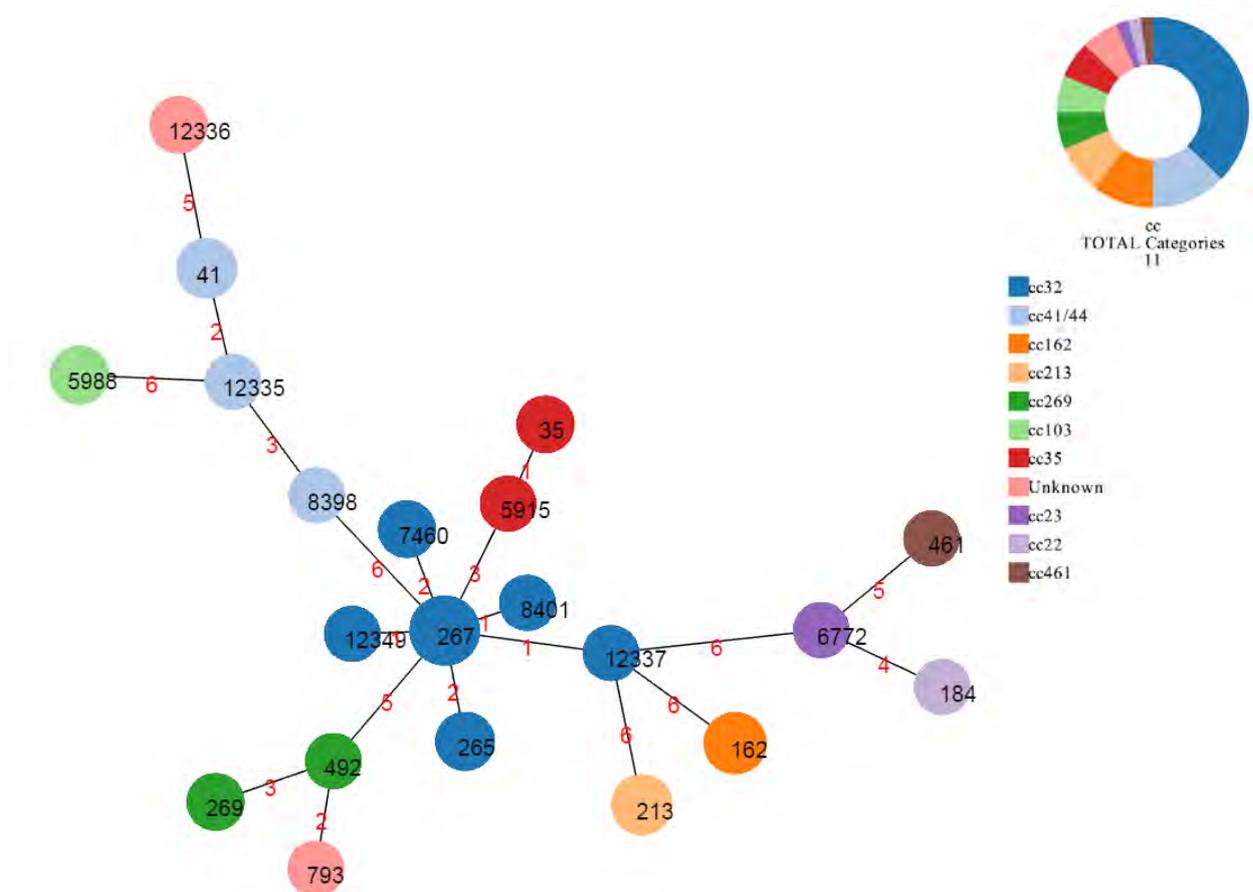


Figure 13. Arbre phylogénétique réalisé sur Phyloviz online. Chaque rond représente un ST obtenu au moins une fois dans notre série. Les chiffres en rouge indiquent le nombre d'allèles différents entre les ST reliés par un trait noir. Les couleurs correspondent au cc associé au ST.

Le ST-267 est le plus représenté dans notre série, avec 10 isolats (20,8% des souches). Il est isolé régulièrement entre 2001 et 2015, soit sur l'intégralité de l'intervalle de temps durant lequel nos souches ont été recrutées. Après consultation de la base de données pubmlst.org, il apparaît que ce ST n'a été décrit qu'en NC, où son implication dans les IIM semble récurrente. Il appartient au cc32 qui est le complexe clonal majoritaire en NC, avec 18 souches sur 48, soit 37,5% des isolats.

De même, parmi les isolats appartenant au cc32, les ST 8401, 12337 et 12349 sont très proches du ST-267 et n'ont été décrits qu'en NC. Le ST-267 et le ST-8401 ne diffèrent que par un SNP sur le gène *abcZ*. Le ST-12337 diffère du ST-267 par un SNP en début de séquence et 4 pb en fin de séquence du gène *adk*. Le ST-12349 se démarque par l'acquisition d'un nouvel allèle du gène *aroE*, non décrit jusqu'à présent.

Par ordre de fréquence, les ST les plus fréquemment retrouvés sont ensuite le ST-162 (10,4%, n = 5), le ST-213 (8,3%, n = 4) et le ST-41 (8,3%, n = 4). Ce sont les ST centraux des cc 162, 213 et 41/44 qui totalisent respectivement 10,4% (n =5), 8,3% (n = 4) et 12,5% (n = 6) des souches de notre panel.

Les cc 35, 269 et 103 sont chacun représentés par 3 souches (6,25%).

On note la persistance dans le temps du cc41/44, qui est régulièrement impliqué dans les IIM entre 2001 et 2012. Six souches appartenant à ce ST ont été identifiées, réparties dans 3 ST. Seul le ST-41 est isolé plusieurs fois (n = 4) entre 2007 et 2012.

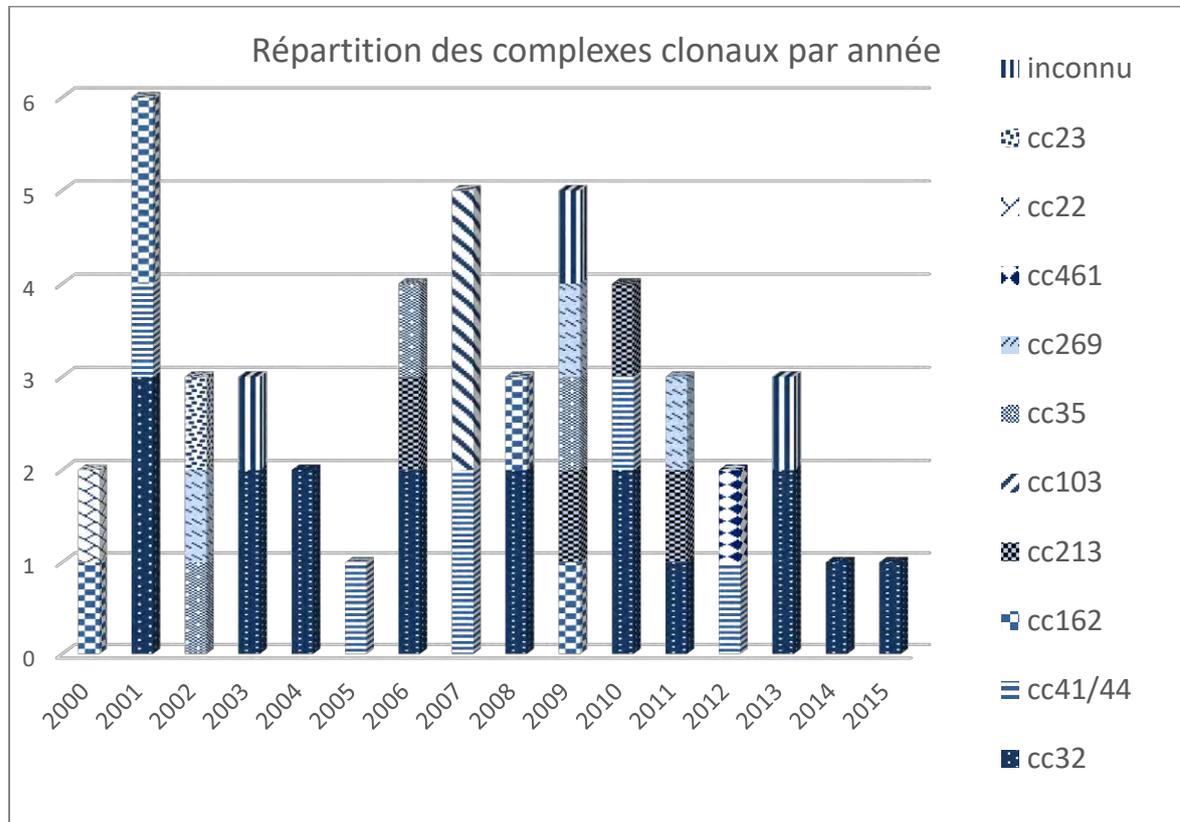


Figure 14. Répartition par année des complexes clonaux des MenB en NC

## II- Diversité allélique des gènes codant pour les antigènes vaccinaux

### A. Allèles obtenus pour le gène *fHbp*

L'amplification du gène *fHbp* a produit un amplicon unique d'environ 1400pb pour nos 48 souches. La taille attendue du gène est comprise entre 744 et 905pb, d'après l'ensemble des allèles recensés sur pubmlst.org.

Deux nouveaux allèles du gène *fHbp* ont été identifiés dans notre série. Ils ont été incorporés à la base de données pubmlst.org sous les dénominations 1223 et 1224, codant pour les peptides fHBP-1.962 et fHBP-1.963.

Les différents travaux portant sur la réponse immune après exposition aux sous-variants de fHBP s'accordent sur le fait qu'une immunité croisée existe pour les peptides appartenant au même variant (1, 2 ou 3), mais qu'elle est faible voire nulle entre peptides appartenant à des variants différents<sup>55,69,70</sup>. Le vaccin Bexsero® intégrant le sous-variant 1.1, une protection immune efficace peut être obtenue contre les souches porteuses d'un peptide appartenant au variant 1. Avant même réalisation du test MATS, les souches avec un peptide fHBP appartenant aux variants 2 et 3 doivent être considérées comme non couvertes pour cet antigène.

Cette notion d'immunité croisée doit être nuancée, car les taux de liaison aux Ac induits par fHBP 1.1 diffèrent selon le sous-variant (1.1, 1.4, 1.13, 1.14, 1.15...) et selon le taux d'expression de fHBP par chaque souche.

Des allèles codant pour un peptide du variant 1 ont été retrouvés dans 26 souches sur les 48 de notre panel. Vogel *et al.*<sup>55</sup> ont déterminé par test MATS le taux de liaison aux Ac post vaccinaux des principaux sous-variants de fHBP identifiés sur un échantillon de 1052 souches européennes (figure 15). Nos isolats expriment une partie de ces sous-variants, ce qui permet d'estimer l'efficacité du vaccin sur l'antigène fHBP de ces souches. Dans cette étude européenne, sur 129 isolats possédant l'allèle 1 de *fHbp*, codant pour le sous-variant 1.1 (celui inclus dans le vaccin), 100% étaient associés à un potentiel relatif en MATS largement supérieur au seuil de bactéricidie, indiquant une efficacité du vaccin contre toutes les souches possédant l'allèle 1 de *fHbp*. L'allèle codant pour le sous-variant fHBP-1.1 est présent dans 14 souches de notre panel. Ces souches appartiennent toutes au cc32. Les 4 autres souches du cc32 de notre panel expriment toutes des peptides fHBP du variant 1 : fHBP-1.89 (n =1), fHBP-1.510 (n =2) et fHBP-1.962 (n= 1).

L'allèle 4, codant pour le sous-variant 1.4, était également fortement représenté parmi les souches européennes. Il est associé à un potentiel relatif en MATS moins élevé que le variant 1.1, mais également supérieur au seuil de bactéricidie dans 100% des cas. De même l'allèle 14, codant pour le sous-variant 1.14, est associé à un potentiel relatif généralement supérieur au seuil de bactéricidie. La médiane du potentiel relatif pour les isolats possédant l'allèle 13, codant pour le sous-variant 1.13, est situé quasiment au niveau du seuil de bactéricidie, laissant supposer une plus faible affinité des Ac post vaccinaux pour cet antigène. Ces 3 allèles sont présents dans notre panel et concernent uniquement des souches du cc41/44 : un isolat possède fHBP-1.4, 3 possèdent fHBP-1.13 et un possède fHBP-1.14. La 6<sup>e</sup> souche du cc41/44 contient fHBP-2.19.

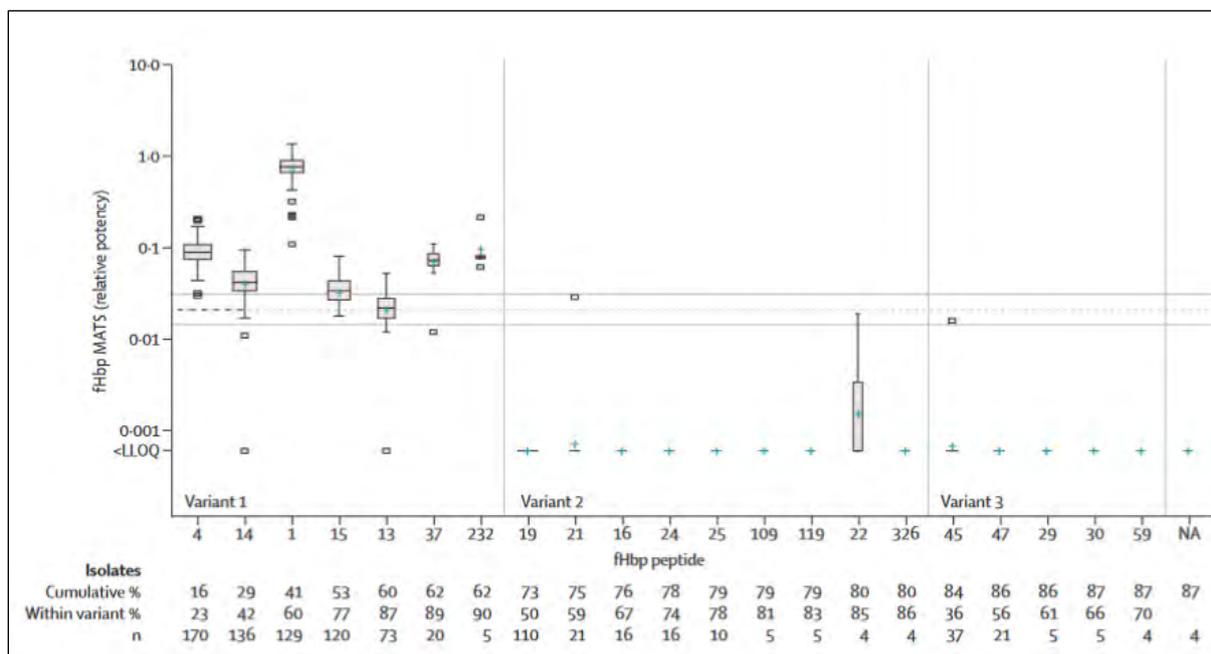


Figure 15. Distribution des potentiels relatifs en MATS pour le peptide fHBP d'isolats de MenB européens. La ligne en pointillés représente le seuil de bactéricidie positive et les lignes pleines l'intervalle de confiance à 95%. Les boîtes montrent la médiane et les espaces interquartiles (EI). Les segments supérieurs indiquent le 75<sup>e</sup> percentile + 1,5EI et les segments inférieurs indiquent le 25<sup>e</sup> percentiles - 1,5EI. D'après Vogel *et al.*, 2013. Predicted strains coverage of a meningococcal multicomponent vaccine (4CMenB) in Europe : a qualitative and quantitative assessment<sup>55</sup>.

Dans notre série, 4 souches du cc162 sur 5 possèdent l'allèle codant pour fHBP-1.502. La 5<sup>e</sup> héberge fHBP-2.21. Parmi les souches du cc213, une seule possède fHBP-1.933 et les 3 autres possèdent un peptide fHBP du variant 3.

Les peptides 1.502, 1.510, 1.89, 1.962 et 1.963 n'ont pas bénéficié d'évaluation du taux de liaison moyen aux Ac post vaccinaux dans l'étude de Vogel *et al.* car ils n'étaient pas assez représentés parmi les souches européennes.

On constate donc que la totalité des peptides du variant 1 de fHBP sont regroupés dans 4 cc sur les 11 identifiés dans notre série : cc32, cc41/44, cc162, cc213. Ces 4 cc, sont donc potentiellement les seuls à être couverts par les Ac post-vaccinaux ciblant l'antigène fHBP. Les souches du cc32 de notre panel possèdent majoritairement le même antigène fHBP que celui inclus dans le vaccin et peuvent donc être considérées comme fortement liées par les Ac post vaccinaux.

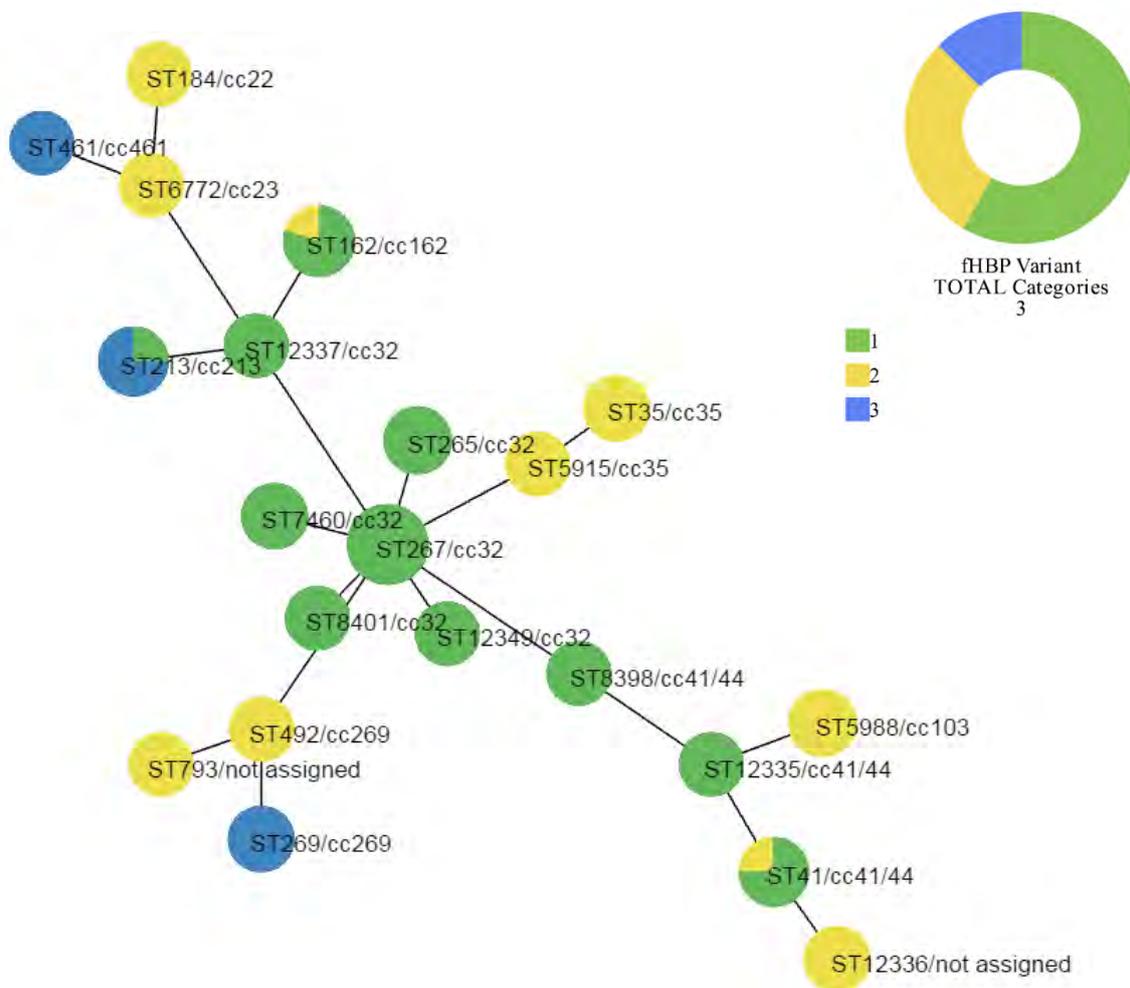


Figure 16. Arbre phylogénétique des isolats de MenB selon le typage par MLST, réalisé sur phyloviz online. Chaque rond symbolise les souches appartenant à un ST, dont le numéro apparaît en noir, ainsi que le cc associé. Les couleurs correspondent aux variants de fHBP associés aux différents ST.

Une estimation haute de l'efficacité du vaccin Bexsero® sur les antigènes fHBP de nos souches doit donc considérer comme couvertes toutes les souches exprimant un peptide appartenant au variant 1, soit 26 souches sur 48 (54,2%). Une estimation basse tiendra compte uniquement des 16 souches sur 48 (33,3%) exprimant les sous-variants 1.1 (n = 14 ; 29,2%), 1.4 (n = 1 ; 2,1%) et 1.14 (n = 1 ; 2,1%), qui sont associés à une bactéricidie des Ac post-vaccinaux dans 100% des cas dans l'étude de Vogel *et al.*

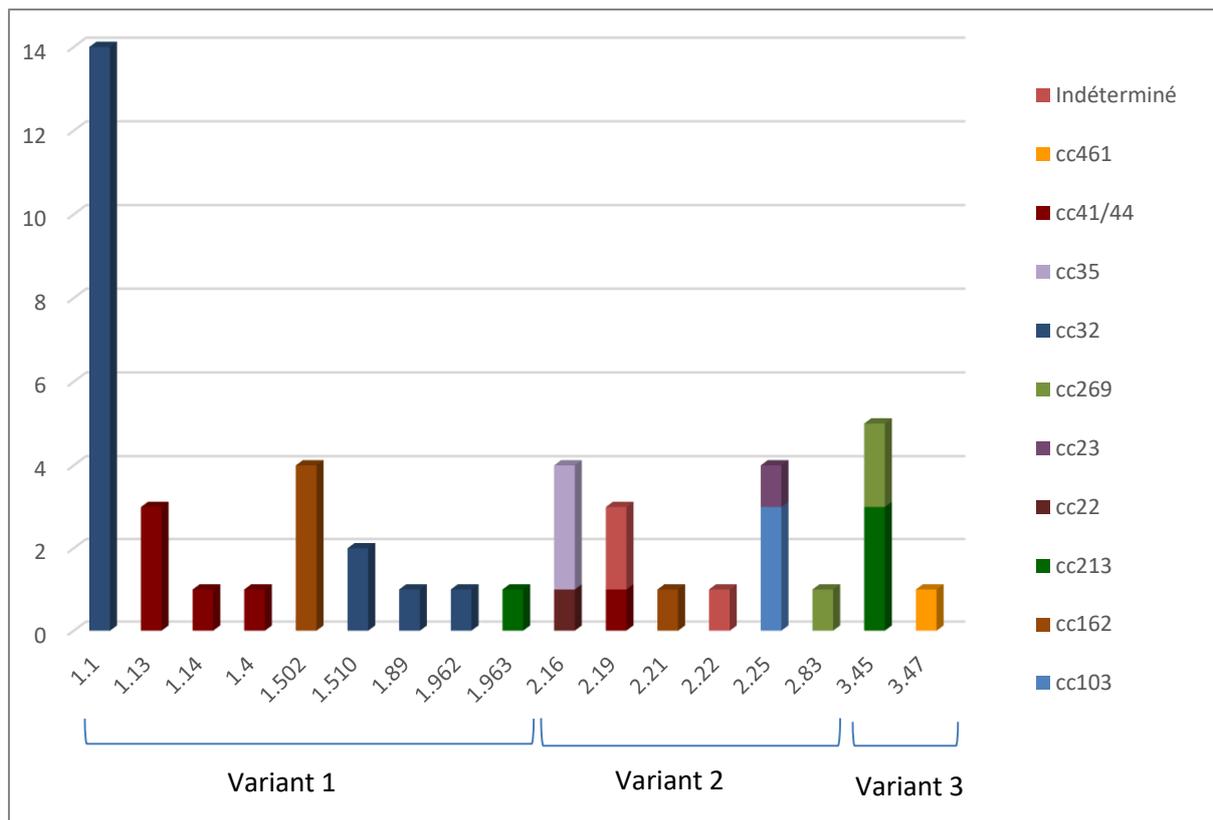


Figure 17. Répartition des variants et sous-variants de fhBP selon le cc de rattachement.

## B. Allèles obtenus pour le gène *nhba*

Les 48 ADN ont été amplifiés et ont donné un produit de PCR de taille hétérogène compris entre 1000 et 1500pb. On dénombre 930 allèles connus pour *nhba* sur la base de données de Pubmlst.org. Les séquences sont toutes comprises entre 1254 et 1506 pb (à l'exception de 3 séquences de 2129, 2339 et 2715 pb contenant des éléments d'insertion), ce qui correspond aux produits de PCR obtenus pour nos 48 souches.

Allèle	Peptide	n	%
5	3	5	10,4
17	29	4	8,3
147	47	4	8,3
11		3	6,2
1018	20	1	2,1
3		1	2,1
15	24	3	6,2

19		3	6,2
14	21	2	4,2
189	91	3	6,2
1004	937	3	6,2
270		2	4,2
1005	33	1	2,1
33	18	2	4,2
258	115	2	4,2
1006	936	2	4,2
1	2	1	2,1
10	7	1	2,1
85	197	1	2,1
109	262	1	2,1
1003	936	1	2,1
1011 (frameshift)	-	1	2,1
1012 (frameshift)	-	1	2,1
Total		48	100

Tableau 13. Distribution des allèles *nhba* et peptides NHBA correspondants.

On observe une grande hétérogénéité parmi les souches de notre panel avec 23 allèles du gène *nhba*, codant pour 17 peptides différents. Le nombre de peptides est inférieur au nombre d'allèles en raison de polymorphismes silencieux (3 allèles différents codent pour le peptide 20, 2 allèles codent pour le peptide 21 et 2 allèles codent pour le peptide 33) et car 2 allèles n'ont pas de peptide associé. Les séquences des allèles 1011 et 1012 contiennent un changement du cadre de lecture normal du gène qui impacte probablement l'expression d'un peptide fonctionnel. En l'absence de recherche de la synthèse de peptide NHBA par Western-blot et avant le test MATS, nous considérons que le peptide NHBA est absent de la membrane externe et ne peut contribuer à l'efficacité du vaccin contre ces isolats.

Nous décrivons 7 nouveaux allèles du gène *nhba*. Ces allèles sont maintenant référencés en tant que *nhba* 1003, 1004, 1005, 1006, 1011, 1012 et 1018.

L'allèle 5 codant pour le peptide 3 est le plus représenté ( $n = 5$  ; 10,4%) et 3 souches (6,2%) possèdent ce même allèle avec un polymorphisme mononucléotidique entraînant une variation d'un acide aminé de la séquence peptidique (nouvel allèle 1004, peptide 937). Les 8 souches appartiennent au cc32.

Les allèles les plus représentés sont ensuite le 147 et le 17 ( $n = 4$  ; 8,3%), puis les allèles 11, 15, 19 et 189 ( $n = 3$  ; 6,2%).

Toutes les souches de méningocoques génotypées dans le monde jusqu'à présent contiennent le gène *nhba*, et les études pré-cliniques sont en faveur d'une protection croisée entre la plupart des types de peptides NHBA<sup>35</sup>. Hormis les 2 isolats porteurs des allèles 1011 et 1012 pour lesquels il est probable que le peptide NHBA ne soit pas synthétisé,

le principal écueil à la protection conférée par les Ac post-vaccinaux anti-NHBA est donc le taux d'expression membranaire de l'antigène par la bactérie.

Selon l'étude de Vogel *et al.*, le taux d'expression du peptide varie suffisamment entre les souches porteuses du même allèle pour que certaines ne soient pas couvertes par les Ac post-vaccinaux (figure 18). Seules les souches possédant l'allèle 1, codant pour le peptide 2, sont couvertes à quasiment 100%. Concernant les autres peptides identifiés dans notre panel, les peptides 3, 20 et 21 (présents dans 15 de nos isolats) sont associés à un potentiel relatif en MATS supérieur au seuil de bactéricidie pour environ 75% des souches européennes testées.. Les souches porteuses des peptides 18 et 47 de l'étude de Vogel *et al.* étaient toutes insuffisamment liées par les Ac post vaccinaux anti-NHBA pour atteindre le seuil de bactéricidie. Ces 2 peptides sont présents dans 6 de nos souches, qui doivent être considérées comme non couvertes par les Ac post vaccinaux anti-NHBA. Les autres peptides de notre panel n'étaient pas assez représentés parmi les souches européennes pour bénéficier d'une évaluation en MATS dans cet article.

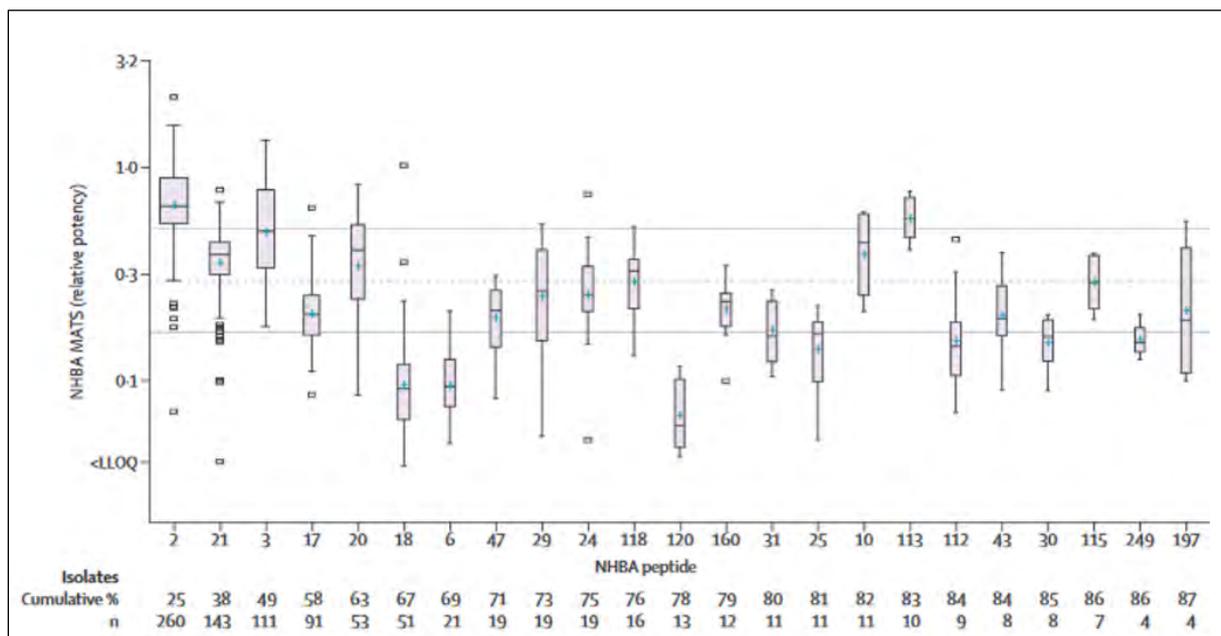


Figure 18. Distribution des potentiels relatifs en MATS pour le peptide NHBA d'isolats de MenB européens. La ligne en pointillés représente le seuil de bactéricidie positive et les lignes pleines l'intervalle de confiance à 95%. Les boîtes montrent la médiane et les espaces interquartiles (EI). Les segments supérieurs indiquent le 75<sup>e</sup> percentile + 1,5EI et les segments inférieurs indiquent le 25<sup>e</sup> percentiles - 1,5EI. D'après Vogel *et al.*, 2013. Predicted strains coverage of a meningococcal multicomponent vaccine (4CMenB) in Europe: a qualitative and quantitative assessment<sup>55</sup>.

Ainsi, l'estimation de couverture par les Ac post vaccinaux anti-NHBA la plus conservatrice tiendra compte uniquement des souches exprimant le peptide 2, soit 1 souche sur 48 (2,1%).

L'estimation de couverture la plus optimiste, probablement supérieure au taux réel qui sera obtenu par MATS, est de 83,3%, c'est-à-dire l'ensemble de nos isolats sauf ceux possédant les peptides 18 ou 47 et porteurs des allèles 1011 et 1012.

### C. Allèles obtenus pour le gène *nadA*

Les allèles connus de *nadA* sont répertoriés dans la base de données pubmlst.org. La taille du gène varie entre 750 et 2064 pb.

L'amplification de l'ADN de 19 souches de méningocoque a donné un produit de PCR d'environ 2000pb, après vérification de l'amplification par dépôt et migration sur gel. Un ADN a donné un produit de PCR à environ 1500pb. Ces fragments amplifiés correspondent donc à la taille attendue pour le gène *nadA*, encadré de séquences non codantes en amont et en aval du gène.

Dix-sept ADN ont donné un amplicon majoritaire de 400pb. Deux ont été séquencés et identifiés comme des séquences partielles de *nadA*. Ces 17 amplicons de 400 pb ont donc été considérés comme des gènes *nadA* tronqués et non fonctionnels.

Les 11 ADN restants n'ont pas produit de bande majoritaire ce qui permet de conclure à l'absence du gène *nadA*.

Au final, seuls les 20 isolats sur 48 ayant donné un amplicon d'au moins 1500pb ont été considérés comme porteurs d'un gène *nadA* potentiellement fonctionnel.

Le séquençage de ces gènes a mis en évidence 3 profils différents.

Dix-sept isolats possèdent l'allèle 1, codant pour le peptide 1 du variant 1 (NadA-1.1). Toutes ces souches appartiennent au cc32 (ST 265, 267, 7460, 8401, 12349, 12337). Il s'agit précisément de 17 isolats sur les 18 de notre panel appartenant au cc32.

Le 18<sup>e</sup> isolat appartenant au cc32 possède également le gène *nadA*. Son amplification a donné un produit de PCR de 1500pb dont la séquence ne correspond à aucun allèle connu. Cette séquence a été envoyée pour analyse sur Pubmlst.org et identifiée comme un gène tronqué, ne permettant pas la synthèse du peptide NadA.

Deux isolats du ST-213 possèdent l'allèle 40, codant pour un peptide appartenant au variant 4/5. Bambini et al. ont montré que les allèles codant pour un peptide appartenant au variant 4/5 sont généralement associés à un décalage du cadre de lecture au niveau de la région codante, aboutissant à l'expression d'une protéine tronquée non fonctionnelle. Ce décalage du cadre de lecture étant sujet à des variations de phase, l'expression de la protéine au sein

d'un clone reste possible à différents niveaux dépendant à la fois de l'allèle en question et de la proportion de bactéries en phase « on ». Concernant l'allèle 40, il semble qu'il soit non exprimé dans la majorité des cas<sup>30</sup>.

La présence d'un gène *nadA* fonctionnel et l'allèle associé sont donc fortement liés au cc.

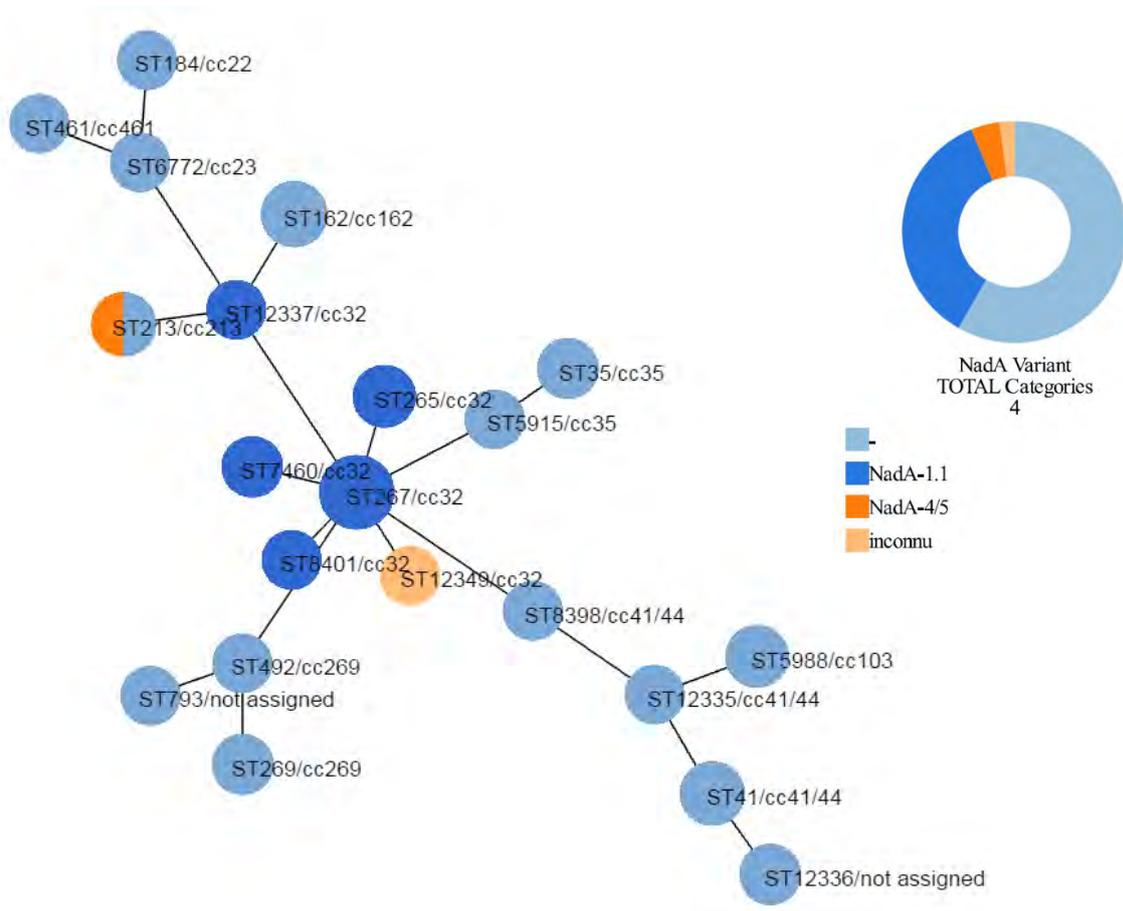


Figure 19. Arbre phylogénétique des isolats de MenB selon le typage par MLST, réalisé sur phyloziz online. Les couleurs correspondent aux gènes *nadA* associés aux ST.

Le peptide spécifique intégré au vaccin Bexsero® est NadA-3.8. Celui-ci n'est retrouvé chez aucune de nos souches. En raison d'une proximité structurelle des variants 1 et 3 de NadA, une immunité croisée a été observée entre les peptides appartenant à ces variants<sup>30</sup>. Les 17 souches appartenant au cc32 de notre panel possédant l'allèle 1 codant pour NadA-1.1 peuvent donc être liées par les Ac post vaccinaux, à condition que le taux d'expression de l'antigène soit assez élevé.

Le taux d'expression de NadA étant fortement variable<sup>30,59</sup>, le taux de protection vaccinale estimé en ne considérant que NadA varierait donc entre 0% et 35,4% (17/48).

## D. Allèles obtenus pour la région variable 2 (VR2) de *porA*

La région du gène *porA* codant pour le fragment VR2 de la protéine a été séquencée pour l'ensemble de nos souches. Le locus VR2 est défini sur Pubmlst.org par la séquence peptidique associée. Nous décrivons une nouvelle séquence, codant pour le peptide VR2 14-53 (PorA P1.14-53).

Une souche sur 48 possède le variant 4 de VR2, identique à celui présent dans le vaccin. L'immunité croisée étant faible entre les différents variants de PorA, seule cette souche peut être considérée comme liée par les Ac post vaccinaux anti-PorA. En conséquence, la protection immune conférée par l'antigène PorA du vaccin Bexsero® est négligeable sur les souches de MenB de NC.

## III- Analyse phylogénétique par combinaison du Séquence-Type et du profil antigénique

Le typage par MLST permet de suivre l'évolution d'un clone dans le temps sur le territoire et de comparer les ST présents à une échelle plus large, voire globale. Cependant, comme la littérature le laissait envisager, nos résultats montrent que certains ST sont associés à diverses combinaisons d'antigènes vaccinaux. En effet, les gènes codant pour les antigènes vaccinaux sont sujets à des mutations rapides, alors que les gènes étudiés en MLST sont des gènes de ménage relativement conservés. Ceci explique que certains antigènes sont particulièrement liés à un cc mais qu'au sein des cc, on retrouve une diversité antigénique importante liée à de fréquentes mutations et acquisitions horizontales de nouveaux allèles.

cc	ST	NHBA		NadA		fHBP		PorA		N° isolat
		Gène	Peptide	Gène	Peptide	Gène	Peptide	VR1	VR2	
cc22	184	3	20	-	-	16	2.16	18-1	3	10
cc23	6772	10	7	-	-	25	2.25	12-1	13-1	18
cc32	265	270	33	1	NadA-1.1	1	1.1	7	16	15
cc32	265	270	33	1	NadA-1.1	1	1.1	7	16	16
cc32	265	1005 (SNP/270)	33	1	NadA-1.1	1	1.1	7	16	3
cc32	267	5	3	1	NadA-1.1	1	1.1	7	16	14
cc32	267	5	3	1	NadA-1.1	1	1.1	7	16-51	30
cc32	267	5	3	1	NadA-1.1	1	1.1	7-2	16	38
cc32	267	1004 (SNP/5)	937	1	NadA-1.1	1	1.1	7	16	6
cc32	267	1004 (SNP/5)	937	1	NadA-1.1	1	1.1	7	16	22
cc32	267	1004 (SNP/5)	937	1	NadA-1.1	1	1.1	7	16	43
cc32	267	109	262	1	NadA-1.1	1	1.1	7	16	19
cc32	267	1006	938	1	NadA-1.1	1	1.1	7-2	16	41
cc32	267	1006	938	1	NadA-1.1	1223	1.962	7-2	16	40
cc32	267	1003	936	1	NadA-1.1	1	1.1	7	16	42
cc32	7460	17	29	1	NadA-1.1	593	1.510	18-1	30-1	31
cc32	7460	17	29	1	NadA-1.1	593	1.510	18-1	30-8	39
cc32	8401	5	3	1	NadA-1.1	1	1.1	7	16	45
cc32	12349	1012	-	Tronqué	-	1	1.1	7	16	35
cc32	12337	5	3	1	NadA-1.1	97	1.89	7	16	24
cc35	35	19	21	-	-	16	2.16	22-1	14	2
cc35	35	19	21	-	-	16	2.16	22-1	14	21
cc35	5915	19	21	-	-	16	2.16	22-1	14-53	29
cc41/44	41	189	91	-	-	13	1.13	18-23	25	7
cc41/44	41	189	91	-	-	13	1.13	18	25	49
cc41/44	41	189	91	-	-	13	1.13	12-1	13-2	36
cc41/44	41	17	29	-	-	19	2.19	12-1	13-2	23
cc41/44	8398	17	29	-	-	4	1.4	17-1	23	11
cc41/44	12335	1	2	-	-	14	1.14	7-2	4	20
cc103	5988	15	24	-	-	25	2.25	5-1	10-4	46
cc103	5988	15	24	-	-	25	2.25	5-1	10-4	47
cc103	5988	15	24	-	-	25	2.25	5-1	10-4	48
cc162	162	11	20	-	-	582	1.502	22	14	12
cc162	162	11	20	-	-	582	1.502	22	14	13
cc162	162	11	20	-	-	582	1.502	22	14	28
cc162	162	1011 (SNP/600)	-	-	-	582	1.502	22	14	1
cc162	162	1018 (SNP/11)	20	-	-	21	2.21	22	14	25
cc213	213	258	115	40	NadA-4/5	65	3.45	22	14	8
cc213	213	258	115	40	NadA-4/5	65	3.45	22	14	33
cc213	213	33	18	-	-	65	3.45	18-1	3	4
cc213	213	33	18	-	-	1224	1.963	22	14	27
cc269	269	147	47	-	-	65	3.45	19-1	15-11	34
cc269	269	147	47	-	-	65	3.45	19-1	15-11	50
cc269	492	14	21	-	-	67	2.83	7	14-6	17
cc461	461	85	197	-	-	71	3.47	19-12	13-1	37
Indéterminé	12336	147	47	-	-	19	2.19	19-14	15	9
Indéterminé	12336	147	47	-	-	19	2.19	19-14	15	26
Indéterminé	793	14	21	-	-	22	2.22	17-1	23-2	44

Tableau 14. Profil génétique (MLST et antigènes) des isolats de MenB isolés en NC entre 2001 et 2015. N° d'isolat : dénomination attribuée dans notre série, qui peut être retrouvée sur l'arbre phylogénétique de la figure 20. La mention SNP/X signifie que l'allèle nouvellement décrit se différencie de l'allèle X par un polymorphisme

Nous avons supposé que l'association des 7 gènes de la MLS<sub>T</sub> et des gènes constituant le profil antigénique pourrait affiner encore le typage des souches et permettre d'identifier des souches impliquées dans des épidémies ou des cas groupés sur une courte période.

Un profil génétique composé des séquences assemblées des 7 gènes de la MLS<sub>T</sub> et des gènes *fhbp*, *nhba* et *porA* a été réalisé. Le gène *nadA* n'a pas pu être intégré car il était absent du génome d'une partie de nos souches. Pour le gène *porA*, nous avons ciblé une séquence d'environ 500 pb, rassemblant les régions codant pour VR1 et VR2 et la séquence située entre ces 2 régions.

Un arbre phylogénétique a été réalisé en prenant en compte l'ensemble des gènes typés, l'année d'isolement des souches et leur origine géographique en NC (figure 20).

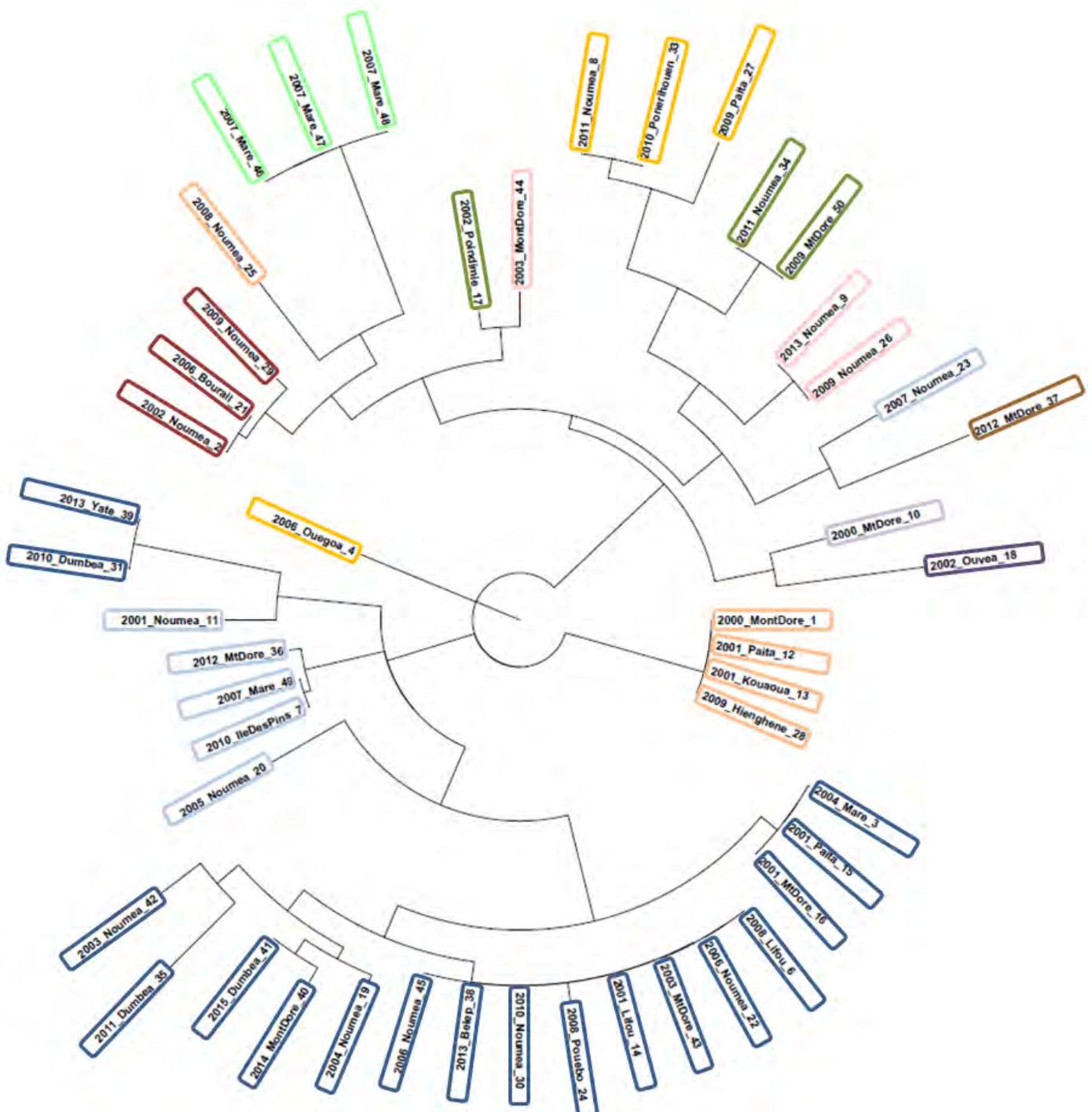




Figure 20. Arbre phylogénétique réalisé sur le logiciel Seaview4, à partir de l'assemblage des séquences nucléotidiques des 7 gènes du MLST et de 3 gènes codant pour des antigènes vaccinaux (*fhbp*, *nhba*, *porA*).

L'interprétation des distances génétiques entre les différentes souches de cet arbre est délicate. En effet, ce n'est pas l'identification des allèles mais les séquences génétiques dans leur ensemble qui ont été utilisées pour le construire. Ainsi, le gène *fhbp* ayant une taille 2 fois supérieure aux gènes typés en MLST, l'acquisition d'un nouveau gène *fhbp* induira une distance génétique 2 fois plus importante que s'il s'agissait de *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* ou *pgm*. Cet arbre peut donc être utilisé pour repérer les isolats ayant un profil génétique identique, mais reflète imparfaitement la phylogénie des souches, de par le poids différent accordé aux mutations par acquisition horizontale. Au contraire, les mutations de type SNP et autres mutations d'acquisition verticale, créant des polymorphismes chez des souches d'origine commune et proche, entraînent peu d'éloignement sur cet arbre et sont donc intégrées de façon plus significative. Ainsi, la souche n°4 est éloignée des 3 autres souches du cc213 car elle a acquis un gène *fhbp* du variant 1 alors que les 3 autres ont un gène du variant 3.

L'analyse phylogénétique des 48 MenB de notre panel a mis en évidence des clusters ayant un profil génétique identique pour les 10 gènes étudiés, ainsi que des souches ayant des profils extrêmement proches. Cependant, on observe rarement le même profil génétique dans la même zone géographique au cours de la même année. Le seul évènement de ce type concerne les 3 cas associés au ST5988 (cc103), qui ont eu lieu entre janvier et mars 2007 sur l'île de Maré. Ces 3 souches ont un profil génétique parfaitement identique et 2 d'entre elles ont été isolées à un jour d'intervalle chez 2 enfants de la même famille (5 et 7 ans). Ce clone a donc été responsable d'une épidémie localisée en 2007. Ce ST n'avait jamais été isolé auparavant en NC et n'est pas réapparu après cette épidémie locale.

D'autres clusters sont suspectés d'avoir provoqué des épidémies mais les souches ont été isolées soit à plusieurs années d'intervalle, soit dans des localités diverses en NC, voire dans différentes îles. Trois isolats du ST162 (n°1, 12 et 13) possèdent exactement le même profil génétique et ont été isolés entre 2000 et 2001, dans des localités différentes. Ce même clone a ensuite réapparu en 2009 dans une autre localité de l'île (n° 28). Deux cas d'IIM causés par une souche clonale du ST12336 (n°9 et 26) ont été recensés à Nouméa, à 4 ans

d'intervalle. Deux cas ont été causés par une souche clonale du ST267 (n°15 et 16) en 2001 dans 2 villes proches géographiquement. En l'absence d'investigation épidémiologique de ces quelques groupes possibles de cas, il n'est pas possible de leur attribuer un caractère épidémique certain.

On identifie ainsi de nombreux clones donnant des cas sporadiques d'IIM, sans réelle persistance dans le temps en NC. Seules les souches du cc32 (majoritairement le ST267), semblent perdurer et être responsables d'une part importante des cas sur l'ensemble de la durée du recueil des souches. Cependant, il est rarement possible de les incriminer dans une épidémie locale car ces souches sont associées à différentes combinaisons d'antigènes vaccinaux. Ainsi, sur 10 isolats du ST 267, le typage des 4 antigènes vaccinaux fait apparaître 8 combinaisons d'antigènes différentes.

En conséquence, l'élément le plus notable à retirer de cette représentation est l'hétérogénéité importante que l'on retrouve chez les MenB en NC. Bien que notre panel soit de taille réduite, le nombre d'allèles identifiés pour chaque gène est élevé et les souches génétiquement identiques sont peu fréquentes. La diversité génétique au sein de l'espèce *N. meningitidis*, bactérie naturellement compétente et dotée d'une plasticité génétique élevée, transparait de ces résultats.

#### IV- Efficacité estimée du vaccin Bexsero®

La combinaison des taux de protection potentiels pour les 4 antigènes permet d'établir une estimation de l'efficacité du vaccin face à notre collection, sous la forme d'un intervalle relativement large qui devra être précisé par analyse de nos souches par la technique MATS. Il est établi que la présence dans un isolat de MenB d'un seul antigène sur 4 lié par les Ac post vaccinaux permet d'obtenir une activité bactéricide du sérum et donc de considérer les individus vaccinés comme protégés contre cette souche<sup>62</sup>.

L'estimation la plus basse (« hypothèse basse ») tiendra compte uniquement des souches porteuses de :

- fHBP-1.1, fHBP-1.4, fHBP-1.14 et/ou
- NHBA-2 et/ou
- PorA P1.4.

Ces allèles sont portés individuellement ou combinés chez **16 souches sur 48, soit 33,3%**.

Le taux de protection maximal (« hypothèse haute ») envisageable sur notre panel est atteint en prenant en compte toutes les souches porteuses de :

- un peptide fHBP appartenant au variant 1 et/ou
- tout peptide NHBA excepté les peptides 18 et 47 et/ou
- NadA-1.1 et/ou
- PorA P1.4.

La présence d'un ou plusieurs de ces peptides concerne **43 souches sur les 48 de notre panel, soit 89,6%**.

Une analyse plus détaillée au sein des cc les plus représentés fait apparaître des différences marquées.

Tous nos isolats du cc32 (n = 18) possèdent l'allèle codant pour fHBP 1.1 et/ou NadA-1.1 Les souches ne possédant pas fHBP-1.1 sont toutes porteuses d'un autre peptide fHBP du variant 1. Les isolats de notre panel faisant partie du cc32 bénéficient donc d'une forte couverture potentielle.

Le cc162 est représenté par 5 souches du ST-162, dont une possède un peptide fHBP du variant 1, une possède NHBA-20 et 3 expriment les 2. Ces antigènes ayant une probabilité élevée d'être liés par les Ac post vaccinaux, le cc162 sera probablement associé à une bonne efficacité du vaccin.

Concernant le cc213, 2 de nos souches expriment NHBA-18, peu réactif vis-à-vis des Ac post vaccinaux, et les 2 autres expriment NHBA-115, pour lequel les quelques souches européennes testées ont montré un taux de liaison relativement faible<sup>55</sup>. Concernant fHBP, 3 souches possèdent un peptide du variant 3 et une souche exprime fHBP-1.963, peptide nouvellement décrit donc à réactivité inconnue. Aucune n'exprime de peptide NadA ni PorA P1.4. Il est donc prévisible que l'efficacité du vaccin sur ces 4 souches sera fortement limitée.

Le cc41/44 regroupe 6 souches de notre panel. Une souche du ST-12335 possède NHBA-2 et PorA P1.4 et une souche possède fHBP-1.4. Elles sont donc couvertes par l'immunité post-vaccinale. Les 4 autres souches contiennent NHBA-24 ou 91, fHBP-1.13 ou 2.19, elles n'ont pas de gène *nadA* fonctionnel ni PorA P1.4. Ces peptides ne permettent pas de prévoir leur liaison aux Ac post vaccinaux. L'efficacité du vaccin sur nos souches du cc41/44 sera donc fortement dépendante du taux d'expression de NHBA.

Nous obtenons donc une 1<sup>re</sup> estimation de protection post-vaccinale sous la forme d'un intervalle large : 33,3 à 89,6% des MenB étudiés. Même si cet écart ne permet pas de statuer sur l'efficacité du vaccin, le but de cette étude préliminaire est atteint : le génotypage confirme que les souches présentes en NC possèdent en majorité des antigènes potentiellement liés par les Ac post vaccinaux. Il n'exclut pas la possibilité d'une efficacité importante du vaccin sur nos souches. Il est donc justifié de poursuivre la procédure d'évaluation d'efficacité du vaccin en déterminant le taux d'expression de chacun des antigènes par technique MATS.

## PARTIE IV : Discussion

### I- Diversité génétique des Méningocoques du séro groupe B en Nouvelle-Calédonie et intégration dans le contexte mondial

L'élément principal qui ressort du typage génétique par MLST et du séquençage des gènes codant pour les antigènes vaccinaux est la diversité des MenB en NC. Sur 48 isolats, nous dénombrons 21 ST répartis dans 10 cc, 23 allèles de *nhba*, 18 allèles de *fhbp*, 17 variants de *porA* VR2 et 2 allèles *nadA*. Nous décrivons 10 nouveaux allèles et 4 nouveaux ST, qui ont été intégrés dans la base de données mondiale pubmlst.org. Le nombre de souches avec un profil génétiquement identique est faible, en raison de variations fréquentes des antigènes vaccinaux au sein d'un même ST (voir figure 20).

L'étude de Vogel *et al.* intégrant 1056 souches européennes a mis en évidence les principaux cc responsables d'IIM à MenB en Europe. Les cc les plus fréquemment impliqués en Europe sont ainsi les cc 41/44 (37,1%), 269 (19,5%), 32 (14%) et 213 (6,7%)<sup>55</sup>. De même en Australie, aux Etats-Unis et en Afrique du Sud, les cc 41/44, 32, 269, 162 et 213 dominent parmi les isolats pathologiques<sup>71</sup> (annexe 3). Whelan *et al.* confortent ces données dans une revue globale des épidémies à MenB pour lesquelles un typage par MLST a pu être réalisé. Ils identifient les cc 41/44, 32 et 269 comme les principaux agents d'épidémies durables à MenB. Le cc162 est plus rarement impliqué dans les épidémies<sup>46</sup>.

Conformément aux proportions observées dans les autres régions du monde, ces 5 cc représentent 75% de nos isolats. En dépit de l'isolement géographique de la NC, les cc identifiés pour les souches de MenB de notre panel correspondent donc aux cc reconnus comme « hyperinvasifs » dans toutes les régions du monde. Nos isolats se démarquent par une prédominance du cc32, alors que le cc41/44 domine dans la plupart des régions du monde<sup>55</sup> (annexe 3).

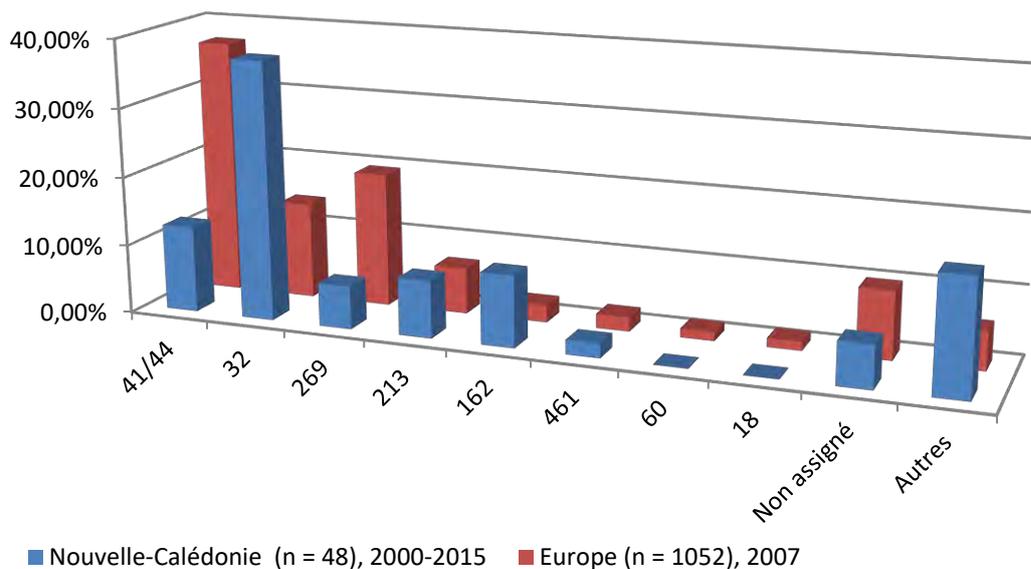


Figure 21. Comparaison des distributions des cc de MenB en NC (cette étude) et en Europe (Vogel *et al.*, 2013. Predicted strains coverage of a meningococcal multicomponent vaccine (4CMenB) in Europe: a qualitative and quantitative assessment)<sup>55</sup>.

Le ST267 prédomine largement au sein de notre panel, avec 10 isolats sur 48, impliqués dans des IIM entre 2001 et 2015, soit sur toute la durée du recueil des souches. A l’heure actuelle, ce ST est spécifique à la NC, aucun autre isolat n’ayant été mis en évidence ailleurs dans le monde. Parmi les 5 autres ST de notre panel appartenant au cc32, 3 sont également décrits uniquement en NC (ST8401, 12337 et 12349) et partagent 6 allèles sur 7 avec le ST267. Ils diffèrent du ST267 soit par un SNP, soit par l’acquisition d’un allèle jusqu’ici inconnu. Ces résultats sont en faveur d’une persistance du cc32 en NC sur un mode endémique et plus particulièrement du ST267, avec apparition progressive de mutations ponctuelles ou de recombinaisons créant de nouveaux ST, selon le schéma classique de diversification continue au sein de l’espèce *N. meningitidis*.

Hormis le ST-267, aucun ST ou même cc ne peut être considéré comme sévissant à l’état endémique en NC. Si les ST 162, 213 et 41 sont responsables de respectivement 5, 4 et 4 cas à quelques années d’intervalle, l’apparition des cas semble plus ponctuelle, sans persistance dans le temps. De plus leur répartition cosmopolite rend plausible l’importation régulière de nouvelles souches en NC, où le tourisme, les liens institutionnels avec la France et l’Europe et l’activité minière sont responsables d’échanges continus avec de nombreuses régions du monde.

Concernant les gènes codant pour les antigènes vaccinaux, la diversité rencontrée est encore plus importante que pour les gènes de ménage relativement conservés typés en MLST. En

effet, il s'agit de protéines de surface constamment soumises à la pression du système immunitaire. L'apparition d'Ac spécifiques conduit donc à la diversification continue des motifs de surface comme mécanisme d'échappement à l'immunité de l'hôte. Le gène *nadA* se démarque par la présence de seulement 2 allèles différents dans notre panel, contre au moins 17 pour les 3 autres antigènes. Cependant, ces 2 allèles semblent être restreints à 2 lignées particulières : l'allèle 40 est retrouvé dans 2 souches du cc213 et l'allèle 1 dans la plupart des souches du cc32. Ainsi le nombre restreint d'allèles *nadA* peut être expliqué par le fait que la majorité des souches ne possèdent pas de gène *nadA* fonctionnel, ce qui atteste du caractère accessoire de cette adhésine.

Il a été montré dans d'autres régions du monde que certains variants antigéniques étaient fréquemment, voire constamment, identifiés au sein des mêmes cc. Une étude rétrospective sur les méningocoques isolés sur une période 50 ans en Hollande avait permis d'observer que 100% des souches porteuses de l'allèle *nhba*-5 appartenaient au cc32, 100% des souches porteuses de l'allèle 33 appartenaient au cc213 et la majorité des souches porteuses de l'allèle 1 (codant pour le peptide inclus dans le vaccin) appartenaient au cc41/44<sup>72</sup>. Nos résultats concordent rigoureusement avec ces observations. Néanmoins, si des allèles *nhba* sont constamment associés à un cc en particulier, l'inverse n'est pas vrai : plusieurs allèles *nhba* sont présents dans un même cc (cf tableau 14).

Cette même étude a montré que 100% des souches hollandaises porteuses de fHBP-1.1 et/ou de NadA-1 faisaient partie du cc32, ce qui est retrouvé dans nos résultats<sup>72</sup>. Le variant 5 de NadA, secondairement regroupé avec le variant 4 dans le variant 4/5, a été mis en évidence essentiellement dans des isolats du cc213. Nous identifions cet allèle seulement pour 2 souches appartenant au cc213, ST-213<sup>72</sup>. Les 2 autres souches du ST213 de notre panel ne possèdent pas de gène *nadA* fonctionnel.

Ainsi, la diversité des lignées de MenB objectivée par MLST se double d'une diversité encore plus grande des protéines de surface au sein des cc. Certains variants de ces protéines sont significativement associés à un cc, mais il est impossible de prédire avec certitude le profil antigénique d'un isolat en fonction de son profil en MLST.

## II- Données préliminaires à l'instauration du vaccin Bexsero® en Nouvelle-Calédonie

### A. Prédominance du cc32 et impact sur l'efficacité du vaccin

Le typage des antigènes vaccinaux de nos isolats du cc32 aboutit à des résultats similaires à ceux récemment publiés en Australie par Mowlaboccus *et al.*<sup>71</sup> : tous nos isolats du cc32 (n =

18) possèdent un allèle codant pour un peptide fHBP du variant 1 et la majorité possède l'allèle codant pour NadA-1.1 (94% dans notre série). Le peptide fHBP inclus dans le vaccin, fHBP-1.1, est présent dans 77,8% de nos isolats.

Concernant l'expression de ces peptides, la plus importante étude européenne à ce jour<sup>55</sup> a montré par MATS que quasiment 100% des souches du cc32 étaient prédites comme lysées par les Ac anti-fHBP induits par la vaccination, ce qui corrobore nos résultats et laisse supposer que l'antigène fHBP est constamment exprimé à la surface des MenB du cc32, (voire de la totalité des MenB).

De plus, il a été démontré dans des modèles expérimentaux simulant les conditions *in vivo* que l'expression de NadA est fortement majorée en conditions mimant l'infection. Ainsi, la présence de 4-hydroxyméthyl acétate, molécule présente dans la salive, permet de lever la répression de la synthèse de NadA médiée par *nadR* et entraîne la lyse des bactéries au contact des Ac post vaccinaux<sup>56</sup>. Ces données nous permettent d'espérer une forte efficacité du vaccin sur ces souches porteuses de NadA-1.1.

Avant même vérification par MATS, le vaccin Bexsero® peut donc être considéré comme efficace sur le cc prédominant et endémique en NC, qui regroupe 37,5% des cas sur les 15 dernières années et apparaît comme durablement établi sur le territoire. L'instauration de la vaccination anti-méningococcique B des individus déficitaires en complément en NC est donc susceptible d'apporter un réel bénéfice à cette population à risque.

La diversité antigénique est plus forte au sein de ce cc pour l'antigène NHBA, avec 9 allèles codant pour 8 peptides différents. Au contraire, 15 isolats sur 18 possèdent PorA P1.16, ce qui montre une variabilité restreinte pour cet antigène, et implique une absence d'efficacité du vaccin sur l'antigène PorA de ces souches. Diverses études soutiennent nos données en affirmant que Por A P1.4 est associé majoritairement au cc41/44, et jamais au cc32<sup>71,73</sup>.

Au total, on retrouve très peu de souches génétiquement identiques pour l'ensemble des gènes *fHbp*, *nhba*, *nadA* et *porA*, ce qui est en faveur d'acquisitions de mutations ou de recombinaisons faisant progressivement varier le profil antigénique. Ce phénomène commun chez *Neisseria sp.* constitue un risque d'échappement du cc32 à l'immunité post-vaccinale s'il atteint *fHbp* ou *nadA*. Dans le cadre d'une vaccination ciblée des individus à risque, une influence de la vaccination sur le profil antigénique des lignées circulant en NC est néanmoins peu probable.

## B. Portée de l'estimation d'efficacité du vaccin avant détermination du taux d'expression des antigènes

Plusieurs études ont établi des corrélations entre cc et efficacité estimée du vaccin Bexsero®.

Les cc32 et 162 sont décrits comme fortement couverts par l'immunité post-vaccinale et les panels antigéniques que nous obtenons pour les isolats appartenant à ces cc laissent présager une efficacité similaire<sup>55,59,71</sup>.

Le cc213, représenté dans notre série par 4 souches du ST-213, a été décrit comme peu lié par les Ac postvaccinaux<sup>55</sup>. Sa forte prévalence en Espagne est avancée pour expliquer l'efficacité plus basse du vaccin Bexsero® dans ce pays par rapport aux autres pays européens<sup>59</sup>. Conformément aux études antérieures, le typage des antigènes de nos souches laisse présager une faible efficacité du vaccin. Bien qu'il ne représente que 8,33% de nos souches, ce cc a récemment émergé en Espagne et en Australie et sa prévalence doit être surveillée dans le contexte de mise en place du vaccin Bexsero®.

Une différence notable avec les isolats européens est observée pour la distribution des allèles de *nhba* et *porA* VR2. Le peptide NHBA-2 et la porine PorA de type P1.4, fortement associés au cc41/44, ont logiquement été incorporés dans le vaccin Bexsero® car ce sont les variants les plus fréquents dans de nombreuses des études (24,7% des souches européennes pour NHBA-2 ; 20,2% pour PorA P1.4<sup>55</sup>). Dans notre panel, le cc41/44 ne représente que 6 souches sur 48 et une seule souche (ST12335) possède NHBA-2 et PorA P1.4. Aucune autre souche ne possède ces variants qui ont donc chacun une fréquence de 2,1% dans notre série.

Bien que NHBA-2 soit quasiment absent dans notre panel, nous identifions de nombreux variants potentiellement liés par les Ac anti-NHBA. Leur taux d'expression étant variable, seul le MATS pourra permettre de conclure sur la liaison de nos isolats aux Ac post vaccinaux anti-NHBA. En revanche, la participation de l'antigène PorA à la protection immune conférée par le vaccin en NC est quasi-nulle.

Nos résultats aboutissent à une première estimation de l'efficacité du vaccin sous la forme d'une fourchette large : 33 à 90%. Néanmoins, cette première étape est indispensable avant de déterminer le taux d'expression par MATS. Cette technique étant peu accessible, le génotypage préalable des gènes codant pour les antigènes vaccinaux permet d'écarter les isolats dont le profil antigénique exclut une liaison aux Ac post vaccinaux. Le fait que notre estimation supérieure atteigne 90% indique une bonne concordance antigénique entre les variants portés par nos isolats et ceux inoculés par la vaccination. Seulement 10% des isolats ont un profil antigénique qui assure un échappement à l'immunité post vaccinale, quel que soit le taux d'expression des antigènes.

Les données sur l'efficacité du vaccin dans toutes les régions du monde sont satisfaisantes. Elles varient entre 66% au Canada et 91% aux Etats-Unis<sup>62</sup> (technique MATS). Le typage des souches néo-calédoniennes par MLST fait apparaître les mêmes lignées hyperinvasives que dans les autres régions du monde, avec une incidence plus élevée du cc32 qui est généralement le plus fortement impacté par le vaccin Bexsero®<sup>55,59</sup>. Il est donc probable que les résultats du test MATS dévoileront une forte efficacité du vaccin sur nos souches. La

combinaison des données d'efficacité mondiale, de nos estimations d'efficacité locale, de la prédominance et de la persistance du cc32 incite à mettre en place la vaccination par Bexsero® selon les recommandations vaccinales françaises avant-même la détermination du taux d'expression des antigènes, afin de combler le manque de protection contre le MenB des nombreux individus déficitaires dans le système du complément en NC<sup>26</sup>.

### III- Limites de l'étude et perspectives

Cette étude reflète la difficulté d'estimer l'efficacité d'un vaccin prévenant une maladie rare, dont l'incidence s'élève à 3 pour 100 000 habitants en NC. L'impossibilité de tester l'efficacité du vaccin par réduction de l'incidence des IIM sur une cohorte de patients avant sa mise sur le marché impose la mise au point de techniques alternatives, particulièrement pour un germe hypervariable comme *N. meningitidis*. Il est établi que ni l'identification des cc, ni le géotypage seuls des antigènes vaccinaux ne peuvent répondre avec certitude à la question de la protection contre les souches locales. La technique MATS permettra de s'affranchir des interrogations liées au degré d'expression des antigènes à la surface cellulaire. Cependant, cette technique présente plusieurs biais.

Premièrement, le taux de liaison aux Ac déterminé en MATS est valable pour des germes en conditions de croissance *in vitro*. Hors, le méningocoque est connu pour moduler l'expression de ses protéines selon le milieu dans lequel il se trouve, par des phénomènes de variation de phase. C'est notamment le cas pour l'adhésine NadA dont l'expression est fortement majorée *in vivo*. Une estimation du taux de liaison des Ac *in vivo* nécessiterait de reproduire les conditions d'infection avant de réaliser le test MATS.

De plus, il est généralement admis que les études d'efficacité du vaccin par séquençage des gènes codant pour les antigènes vaccinaux ou par MATS sous-estiment l'efficacité réelle du vaccin, car elles prennent en compte la liaison aux Ac (estimée ou mesurée) pour chaque antigène de façon séparée. Elles ne tiennent pas compte de l'effet synergique des Ac dirigés contre plusieurs antigènes bactériens, synergie qui peut compenser une faible affinité Ac-antigène<sup>35</sup>. Cette différence a été prouvée par comparaison de la lyse bactérienne estimée par technique MATS et mesurée par l'activité bactéricide du sérum humain (hSBA). En Angleterre et au Pays de Galles, le MATS a prédit une efficacité du vaccin sur 70% des MenB invasifs, contre une efficacité de 88% évaluée par le hSBA<sup>57</sup>.

Enfin, le vaccin inclut l'antigène PorA au sein de vésicules de membrane externe d'une souche de MenB néo-zélandaise. Bien que PorA soit la principale protéine immunogène de ces vésicules, celles-ci demeurent riches en divers antigènes membranaires dont la contribution à l'immunité vaccinale n'est pas évaluée par le test MATS.

Ainsi le test MATS est considéré comme une technique conservative et sous-estime probablement la bactéricidie obtenue contre les souches locales après vaccination. Une conclusion plus pertinente serait apportée rétrospectivement par l'évolution de l'incidence des IIM à MenB chez les individus vaccinés. A l'échelle de la NC, cette évaluation sera difficile à obtenir en raison de la taille réduite de l'échantillon d'individus vaccinés.

Dans le contexte spécifique de la NC, la vaccination contre les IIM revêt une importance toute particulière pour protéger les individus porteurs d'un déficit en complément. Cependant, il est justifié de s'interroger sur l'efficacité de la vaccination si le fonctionnement du système du complément est altéré. L'activité bactéricide sérique du complément est considérée comme primordiale dans la défense contre les IIM. Il est donc évident que les individus déficitaires dans ce pan de l'immunité innée sont particulièrement à risque de développer ce type d'infection. Les déficits de la voie alterne du complément, dont la cascade d'activation est indépendante des Ac, notamment les déficits en properdine, sont particulièrement associés à une surincidence des IIM. La synthèse d'Ac suite à la vaccination présente chez eux l'intérêt de mettre plus rapidement en jeu la voie classique et la voie des lectines qui sont Ac-dépendantes. Pour les individus présentant un déficit dans la voie finale commune du complément, il est peu probable que la synthèse d'Ac rétablisse l'activité du complément, le blocage se situant en aval de la cascade d'activation. L'étude néo-calédonienne parue en 2015 a montré que ce type de déficit est particulièrement présent en NC<sup>26</sup>. Cependant, le bénéfice de la vaccination chez ces patients a été établi par démonstration de la protection opsono-phagocytaire induite par les Ac post vaccinaux. Les déficits en facteur tardif du complément sont donc partiellement compensés par une activité phagocytaire accrue des cellules du système réticulo-histiocytaire médiée par la liaison des Ac post vaccinaux aux germes invasifs<sup>15</sup>. Ces observations justifient la mise en place des recommandations de vaccination anti-méningococcique de tous les individus déficitaires dans le système du complément<sup>25</sup>.

Il est envisageable que dans un futur proche, les indications du vaccin Bexsero® soient élargies en raison de son efficacité potentielle sur les méningocoques appartenant aux autres sérogroupes. En effet, les 4 protéines membranaires composant le vaccin sont retrouvées dans tous les isolats de l'espèce *N. meningitidis*. Les variants antigéniques du vaccin ont été sélectionnés pour leur distribution large spécifiquement parmi les principales lignées hyperinvasives de MenB. Cependant, ces variants ou des variants permettant une immunité croisée peuvent se retrouver dans des isolats exprimant d'autres polysaccharides capsulaires. Ainsi le test MATS réalisé sur des isolats de méningocoques des sérogroupes C, W, X et Y a montré qu'une partie d'entre eux étaient prédits comme lysés par les Ac induits par le vaccin Bexsero®<sup>62,74</sup>.

Les données obtenues à partir de cette étude ont montré que les MenB impliqués dans des IIM en NC appartenaient à des lignées variées. L'identification constante de nouvelles lignées, sans persistance dans le temps pour la plupart d'entre elles, conduit à penser qu'une part importante des cas seraient causés par des souches importées. Ainsi les estimations d'efficacité du vaccin sur ces souches pourraient ne pas correspondre à l'efficacité sur les futures souches importées. Cependant, les études d'efficacité réalisées dans toutes les régions du monde sont en faveur d'une couverture importante de l'ensemble des souches de MenB. De plus, une lignée apparaît comme établie durablement sur le territoire (cc32 ; ST-267 et ST apparentés) et notre étude est en faveur d'une efficacité élevée du vaccin sur cette lignée spécifique. Nos résultats fournissent donc un argument important pour la mise en place du vaccin Bexsero® en NC, mais engagent à surveiller l'évolution de la distribution des lignées de MenB impliquées dans des IIM en NC.

## CONCLUSION

Cette étude apporte une première description de la diversité des lignées de MenB circulant en NC. Les cc identifiés appartiennent aux lignées hyperinvasives les plus fréquentes dans le monde mais une particularité locale a été mise en évidence : le profil le plus représenté du panel de souches étudiées, le ST-267 (cc32), est endémique à cette région et y semble durablement implanté. D'autres profils génétiques très proches et spécifiques à la NC, appartenant également au cc32, émergent à partir de ce ST central, contribuant à la diversification génétique continue de l'espèce *N. meningitidis*.

En raison de l'hypervariabilité antigénique du méningocoque, l'efficacité du vaccin Bexsero® doit être évaluée sur les souches de MenB circulant sur un territoire donné avant sa mise en place. En 2<sup>e</sup> partie de cette étude, nous avons donc débuté cette évaluation par le génotypage des 4 gènes codant pour les protéines incluses dans le vaccin Bexsero®. Il s'agit d'une étape obligatoire avant de déterminer le taux de liaison aux Ac post vaccinaux *in vitro* (test MATS). A l'issue de ce génotypage, seulement 10% de nos souches affichent un profil antigénique permettant de prévoir qu'elles ne seront pas couvertes par le vaccin.

L'élément notable à ce stade de l'évaluation de l'efficacité du vaccin est la couverture assurée des souches du cc32, qui intègre 37,5% des isolats de notre étude. En effet, leur profil antigénique ainsi que les études publiées précédemment en Europe et en Australie permettent de considérer le vaccin Bexsero® comme efficace sur ces lignées de MenB, avant même la détermination du taux d'expression des antigènes. Pour les autres lignées de MenB, l'estimation de la protection vaccinale sera précisée par le test MATS.

Le vaccin Bexsero® apparaît donc déjà comme potentiellement bénéfique en NC dans les indications qui lui ont été attribuées en France métropolitaine. La vaccination systématique des nombreux patients identifiés comme déficitaires dans le système du complément est susceptible d'impacter l'incidence élevée des IIM en NC.

## ANNEXES

Annexe 1 : Sensibilité aux antibiotiques des méningocoques isolés entre 2005 et 2015 (tous sérogroupes confondus)

	PEN		OXA		AMO/AMP	C3G	NAL	CIP	CMP		RFA	
Phénotype	I	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S
Nombre de souches	3(12)	9(12)	1(11)	10(11)	24(24)	31(31)	5(5)	15(15)	4(37)	33(37)	1(37)	36(37)
Pourcentage de sensibilité		75%		90,90%	100%	100%	100%	100%		89,20%		97,30%

PEN : benzylpénicilline, OXA : oxacilline, AMO : amoxicilline, AMP : ampicilline, C3G : céphalosporine de 3<sup>e</sup> génération (céfotaxime ou ceftriaxone), NAL : acide nalidixique, CIP : ciprofloxacine, CMP : chloramphénicol, RFA : rifampicine.

Annexe 2 : Nouveaux Séquence-Types décrits parmi les souches de MenB de NC.

Identification de la souche dans notre série	<i>abcZ</i>	<i>adk</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdh</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>	ST	Complexe clonal
Isolat 20	10	6	9	5	9	6	7	12335	cc41/44
Isolats 9 et 26	20	6	63	2	9	38	2	12336	Non affilié
Isolat 24	4	5	5	4	6	60	8	12337	cc32
Isolat 35	4	10	825	4	6	60	8	12349	cc32

Annexe 3 : Revue de la littérature recensant les complexes clonaux les plus fréquents parmi les isolats de méningocoques du sérogroupe B

cc	Nouvelle-Calédonie (n = 48) 2000-2015	Espagne (n = 300) 2009-2010	Grèce (n =148) 1999-2010	France (n = 200) 2007-2008	Allemagne (n = 222) 2007-2008	Angleterre et Pays de Galle (n = 535) 2007-2008	Norvège (n = 41) 2007-2008	Italie (n = 54) 2007-2008	Afrique du Sud (n = 242) 2005-2008	Etats-Unis (n =304) 2000-2005
41/44	12,50%	7,00%	11,00%	40,50%	40,10%	31,60%	51,20%	55,50%	27,00%	32,20%
32	37,50%	16,00%	11,00%	26,50%	21,60%	5,80%	17,10%	14,80%	23,00%	32,20%
269	6,25%	18,00%	22,00%	8,50%	5,00%	32,90%	2,40%	0,00%	6,60%	5,60%
213	8,33%	17,67%	-	4,50%	4,10%	9,70%	0,00%	0,00%	1,24%	-
162	10,40%	6,00%	46,00%	2,00%	3,20%	1,90%	4,90%	7,40%	5,80%	6,30%
461	2,10%	8,00%	-	3,00%	0,50%	2,20%	0,00%	5,60%	-	-
60	0,00%	6,00%	-	0,00%	0,90%	2,10%	2,40%	0,00%	0,80%	-
18	0,00%	0,67%	-	1,00%	1,40%	1,70%	0,00%	0,00%	-	-
Non assigné	6,25%	13,33%	-	6,00%	19,40%	6,50%	22,00%	9,30%	2,10%	-
Autres	16,70%	7,70%	10,00%	8,00%	3,80%	5,60%	0,00%	7,40%	33,46%	23,70%

## REFERENCES :

1. Freney, J., Renaud, F., Hansen, W. & Bollet, C. in *Précis de Bactériologie Clinique* 915–941 (2000).
2. Tinsley, C. R. & Nassif, X. Analysis of the genetic differences between *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: two closely related bacteria expressing two different pathogenicities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 11109–11114 (1996).
3. Schoen, C., Kischkies, L., Elias, J. & Ampattu, B. J. Metabolism and virulence in *Neisseria meningitidis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, (2014).
4. Alonso, J.-M. & Taha, M.-K. Les infections à méningocoques en France : les données du Centre National de Référence. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie* **5**, 191–6 (2002).
5. Catenazzi, M. C. E. *et al.* A large genomic island allows *Neisseria meningitidis* to utilize propionic acid, with implications for colonization of the human nasopharynx. *Mol. Microbiol.* **93**, 346–355 (2014).
6. Deasy, A. M. *et al.* Nasal Inoculation of the Commensal *Neisseria lactamica* Inhibits Carriage of *Neisseria meningitidis* by Young Adults: A Controlled Human Infection Study. *Clin. Infect. Dis.* **60**, 1512–1520 (2015).
7. CMIT. in *E.PILLY 2016*
8. Gaillot, O. & Nassif, X. in *Rémic - référentiel en microbiologie médicale* 539–543
9. Lutte contre les épidémies de méningite à méningocoque : Guide pratique OMS.
10. Hill, D. J., Griffiths, N. J., Borodina, E. & Virji, M. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. *Clin. Sci.* **118**, 547–564 (2010).
11. Giancchetti, E., Torelli, A., Piccini, G., Piccirella, S. & Montomoli, E. *Neisseria meningitidis* infection: who, when and where? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **13**, 1249–1263 (2015).
12. Harrison, L. H. *et al.* Population Structure and Capsular Switching of Invasive *Neisseria meningitidis* Isolates in the Pre-Meningococcal Conjugate Vaccine Era—United States, 2000–2005. *J. Infect. Dis.* **201**, 1208–1224 (2010).

13. Feavers, I. M. & Pizza, M. Meningococcal protein antigens and vaccines. *Vaccine* **27**, B42–B50 (2009).
14. Sacchi, C. T. *et al.* Correlation between Serological and Sequencing Analyses of the PorB Outer Membrane Protein in the Neisseria meningitidis Serotyping System. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**, 348–354 (1998).
15. Lewis, L. A. & Ram, S. Meningococcal disease and the complement system. *Virulence* **5**, 98–126 (2014).
16. Rahman, M. M., Kahler, C. M., Stephens, D. S. & Carlson, R. W. The structure of the lipooligosaccharide (LOS) from the  $\alpha$ -1,2-N-acetyl glucosamine transferase (rfaKNMB) mutant strain CMK1 of Neisseria meningitidis: implications for LOS inner core assembly and LOS-based vaccines. *Glycobiology* **11**, 703–709 (2001).
17. Jolley, K. A. & Maiden, M. C. Using MLST to study bacterial variation: prospects in the genomic era. *Future Microbiol.* **9**, 623–630 (2014).
18. Brehony, C., Jolley, K. A. & Maiden, M. C. J. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 15–26 (2007).
19. Chang, Q., Tzeng, Y.-L. & Stephens, D. S. Meningococcal disease: changes in epidemiology and prevention. *Clin. Epidemiol.* **4**, 237–245 (2012).
20. Mell, J. C. & Redfield, R. J. Natural Competence and the Evolution of DNA Uptake Specificity. *J. Bacteriol.* **196**, 1471–1483 (2014).
21. Tan, A. *et al.* Distribution of the type III DNA methyltransferases modA, modB and modD among Neisseria meningitidis genotypes: implications for gene regulation and virulence. *Sci. Rep.* **6**, 21015 (2016).
22. Seib, K. L. *et al.* A novel epigenetic regulator associated with the hypervirulent Neisseria meningitidis clonal complex 41/44. *FASEB J.* **25**, 3622–3633 (2011).
23. Moxon, E. R. & Jansen, V. A. A. Phage variation: understanding the behaviour of an accidental pathogen. *Trends Microbiol.* **13**, 563–565 (2005).

24. Aguilera, J.-F., Perrocheau, A., Meffre, C., Hahne, S. & others. Outbreak of serogroup W135 meningococcal disease after the Hajj pilgrimage, Europe, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 761–7 (2002).
25. Haut Conseil de la Santé Publique. Vaccination des personnes immunodéprimés ou aspléniques - Recommandations. (2014).
26. Daures, M. *et al.* Relationships Between Clinico-Epidemiological Patterns of Invasive Meningococcal Infections and Complement Deficiencies in French South Pacific Islands (New Caledonia). *J. Clin. Immunol.* **35**, 47–55 (2015).
27. Stephens, D. S. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* **27**, B71–B77 (2009).
28. BOSIS, S., MAYER, A. & ESPOSITO, S. Meningococcal disease in childhood: epidemiology, clinical features and prevention. *J. Prev. Med. Hyg.* **56**, E121–E124 (2015).
29. Roupheal, N. G. & Stephens, D. S. *Neisseria meningitidis*: Biology, Microbiology, and Epidemiology. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **799**, 1–20 (2012).
30. Bambini, S. *et al.* *Neisseria* Adhesin A Variation and Revised Nomenclature Scheme. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **21**, 966–971 (2014).
31. Massari, P., Gunawardana, J., Liu, X. & Wetzler, L. M. Meningococcal Porin PorB Prevents Cellular Apoptosis in a Toll-Like Receptor 2- and NF- $\kappa$ B-Independent Manner. *Infect. Immun.* **78**, 994–1003 (2010).
32. Brandtzaeg, P., Kierulf, P., Gaustad, P., Skulberg, A. & Sørensen, E. Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis* (1989).
33. Join-Lambert, O. *et al.* Meningococcal Interaction to Microvasculature Triggers the Tissue Lesions of Purpura Fulminans. *J. Infect. Dis.* **208**, 1590–1597 (2013).
34. McNeil, L. K. *et al.* Role of Factor H Binding Protein in *Neisseria meningitidis* Virulence and Its Potential as a Vaccine Candidate To Broadly Protect against Meningococcal Disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **77**, 234–252 (2013).

35. Serruto, D., Bottomley, M. J., Ram, S., Giuliani, M. M. & Rappuoli, R. The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB: Immunological, functional and structural characterization of the antigens. *Vaccine* **30, Supplement 2**, B87–B97 (2012).
36. Strelow, V. L., Vidal, J. E., Strelow, V. L. & Vidal, J. E. Invasive meningococcal disease. *Arq. Neuropsiquiatr.* **71**, 653–658 (2013).
37. Direction Générale de la Santé. Guide pratique sur la conduite à tenir devant un ou plusieurs cas d'infections invasives à méningocoque. Annexe de l'instruction n °DGS/RI1/DUS/2014/301 du 24 octobre 2014 relative à la prophylaxie des infections invasives à méningocoque. (2014).
38. He, T., Kaplan, S., Kamboj, M. & Tang, Y.-W. Laboratory Diagnosis of Central Nervous System Infection. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **18**, 35 (2016).
39. CNR méningocoques. *Centre national de référence des méningocoques - rapport d'activité 2014*. (Institut Pasteur Paris, 2014).
40. Bonnet, R. *et al.* in *Recommandations* (2013).
41. EUCAST. Recommandations de l'EUCAST 2016 v6.0 : Breakpoint table.
42. Harcourt, B. H. *et al.* Population-Based Surveillance of *Neisseria meningitidis* Antimicrobial Resistance in the United States. *Open Forum Infect. Dis.* **2**, (2015).
43. Singhal, S. *et al.* Ciprofloxacin-Resistant *Neisseria meningitidis*, Delhi, India. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 1614–1616 (2007).
44. Taha, M.-K. *et al.* Multicenter Study for Defining the Breakpoint for Rifampin Resistance in *Neisseria meningitidis* by *rpoB* Sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3651–3658 (2010).
45. Ibarz-Pavón, A. B. *et al.* Laboratory-Based Surveillance of *Neisseria meningitidis* Isolates from Disease Cases in Latin American and Caribbean Countries, SIREVA II 2006–2010. *PLoS ONE* **7**, (2012).
46. Whelan, J., Bambini, S., Biolchi, A., Brunelli, B. & Robert–Du Ry van Beest Holle, M. Outbreaks of meningococcal B infection and the 4CMenB vaccine: historical and future perspectives. *Expert Rev. Vaccines* **14**, 713–736 (2015).

47. Pan, J. *et al.* The case of a new sequence type 7 serogroup X *Neisseria meningitidis* infection in China: may capsular switching change serogroup profile? *Int. J. Infect. Dis.* **29**, 62–64 (2014).
48. Martin, D. R., Ruijne, N., McCallum, L., O’Hallahan, J. & Oster, P. The VR2 Epitope on the PorA P1.7-2,4 Protein Is the Major Target for the Immune Response Elicited by the Strain-Specific Group B Meningococcal Vaccine MeNZB. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**, 486–491 (2006).
49. Wedege, E., Rosenqvist, E., Fr, L. O. & others. Serotyping and subtyping of *Neisseria meningitidis* isolates by co-agglutination, dot-blotting and ELISA. *J. Med. Microbiol.* **31**, 195–201 (1990).
50. Thompson, E. A. L., Feavers, I. M. & Maiden, M. C. J. Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. *Microbiol. Read. Engl.* **149**, 1849–1858 (2003).
51. Leca, M., Bornet, C., Montana, M., Curti, C. & Vanelle, P. Meningococcal vaccines: Current state and future outlook. *Pathol. Biol.* **63**, 144–151 (2015).
52. Holst, J. *et al.* Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV). *Hum. Vaccines Immunother.* **9**, 1241–1253 (2013).
53. HCSP. Haut Conseil de la Santé Publique : Avis relatif à l’utilisation du vaccin Bexsero (Novartis Vaccines and Diagnostics). (2013).
54. Murphy, E. *et al.* Sequence Diversity of the Factor H Binding Protein Vaccine Candidate in Epidemiologically Relevant Strains of Serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J. Infect. Dis.* **200**, 379–389 (2009).
55. Vogel, U. *et al.* Predicted strain coverage of a meningococcal multicomponent vaccine (4CMenB) in Europe: a qualitative and quantitative assessment. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 416–425 (2013).
56. Fagnocchi, L. *et al.* Transcriptional Regulation of the *nadA* Gene in *Neisseria meningitidis* Impacts the Prediction of Coverage of a Multicomponent Meningococcal Serogroup B Vaccine. *Infect. Immun.* **81**, 560–569 (2013).

57. O’Ryan, M., Stoddard, J., Toneatto, D., Wassil, J. & Dull, P. M. A Multi-Component Meningococcal Serogroup B Vaccine (4CMenB): The Clinical Development Program. *Drugs* **74**, 15–30 (2014).
58. Frosi, G. *et al.* Bactericidal antibody against a representative epidemiological meningococcal serogroup B panel confirms that MATS underestimates 4CMenB vaccine strain coverage. *Vaccine* **31**, 4968–4974 (2013).
59. Abad, R. *et al.* Predicted Strain Coverage of a New Meningococcal Multicomponent Vaccine (4CMenB) in Spain: Analysis of the Differences with Other European Countries. *PLOS ONE* **11**, e0150721 (2016).
60. Tsang, R. S. *et al.* Characterization of invasive *Neisseria meningitidis* from Atlantic Canada, 2009 to 2013: With special reference to the nonpolysaccharide vaccine targets (PorA, factor H binding protein, *Neisseria* heparin-binding antigen and *Neisseria* adhesin A). *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **26**, 299–304 (2015).
61. Lee, H. J. *et al.* Immunogenicity and safety of a multicomponent meningococcal serogroup B vaccine in healthy adolescents in Korea-A randomised trial. *Vaccine* **34**, 1180–1186 (2016).
62. Medini, D., Stella, M. & Wassil, J. MATS: Global coverage estimates for 4CMenB, a novel multicomponent meningococcal B vaccine. *Vaccine* **33**, 2629–2636 (2015).
63. Institut de la Statistique et des Etudes Economiques, Nouvelle-Calédonie. Recensement de la population 2014.
64. InVS. Infections invasives à méningocoques. Comment signaler et notifier cette maladie ? (2003). Available at: <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-declaration-obligatoire/Infections-invasives-a-meningocoques/Comment-signaler-et-notifier-cette-maladie>. (Accessed: 10th March 2016)
65. Comité Technique des Vaccinations, Haut Conseil de la Santé Publique. Calendrier vaccinal 2016.

66. Holst, J. *et al.* Variability of genes encoding surface proteins used as vaccine antigens in meningococcal endemic and epidemic strain panels from Norway. *Vaccine* **32**, 2722–2731 (2014).
67. Lucidarme, J. *et al.* Characterization of fHbp, nhba (gna2132), nadA, porA, Sequence Type (ST), and Genomic Presence of IS1301 in Group B Meningococcal ST269 Clonal Complex Isolates from England and Wales. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 3577–3585 (2009).
68. Jacobsson, S. *et al.* Sequence constancies and variations in genes encoding three new meningococcal vaccine candidate antigens. *Vaccine* **24**, 2161–2168 (2006).
69. Maignani, V. *et al.* Vaccination against *Neisseria meningitidis* Using Three Variants of the Lipoprotein GNA1870. *J. Exp. Med.* **197**, 789–799 (2003).
70. Brunelli, B. *et al.* Influence of sequence variability on bactericidal activity sera induced by Factor H binding protein variant 1.1. *Vaccine* **29**, 1072–1081 (2011).
71. Mowlaboccus, S. *et al.* Temporal Changes in BEXSERO® Antigen Sequence Type Associated with Genetic Lineages of *Neisseria meningitidis* over a 15-Year Period in Western Australia. *PLOS ONE* **11**, e0158315 (2016).
72. Bambini, S. *et al.* An Analysis of the Sequence Variability of Meningococcal fHbp, NadA and NHBA over a 50-Year Period in the Netherlands. *PLoS ONE* **8**, e65043 (2013).
73. Tzanakaki, G. *et al.* Diversity of greek meningococcal serogroup B isolates and estimated coverage of the 4CMenB meningococcal vaccine. *BMC Microbiol.* **14**, 1 (2014).
74. Hong, E. *et al.* Could the multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB) control *Neisseria meningitidis* capsular group X outbreaks in Africa? *Vaccine* **31**, 1113–1116 (2013).

## Serogroup B Invasive Meningococcal Diseases in New-Caledonia – Preliminary study before Bexsero vaccine implementation.

---

### **ABSTRACT :**

#### Introduction

New-Caledonia, a French archipelago in the Pacific Ocean, is burdened with an incidence of Invasive Meningococcal Disease three times higher than continental France. Serogroup B meningococcus is responsible of the majority of infections. The new vaccine Bexsero, designed to target specifically serogroup B meningococci, presents a major interest for the numerous individuals with complement deficiency among the Melanesian population. Because of the meningococcus antigenic variability, evaluation of the vaccine efficiency against the local strains is necessary before implementation.

#### Material and methods

A collection of 48 local invasive strains isolated between 2000 et 2015 was genotyped by Multi Locus Sequence Typing (MLST). After that, the 4 genes coding for the meningococcal antigens composing the Bexsero vaccine, *fhbp*, *nadA*, *nhba* and *porA*, were sequenced in each one of our strains. Alleles and corresponding antigens variants were assigned to determine the antigenic profile of the strains.

#### Results

The 48 strains are divided into 21 Sequence Types (ST) which belong to 10 clonal complexes (cc). Cc32 is the predominant cc with 37.5% of the strains. Inside this cc, ST-267 is the most frequent in New-Caledonia (20.8% of all strains) and is endemic on the archipelago. Genotyping of the vaccine antigens indicates a potential vaccine efficiency comprised of between 33.3 and 89.6%. This estimation will be narrowed down by a supplementary antibody binding test (Meningococcal Antigen Typing System).

#### Discussion

The results of this preliminary study match the global distribution of the hyperinvasive lineages of serogroup B meningococci. A satisfying level of efficiency with the Bexsero vaccination can be expected in New-Caledonia. Strains within cc 32, especially ST-267, are the prime targets of the vaccine, which will probably be highly effective on these. This study is an obligatory prerequisite for further analysis (MATS) and will contribute to the implementation of Bexsero in New-Caledonia.

# Infections invasives à méningocoques du séro groupe B en Nouvelle-Calédonie, étude préliminaire à l'instauration du vaccin Bexsero

---

## RESUME

### Introduction

La Nouvelle-Calédonie connaît une incidence des infections invasives à méningocoques 3 fois supérieure à celle de la France métropolitaine, avec une forte prédominance du séro groupe B. Le nouveau vaccin Bexsero® ciblant le méningocoque du séro groupe B présente un intérêt majeur pour les nombreux individus déficitaires dans le système du complément de cet archipel. **Cependant, l'hypervariabilité antigénique du méningocoque impose de démontrer l'efficacité du vaccin sur les souches circulant localement.**

### Protocole

Un panel de 48 méningocoques invasifs du séro groupe B isolés entre 2000 et 2015 a été typé par Multi Locus Sequence Typing (MLST). Secondairement, les gènes *fhbp*, *nadA*, *nhba* et *porA*, codant pour les 4 antigènes méningococciques inclus dans le vaccin Bexsero®, ont été séquencés. Les variants alléliques ont été identifiés et reliés aux variants antigéniques correspondant, afin de déterminer le profil antigénique de chaque isolat.

### Résultats

Les 48 isolats sont répartis en 21 séquence-types (ST), regroupés dans 10 complexes clonaux (cc). Le cc32 est majoritaire avec 37,5% des isolats. Au sein de ce cc, le ST-267, endémique à la Nouvelle-Calédonie, est le plus représenté (20,8%). **L'efficacité** estimée du vaccin est comprise entre 33,3 et 89,6%, avec en particulier une forte efficacité attendue sur les isolats du cc32. **Cette estimation large reflète la variabilité de l'expression membranaire des antigènes** mais indique que les variants antigéniques présents sont potentiellement fortement liés par les anticorps post-vaccinaux.

### Discussion

Les résultats de cette étude préliminaire concordent avec la distribution mondiale des lignées **hyperinvasives et permettent d'envisager une efficacité satisfaisante du vaccin Bexsero®**. Les souches du cc32, et notamment le ST-267, sont identifiées comme cibles essentielles du vaccin. **Un test d'expression antigénique permettra secondairement d'affiner l'estimation d'efficacité** et fixera la place du vaccin Bexsero® parmi les recommandations vaccinales locales.

---

**DISCIPLINE administrative :** Biologie Médicale

---

**MOTS-CLES :** *Neisseria meningitidis*, méningocoque, séro groupe B, vaccin, Bexsero, MLST, Nouvelle-Calédonie, méningite

---

**INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :**

Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie  
9 avenue Paul Doumer  
98800 Nouméa  
Nouvelle-Calédonie

**Directeur de thèse : Docteur Julien COLOT**