



HAL
open science

Epidémie clonale d'infections invasives à méningocoque de groupe B en Normandie : caractérisation d'un facteur de virulence - HmbR, système d'acquisition du fer via l'hémoglobine - et analyse de la protection conférée par un vaccin à base de vésicules de membrane externe

Julien Sevestre

► **To cite this version:**

Julien Sevestre. Epidémie clonale d'infections invasives à méningocoque de groupe B en Normandie : caractérisation d'un facteur de virulence - HmbR, système d'acquisition du fer via l'hémoglobine - et analyse de la protection conférée par un vaccin à base de vésicules de membrane externe. Maladies infectieuses. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR047 . tel-01929899

HAL Id: tel-01929899

<https://theses.hal.science/tel-01929899v1>

Submitted on 21 Nov 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Sciences de la vie et de la santé

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Epidémie clonale d'infections invasives à méningocoque de groupe B en Normandie : caractérisation d'un facteur de virulence - HmbR, système d'acquisition du fer via l'hémoglobine - et analyse de la protection conférée par un vaccin à base de vésicules de membrane externe

**Présentée et soutenue par
Julien SEVESTRE**

Thèse soutenue publiquement le 22 Juin 2018
devant le jury composé de

Monsieur Stéphane BONACORSI	Professeur, Université de Paris VII	Rapporteur
Monsieur François CARON	Professeur, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
Monsieur Olivier JOIN-LAMBERT	Professeur, Université de Caen Normandie	Examineur
Madame Isabelle PARENT DU CHATELET	Docteur, ANSM de Saint-Denis	Examineur
Madame Marie-Cécile PLOY	Professeur, Université de Limoges	Rapporteur
Monsieur Muhamed-Kheir TAHA	Docteur, Institut Pasteur de Paris	Codirecteur de thèse

Dirigée par le Professeur François CARON

Co-dirigée par le Docteur Muhamed-Kheir TAHA



Remerciements

C'est avec un grand plaisir que je rédige les remerciements de cette thèse qui au-delà de l'aspect professionnel fut aussi une grande expérience humaine.

J'adresse tout d'abord mes vifs remerciements aux membres du jury :

Au Professeur Marie-Cécile PLOY et au Professeur Stéphane BONACORSI d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse, ainsi qu'au Docteur Isabelle PARENT DU CHATELET et au Professeur Olivier JOIN-LAMBERT d'avoir accepté de participer au jury en tant qu'examinateurs.

A mes directeurs de thèse : le Docteur Muhamed-Kheir TAHA et le Professeur François CARON pour la garde alternée de l'enfant un peu fou que je suis ! Merci de m'avoir accueilli au sein de vos équipes et donné la chance de réaliser cette thèse. Très sincèrement, je vous remercie pour votre disponibilité, vos conseils et tout particulièrement pour votre bienveillance en toutes circonstances.

Au Professeur Martine PESTEL-CARON, la Maman du GRAM. Peut-être que certains seront jaloux mais vous avez été pour moi un modèle d'humanité. Impossible de dresser la liste de vos qualités alors je dirai simplement que les bonnes personnes sont rares et vous en faites partie.

Aux membres du GRAM passés ou présents : Stéphanie, la deuxième Maman du GRAM (en un peu plus autoritaire). Merci pour ton amitié, ton soutien et pour tous les bons moments passés au labo et en dehors. A Sandrine, la camarade de bureau en ballerines. Merci pour ta bonne humeur, les chewing gums et ta petite touche déco qui embellit tellement le bureau. A Jérémie, le camarade de bio-informatique, de péripéties genevoises et de balcon viennois (on ne parlera pas du masque). Merci également pour ta bonne humeur et surtout pour ton second degré. A Marie, l'expatriée bientôt de retour. Merci pour ta folie débordante et de nous avoir présenté Clément avec ses T-shirts toujours très philosophiques. A Agnès, la stagiaire plus stagiaire. Merci de prendre la relève et de garder au top la bonne ambiance au labo. A Clémence, la meilleure acolyte de master, c'était du grand art ! A Imane et Juliette, les girls du labo, également présentes pendant le master (mais quelle époque !). La prochaine réunion du GRAM déguisée risque d'être mémorable !

Aux Docteurs Ludovic LEMEE, Sophie BOYER et Noël FREBOURG avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Merci pour vos enseignements et votre sympathie.

Aux membres de l'équipe de PASTEUR : Aude, Mélanie, Eva, Francis, Ala-Eddine, Nouria, Alain, Mickael, Myriam, Maxime et le meilleur pour la fin Mikael L, le grand malade (et good evening). Merci de m'avoir accueilli et aidé pour les manips, votre bonne humeur a rendu ces longues journées de manip incroyables.

A mes amis thésards et jeunes Docteurs : Mathieu, Karim, Omar, Ismaël et Pierre. Merci pour cette grande folie, ces moments de grand n'importe quoi et pour votre amitié.

A mes amis de longue date et autres idiots : Tout d'abord, à Anthony, mon grand frère de cœur. Merci de me supporter depuis si longtemps et d'être toujours présent. Tu m'as vu grandir et connu petit con. Rassure-toi, je ne changerai pas, je serai juste un grand con. Tu es de loin le meilleur même sans tes cheveux. Que l'aventure continue et sinon C'EST QUI LE VRAI BATTEUR ?

A Jérémy, le Chuck Moris des temps modernes. Vas-tu finir par le lire ce livre ? J'ai hâte de pouvoir partager à nouveau avec toi des grands moments de musique.

A Simon, notre Britney Spears préférée. Merci de partager avec moi cette grande folie que peu comprennent.

Aux irréductibles de l'IUT : Quentin de Vis ma vie, JK le presque maître Gims, Antoine le capitaine pirate et maître girafe et Sophie la rousse alcoolique (ça qui nous fait deux points en commun !). Qu'est-ce que vous êtes cons, mais putain qu'est-ce que j'adore ça.

Aux Faqueux : Amandine ma fournisseuse officielle de cours, Guillou le sage (ou pas), Caroline qui a beaucoup trop d'amis qui lui font découvrir des vidéos « étranges » et Romain pour son rhum maison de qualité !

Je voudrai tout particulièrement remercier ma famille car une thèse, bien qu'une étape importante, ne reste qu'une petite partie du chemin parcouru.

A mes grands-parents, Yves et Joceline. Merci d'avoir toujours été là pour moi, dans les bons moments comme dans les plus difficiles. Vous savez bien que je ne suis pas très expressif mais je tiens à vous dire que je vous aime plus que tous.

A mes sœurs, Camille et Manon, les terribles petits monstres adorables. Bon courage pour vos études car maintenant c'est votre tour !

A mes cousins, Quentin et Romain, et oui il reste encore des idiots à remercier. Merci à vous deux pour tous ces moments incroyables, grandioses et tout simplement de pur n'importe quoi que nous avons partagé ensemble. On ne peut plus s'arrêter, on est déjà trop haut, alors comme on dit « i'm on the highway to hell » !

Enfin, je voudrais remercier mes parents, Olivier et Carole. Ça n'a pas toujours été facile mais je sais bien que vous avez toujours fait de votre mieux et je vous en remercie du fond du cœur.

Table des matières

Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	7
Liste des abréviations utiles	9
Introduction.....	13
1. Virulence de <i>Neisseria meningitidis</i>	15
1.1. Etat des connaissances	15
1.1.1. Généralités sur <i>Neisseria meningitidis</i>	15
1.1.1.1. Historique.....	15
1.1.1.2. Microbiologie conventionnelle	17
1.1.1.3. Physiopathologie.....	21
1.1.1.4. Clinique.....	27
1.1.2. Diversité génétique et génomique.....	33
1.1.2.1. Techniques de séquençage	33
1.1.2.2. Analyse des données brutes	33
1.1.2.3. Le génome de <i>Neisseria meningitidis</i>	35
1.1.2.4. Etude des populations et comparaison génomique	51
1.2. Travail personnel	61
1.2.1. Publication dans Virulence	61
1.2.2. Discussion de la virulence du méningocoque	63
1.2.2.1. <i>Neisseria meningitidis</i> , une bactérie pathogène ?	63
1.2.2.2. Rôle de la capsule	63
1.2.2.3. Rôle d'autres facteurs	67
1.2.2.4. Rôle des systèmes d'acquisition du fer	69
1.2.3. Perspective.....	73

2. Durabilité et importance de la couverture vaccinale OMV.....	79
2.1. Etat des connaissances.....	79
2.1.1. Epidémiologie.....	79
2.1.1.1. Données générales	79
2.1.1.2. Situations selon les continents	83
2.1.1.3. Contexte national et normand	95
2.1.2. Vaccins anti-méningococciques	103
2.1.2.1. Vaccins polysidiques non conjugués	103
2.1.2.2. Vaccins polysidiques conjugués	107
2.1.2.3. Vaccins anti-méningococciques B.....	113
2.2. Travail personnel	127
2.2.1. Publication dans Vaccine	127
2.2.2. Discussion des vaccins OMV	129
2.2.2.1. Durabilité de la protection conférée par les vaccins OMV	129
2.2.2.2. Ampleur de la protection conférée par les vaccins OMV	153
2.2.3. Perspectives	169
Conclusion	173
Bibliographie	175

Liste des figures

Figure 1 : Représentation en coupe de la surface cellulaire de <i>Neisseria meningitidis</i> illustrant les principaux facteurs de virulence.	40
Figure 2 : Répartition des infections invasives à méningocoque par séro groupe et par région dans le monde, 2001-2010.	80
Figure 3 : Répartition des épidémies de méningite à méningocoque notifiées en Afrique, 1841-1999.....	82
Figure 4 : Evolution du nombre total de cas confirmés d'infections invasives à méningocoque, Nouvelle-Zélande, 1975-2013.	90
Figure 5 : Evolution du taux de notification des cas confirmés d'infections invasives à méningocoque par séro groupe, UE/EEE, 2011-2015.	92
Figure 6 : Evolution du taux de notification des infections invasives à méningocoque par séro groupe, France entière, 2000-2016	94
Figure 7 : Evolution du taux de notification des infections invasives à méningocoque par séro groupe, Seine Maritime, 2001-2013.	96
Figure 8 : Campagne de vaccination MenBvac [®] : localisation des cantons de la zone de vaccination de Dieppe en Seine-Maritime, France.	100
Figure 9 : Evolution du taux de notification des cas confirmés d'infections invasives à méningocoque liées aux clone B:14:P1.7,16 dans la zone de Dieppe contre le reste de la Seine-Maritime et couverture vaccinale cumulée dans la zone de Dieppe, 2003-2010.....	100
Figure 10 : Prévalence des infections invasives à méningocoque en fonction de l'âge et relation avec l'immunité générale défini par l'activité bactéricide du sérum humain.....	104
Figure 11 : Année d'introduction du vaccin dirigé contre le méningocoque C (MCC) en routine chez l'enfant par pays, UE/EEE, 1999-2014.	108
Figure 12 : Application de la vaccination inverse dans le développement de vaccins dirigés contre le méningocoque de séro groupe B.	118

Liste des tableaux

Tableau 1 : Utilisation des vaccins OMV dans le monde.....	114
Tableau 2 : Résumé des principales campagnes vaccinales OMV de par le monde et études d'efficacité correspondantes.....	138

Liste des abréviations utiles

ARS :	Agence Régionale de Santé
BIGSdb :	Bacterial Isolate Genome Sequence Database
cc :	Complexe Clonal
CDS :	Coding DNA Sequence
CEACAM :	CarcinoEmbryonic Antigen-related Cell-Adhesion Molecule
CIVD :	Coagulopathie IntraVasculaire Disséminée
CNR :	Centre National de Référence
CRM :	Cross Reacting Material
ECDC :	European Centre for Disease Prevention and Control
ELISA :	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
fHbp :	facteur H protein binding
GNA :	Genome-derived Neisserial Antigens
HmbR :	Hemoglobin Receptor
HSPG :	Heparan Sulfate ProteoGlycans
IHT :	Islands of Horizontally Transfer
IIM :	Infections Invasives à Méningocoque
IST :	Infections Sexuellement Transmissibles
LCS :	Liquide CérébroSpinal
LOS :	LipoOligoSaccharide
LPS :	LipoPolySaccharide
MATS :	Meningococcal Antigen Typing System
MLST :	MultiLocus Sequence Typing
MVP :	Meningidis Vaccine Project
NCAM :	Neural Cellular Adhesion Molecule
NGS :	Next Generation Sequencing
NHIP :	Institut de Santé Publique de Norvège
NLS :	Nuclear Localisation Signal

OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
OMV :	Outer Membrane Vesicle
ORF :	Open Reading Frame
PacBio :	Pacific Biosciences
PATH :	Programme for Appropriate Technology in Health
PCR :	Polymerase Chain Reaction
SBA :	Serum Bactericidal Activity
SNP :	Single Nucleotide Polymorphisms
SPF :	Santé Publique France
ST :	Sequence Type
TLR :	Toll-Like Receptor
VDK :	Vandekerkove
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VR :	Variable Region
WGS :	Whole Genome Sequencing

Introduction

La Normandie – et plus particulièrement la zone de Dieppe – a connu de 2003 à 2012 une situation d'épidémie d'infection invasive à méningocoque (IIM) due à la dissémination d'une souche de groupe B particulièrement virulente dénommée B:14:P1.7,16/ST-32.

Contrôlée grâce à un vaccin à base de vésicules de membre externe (dites OMV pour Outer Membrane Vesicles), l'épidémie a suscité maints questionnements scientifiques notamment d'une part, sur les déterminants de la virulence de la souche et d'autre part, sur la durabilité et l'ampleur de la protection vaccinale.

L'objet de ce mémoire est de présenter deux études originales publiées apportant des réponses à chacune de ces interrogations, toutes deux ayant été rendues possibles par les biothèques constituées à l'acmé de l'épidémie : (i) une analyse des déterminants de la pathogénicité de B:14:P1.7,16/ST-32 à partir des collections d'isolats identifiés les uns en situation de portage pharyngé sain et les autres d'IIM redoutables (méningite et *purpura fulminans*) ; (ii) une étude d'immunogénicité à partir de sérothèques de sujets vaccinés ayant accepté différents prélèvements, y compris plusieurs années après le dernier rappel.

Pour chaque chapitre, il sera d'abord rappelé l'état des connaissances avant de présenter le travail original sous forme de l'article publié puis de le discuter de façon exhaustive en traçant des perspectives.

1. Virulence de *Neisseria meningitidis*

1.1. Etat des connaissances

Ce chapitre présente après, un panorama de *N. meningitidis* (historique, microbiologie conventionnelle, physiopathologie, formes cliniques) un volet spécifique à la diversité génétique et génomique (méthodes d'études, facteurs de pathogénicité déjà connus), ce second point sous tendant l'étude originale (publiée dans Virulence) ensuite présentée.

1.1.1. Généralités sur *Neisseria meningitidis*

1.1.1.1. Historique

Les épidémies d'infections causées par *N. meningitidis*, le méningocoque, sont caractérisées depuis plus de deux siècles. La première description clinique d'une épidémie de méningite à méningocoque est généralement attribuée à Vieusseux, en 1805, à Genève, en Suisse¹. En 1806, un événement épidémique similaire est décrit à New Bedford, aux Etats Unis, par Danielson et Mann². Au cours du 19^{ème} siècle, en Europe et aux Etats Unis d'Amérique, de nombreux rapports viennent complétés ces premières observations. En Afrique, les premiers cas de méningite à méningocoque ne seront décrits qu'à partir de 1905, avant qu'au 20^{ème} siècle ce continent ne soit reconnu comme fortement touché par des épidémies de grande ampleur³. En 1884, Marchiafava et Celli décrivent la première observation de méningococcie ovale et intracellulaire dans un prélèvement de liquide cébrospinal (LCS)⁴. En 1887, Weichselbaum isole et identifie à partir d'un LCS l'agent pathogène causal et le nomme *Diplococcus intracellularis meningitidis*, établissant ainsi la relation étiologique entre le méningocoque, les épidémies de méningite et la notion d'infections invasives à méningocoque⁵.

Le portage asymptomatique du méningocoque chez l'individu sain est tout d'abord rapporté en 1896 par Kiefer⁶ et sera confirmé en 1901 par Albrecht et Ghon⁷. En 1909, Dopter identifie et répertorie différentes souches de méningocoques sur des bases sérologiques, établissant les fondements de la classification actuelle⁸. Cette découverte sera aussi à l'origine de la thérapie sérique transitoirement utilisée dans le traitement des infections à méningocoques, décrite en 1913 par Flexner⁹. En 1908, Bruns et Hohn documentent l'étroite relation entre les variations du taux de portage au sein de la population et l'augmentation ou la diminution de l'incidence des épidémies¹⁰.

La septicémie fulminante à méningocoque, aussi appelée syndrome de Waterhouse-Friderichen, est reconnue au début du 20^{ème} siècle¹¹. Au cours de la première puis de la seconde guerre mondiale, une augmentation importante du nombre d'épidémies d'IIM sera décrite à travers le monde^{12,13}. En 1917, Glover observe au sein d'un camp militaire de jeunes recrues, la relation entre un taux de portage élevé et la vie en collectivité¹⁴.

Le 20^{ème} siècle sera marqué par l'avènement de l'antibiothérapie, tournant historique majeur dans le traitement des infections bactériennes. En 1937, l'introduction des sulfamides dans le traitement des IIM change favorablement l'issue thérapeutique et remplace l'utilisation de sérum immunisé¹⁵. Les sulfamides, utilisés en chimioprophylaxie, présentent l'avantage d'éliminer le portage asymptomatique du méningocoque et apportent un moyen simple et sûr de prévention des IIM en milieu « clos » (université, caserne)¹⁶. Cependant, Schoenback et Phair décrivent entre 1941 et 1943 une augmentation du nombre de souches résistantes aux sulfamides tandis que des cas d'IIM due à de tels souches sont décrits en 1963 lors d'épidémies survenues dans l'enceinte de deux bases militaires en Californie¹⁷⁻¹⁹. L'émergence rapide de souches résistantes aux sulfamides à travers le monde conduira à la recherche d'alternative pour la prophylaxie, avant tout par la rifampicine²⁰. Par ailleurs il apparaît qu'hormis la gestion d'une épidémie limitée à une collectivité donnée la chimioprophylaxie de masse ne peut en aucun cas représenter une prévention efficace et durable à l'échelon de la population toute entière du fait notamment de la circulation des individus et de la diversité des souches²¹. Il apparaît aussi que les mesures d'hygiène dans l'entourage d'un cas déclaré d'IIM (port de masque) ne ressoudent nullement la transmission des souches invasives à partir de tous les porteurs sains. D'où la nécessité vite identifiée de développer un moyen de prévention sûr pour lutter contre les infections à méningocoque : la vaccination.

1.1.1.2. Microbiologie conventionnelle

N. meningitidis est une β -protéobactérie, appartenant à la famille des *Neisseriaceae*. Il existe au sein du genre *Neisseria* deux espèces pathogènes pour l'Homme : *N. meningitidis*, responsable de méningites et de septicémies et *N. gonorrhoeae*, responsable d'infections sexuellement transmissibles (IST). Les autres espèces du genre sont commensales de l'Homme et des animaux. Il s'agit notamment de *N. lactamica*, espèce commensale du nasopharynx humain, largement étudiée car génétiquement proche de *N. meningitidis*^{22,23}.

Le méningocoque est un diplocoque à Gram négatif d'une taille de $0,6 \times 0,8 \mu\text{m}$. Les côtés adjacents du diplocoque sont aplatis donnant cette forme caractéristique en « grain de café » observable par microscopie. Le méningocoque est une bactérie fragile, sensible à la dessiccation et dite de culture difficile. Son étude nécessite l'utilisation de milieux nutritifs adaptés et des conditions de conservations et de cultures optimales. Le milieu gélosé de Vandekerkove (VDK) est recommandé pour le transport²⁴. Les milieux gélosés trypticase soja simples, enrichis au sang ou supplémentés en facteurs de croissance (gélose « chocolat »), sont généralement utilisés pour la mise en culture. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 18 à 24 heures sous une atmosphère aérobie, humide et enrichie avec 5 à 10% de CO₂. Sur le plan macroscopique, les colonies apparaissent de petite taille (1 à 2 mm), de forme ronde, d'aspect lisse, sans pigmentation (couleur grisâtre) et sont non hémolytiques sur gélose au sang. Le méningocoque a un taux d'autolyse rapide, ainsi des variations de taille et de forme sont observées sur des cultures « âgées » de 3 à 4 jours. Le méningocoque est une bactérie aérobie néanmoins capable de fermenter le glucose et le maltose sans produire de gaz mais qui ne métabolise pas le saccharose et le lactose. Les bactéries du genre *Neisseria* expriment la cytochrome C oxydase et sont positives au test de l'oxydase.

Les techniques moléculaires sont désormais couramment utilisées en diagnostic. Basées sur la détection et l'amplification d'ADN (acide désoxyribonucléique) par technique PCR (polymerase chain reaction en anglais d'où l'acronyme « PCR » largement utilisé) elles ne nécessitent qu'une petite quantité de matériel génétique et peuvent être réalisées directement sur les prélèvements biologiques (sang, LCS)²⁵. Cette technique de diagnostic ce qui est particulièrement précieux lorsque l'approche culturelle n'est pas réalisable.

L'identification du méningocoque est possible par la détection PCR en point final ou en temps réel de régions chromosomiques spécifiques de l'espèce. La cible utilisée en routine est le gène *ctrA* qui code pour une protéine de transport membranaire conservée et impliquée dans la synthèse capsulaire²⁶. Il existe une grande diversité de souches. Les 12 sérogroupes historiquement définis par la structure du polysaccharide capsulaire forment la base de la classification usuelle. En routine sont recherchés les sérogroupes A, B, C, W, X et Y. Le séro groupe est déterminé selon l'antigène capsulaire par agglutination antigène-anticorps à l'aide d'antisérum, de particules de latex sensibilisées ou par la caractérisation moléculaire des gènes capsulaires spécifiques de chaque séro groupe^{27,28}.

La détermination du sérotype et du séro-sous-type est définie selon le profil antigénique des porines PorB et PorA respectivement^{29,30}. La caractérisation des porines permet de compléter le typage et d'établir la formule antigénique usuelle de l'isolat (sérogroupe : sérotype : séro-sous-type) nécessaire à la comparaison des souches entre elles pour l'étude épidémiologique. Ce typage est réalisé à l'aide d'un panel d'anticorps monoclonaux par technique ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay en anglais d'où l'acronyme « ELISA » largement utilisé) ou par détermination de la séquence nucléique du gène *porB* et des régions variables VR1 et VR2 du gène *porA*^{31,32}. De la même façon, l'immunotypage du LOS (lipoolygosaccharide) peut être déterminé pour préciser la formule antigénique³³. Enfin, la caractérisation du profil antigénique peut être complétée par MLST (MultiLocus Sequence Typing en anglais d'où l'acronyme « MLST » largement utilisé) et permet une identification précise du complexe clonal (cc) de l'isolat³⁴.

Les *Neisseria* sont normalement sensibles à la pénicilline et autres β -lactamines, ainsi qu'à la rifampicine, aux aminosides, aux phénicolés, aux macrolides, aux quinolones et aux sulfamides. Cependant, des résistances acquises ont émergés, notamment une sensibilité diminuée à la pénicilline G³⁵⁻³⁸ et bien plus rarement aux céphalosporines de troisième génération (céfotaxime ou ceftriaxone), molécules pivot pour le traitement des IIM³⁹.

1.1.1.3. Physiopathologie

Le méningocoque est un commensal obligatoire du nasopharynx humain, son seul réservoir naturel. Il s'attache et colonise la surface des muqueuses respiratoires où il peut résider quelques semaines à plusieurs mois. Cette colonisation - ou portage asymptomatique - illustre la bonne relation établie entre une bactérie et son hôte. Cependant dans de rares cas, le méningocoque traverse les muqueuses respiratoires, diffuse dans le sang et cause une IIM, laquelle est souvent considérée comme un échec du commensalisme⁴⁰. En effet, le pouvoir invasif ne représente pas un avantage sélectif pour la bactérie car l'invasion n'intervient pas dans le cycle de transmission et ne favorise pas la survie de celle-ci. Le taux de portage au sein de la population générale hors période épidémique est estimé à 10% alors qu'il peut atteindre 35% en situation épidémique⁴¹⁻⁴³. En Europe et aux Etats-Unis, le taux de portage est faible chez le nourrisson au cours de sa première année de vie (<1%), il est peu fréquent chez l'enfant jeune avant 15 ans (<10%), et augmente significativement chez l'adolescent entre 15 et 25 ans (>30%), avant de diminuer chez l'adulte (<10%)^{41,42,44,45}.

A noter que la plupart des études de portage ont été de nature transversale, réalisées sur une population donnée à un moment donné et ne représentent donc qu'une brève image du portage réel. Quelques études longitudinales ont cherché à estimer la durée du portage sur le long terme. En 1934, Rake fut le premier à définir 3 groupes relatifs à la durée du portage (transitoire, intermédiaire et chronique)⁴⁶. L'acquisition du méningocoque au niveau des voies respiratoires supérieures engendre dans 25% des cas une colonisation chronique (mois, années), dans 30% des cas un portage intermédiaire (jours, semaines) et dans 40% des cas un portage transitoire ou peu fréquent. En 1971, Greenfield observe pendant 32 mois plusieurs familles en période non épidémique. Il estime la durée moyenne du portage à 9,6 mois et note dans 38% des cas une durée supérieure à 16 mois⁴⁷.

Pour mieux comprendre la dynamique de transmission des souches de méningocoque au sein de la population générale, la caractérisation moléculaire de l'organisme est importante. Différentes études réalisées dans le passé n'ont pas identifié si les souches isolées en portage restaient les mêmes au cours du temps. Ainsi, les résultats obtenus sont parcellaires car ils illustrent la durée du portage en général et non celle d'une souche donnée. Ces dernières années quelques études longitudinales ont utilisé l'approche moléculaire pour investiguer et suivre plus précisément les événements de transmission, d'acquisition et la durée du portage. Elles ont démontré que le commensalisme est associé à des souches particulières qui établissent une relation de longue durée avec l'hôte et que dans 90% des cas la même souche est retrouvée sur une période de 5 à 6 mois^{48,49}.

L'acquisition du méningocoque demande un contact étroit et prolongé de personne à personne, entre un individu porteur sain ou infecté et un individu susceptible^{41,50}. La transmission s'effectue par un contact direct via la salive ou par l'inhalation de gouttelette de sécrétion respiratoire. Le risque de transmission est directement lié à l'importance de l'exposition, considéré comme significatif pour un contact de moins d'un mètre et de plus d'une heure en face à face^{14,47,51}. Néanmoins, pour un contact de bouche à bouche la durée n'importe pas.

Chaque individu rencontre au cours de sa vie différentes souches de méningocoque. La colonisation commensale par une souche, qu'elle soit non virulente ou potentiellement pathogène, est un processus immunisant qui induit la production d'anticorps bactéricides dans les semaines après l'acquisition et qui par immunité croisée entraîne une protection vis-à-vis de souches génétiquement proches^{44,52,53}.

Les souches de portage qui colonisent le nasopharynx de sujets sains ont un potentiel pathogénique limité et causent rarement une infection invasive, cela malgré un taux de transmission élevé et une persistance de longue durée. Par opposition, les souches responsables d'infection invasives ont un potentiel pathogénique important, sont hautement transmissibles et leur acquisition peut évoluer rapidement vers une infection sévère pouvant entraîner une issue fatale pour l'hôte, cela malgré un taux de portage faible et de courte durée, allant de quelques jours à quelques semaines.

Ainsi, les épidémies d'IIM surviennent principalement au sein de personnes sensibles nouvellement infectées par une souche virulente dans un délai allant de 1 à 14 jours suivant l'acquisition⁵⁴. L'exposition d'une population naïve de tout portage et non immunisée à une souche virulente entraîne donc une augmentation significative du taux de transmission et d'infection. Il est établi que l'élévation du taux de transmission d'une souche virulente au sein d'une population est un facteur étroitement lié à l'augmentation de l'incidence. Les individus nouvellement exposés participent ainsi à la circulation de clones virulents. Rompre la chaîne de transmission est donc un facteur clé dans la lutte contre les IIM⁵⁵. Il est estimé que le contrôle de la transmission et la prévention des infections à méningocoque liées aux clones hyperinvasifs éliminerait plus de 75% des cas endémiques⁵⁶.

Une combinaison de conditions favorables relevant de l'environnement, de l'hôte et du microorganisme est nécessaire pour que survienne une IIM. Au cours de l'infection, le méningocoque est confronté à différents environnements et les interactions hôte-méningocoque sont multiples^{57,58}. Le dysfonctionnement voire le déficit d'un facteur clé régulant l'une des cascades d'activation de l'immunité innée ou acquise est déterminant dans la réponse engendrée par l'hôte. La déficience de l'activité bactéricide du sérum humain est un facteur majeur prédisposant aux IIM⁵⁹. D'autres facteurs comme les polymorphismes génétiques entraînant un déficit immunitaire chez l'hôte engendrent également un risque accru de développer une infection invasive⁶⁰⁻⁶². Les causes peuvent être multiples et incluent des facteurs tels qu'une absence d'anticorps sériques bactéricides, une déficience de la voie classique, alterne, lectine et terminale du complément et la présence d'anticorps bloquant (immunoglobuline de classe A ou IgA) qui inhibe l'activité bactéricide du sérum humain⁶³.

Les déficits acquis sont également des facteurs prédisposant à la survenue des IIM. Un tiers des cas sporadiques surviennent chez l'adulte⁶⁴.

Ces cas apparaissent le plus souvent chez l'adulte âgé et sont associés à des facteurs tels que la présence d'un myélome, une leucémie lymphocytaire chronique, un syndrome néphrotique, une asplénie anatomique ou fonctionnelle. Enfin, d'autres facteurs endogènes sont décrits comme favorisant l'infection notamment le tabagisme chronique ou passif, la consommation de drogue, l'alcoolisme et les infections respiratoires préalables ou concomitantes⁶⁵⁻⁶⁸.

Des facteurs de risque environnementaux sont aussi décrits. Le taux de transmission et de colonisation augmente drastiquement au sein de population vivant en collectivité, pouvant atteindre 70-80% dans un environnement confiné (casernes militaires, universités et foyer familial)^{14,41,69,70}. Les mouvements migratoires et les voyages facilitent également la circulation de souches virulentes à l'intérieur d'un pays et d'un pays à l'autre. Les vastes mouvements de population, tels que le pèlerinage jouent un rôle majeur dans la dissémination de l'infection⁷¹. Le climat importe : en Afrique, les épidémies surviennent principalement à la fin de la saison sèche, étant associées à la présence d'un vent sec, chargé en poussière pouvant léser directement la barrière des muqueuses respiratoires ou inhiber les défenses immunitaires de surface^{72,73}. Aux Etats Unis et en Europe, une recrudescence d'IIM est observée en hiver et au début du printemps, rapportée à la prévalence élevée des viroses respiratoires, telle la grippe qui en fragilisant la muqueuse respiratoire favorisent l'infection^{65,66,74,75}.

1.1.1.4. Clinique

Les IIM peuvent être difficiles à diagnostiquer. Elles surviennent chez des sujets sains, le plus souvent de manière sporadique et les premiers symptômes cliniques sont non spécifiques avant que n'apparaissent en moyenne en 8 heures des manifestations cliniques plus évocatrices^{76,77}.

Méningite

Il s'agit de la manifestation la plus commune des IIM, survenant dans 40 à 60% des cas⁷⁶⁻⁷⁸. La réponse inflammatoire déclenchée au sein de l'espace subarachnoïdien par la réplication du méningocoque provoque les symptômes méningés⁷⁹. Le début en est brutal, avec maux de tête intenses, fièvre, nausées, vomissements, photophobie et raideur de la nuque. Il peut s'y ajouter des signes neurologiques, tels que prostration, délire, coma et/ou convulsions. Chez les nourrissons le début brutal et la raideur de la nuque peuvent manquer les signes prédominants étant une irritabilité et un état de léthargie^{80,81}.

Des éruptions cutanées sont présentes dans 25% des cas mais restent souvent plus atténuées et atypiques que celles observées lors des méningococcémies (cf *infra*). Un état de détresse généralisé est observé pour un tiers des enfants. L'augmentation de la pression intracrânienne causée par l'inflammation cérébrale entraîne des complications sévères conduisant à la formation d'hernie cérébrale et au décès du patient. La méningite à méningocoque a un taux de mortalité compris entre 5 et 20%.

Bactériémie aigue ou méningococcémie

La septicémie est dans 20 à 30% des cas associée à la méningite et dans 20 à 30% des cas observée seule. Des membres inférieurs douloureux, un refroidissement des extrémités du corps et une pâleur de la peau sont des indicateurs précoces de sepsis chez l'enfant et l'adolescent qui apparaissent dans les 12 heures suivant le début de l'infection. Une somnolence, une respiration rapide ou difficile et de la diarrhée sont des symptômes parfois observés chez l'enfant jeune⁷⁶. L'apparition de pétéchies ou de lésions purpuriques, signes classiques de la méningococcémie, sont observées dans 40 à 80% des cas⁸². Des éruptions maculopapulaires blanchissantes sont présentes au stade précoce de la maladie dans 13% des cas et peuvent conduire à un diagnostic erroné d'infection virale. Les états de confusion et de délire sont des signes tardifs qui résultent de l'hypotension et de l'hypoperfusion cérébrale. La réplication du méningocoque dans le sang provoque la libération de grande quantité d'endotoxine et active la réponse immunitaire innée ou acquise. Cette activation entraîne une lésion généralisée de l'endothélium vasculaire provoquant la perméabilité capillaire, une vasodilatation ou constriction inappropriée, une coagulopathie intravasculaire disséminée (CIVD) et l'insuffisance cardiaque. L'ensemble de ces facteurs conduisent à une défaillance généralisée des organes et possiblement au décès du patient⁸³. La reconnaissance et la prise en charge précoce des méningococcémies a permis de réduire le taux de mortalité de 40% à la fin des années 1990, à actuellement 5 à 20%.

Purpura fulminans

Dans 20 à 30% des cas d'IIM, la méningococcémie évolue en *purpura fulminans*, forme la plus grave de l'infection à méningocoque. Le *purpura fulminans* est un syndrome d'évolution rapide caractérisé par une thrombose des micro vascularités de la peau et une nécrose hémorragique de la peau et des muscles⁸⁴.

Le *purpura fulminans* débute par l'apparition d'une ou plusieurs lésions de la peau de nature hémorragique qui ne disparaissent pas sous la pression. Les lésions initiales s'étendent rapidement jusqu'à devenir confluentes formant de larges ecchymoses. Les lésions purpuriques peuvent se nécroser et s'étendre aux tissus sous cutanés. Bien que visualisé par l'apparition d'éléments nécrotiques cutanés, le *purpura fulminans* est initialement un syndrome thrombotique. La thrombose induit une ischémie conduisant au gonflement et à la mort des cellules endothéliales, une extravasation de globules rouges et éventuellement à la nécrose de la peau⁸⁵. Les extrémités sont les parties du corps les plus touchées à cause de la combinaison des effets du choc septique diminuant la pression sanguine et d'une vascularisation collatérale réduite ne neutralisant pas l'occlusion des vaisseaux. Les amputations des membres et les cicatrices cutanées sont des complications fréquentes en cas de *purpura fulminans*⁸⁶. Le taux de létalité globale lié aux IIM est stable autour des 10% mais reste plus élevé et atteint 20% en présence de *purpura fulminans*.

Autres manifestations cliniques

Le méningocoque infecte moins communément (< 5%) d'autres sites anatomiques et cause des pneumonies, des conjonctivites, des arthrites, des infections du péricarde et du myocarde. Ces manifestations peuvent être l'unique présentation de l'infection à méningocoque ou associées à la méningite et à la méningococcémie et sont liées à des sérogroupes particuliers⁸⁷. Des présentations cliniques sous forme de syndrome abdominal sont également décrites et peuvent être associées à une mortalité plus importante qui serait due au retard de prise en charge. En particulier, Moreno *et al* ont décrit que la diarrhée était le seul symptôme significativement ($p = 0,03$) surreprésenté parmi les cas mortels comparés aux survivants (56% contre 27%)⁸⁸.

Séquelles

Les séquelles des IIM sont nombreuses et diverses⁸⁹. Chez les enfants, une déficience du développement neuronal est observée dans 7% des cas et se manifeste par des problèmes cérébelleux, une spasticité, des problèmes de coordination motrice, des difficultés d'apprentissage et de concentration ainsi que des déficits neurologiques focaux⁹⁰. Une atteinte de l'audition survient dans 4% et la surdité complète dans 2% des cas⁹¹. Des lésions de la peau peuvent persister suite au *purpura* nécrotique et nécessiter une greffe de peau⁹².

Les amputations de doigts ou de membres sont fréquentes et bien souvent multiples dans le cas d'atteinte nécrotiques de la peau, des muscles, des os et conduisent au remplacement du membre perdu par une prothèse⁹³. Les atteintes rénales provoquées par la méningococcémie peuvent persister une fois l'infection traitée et nécessiter un remplacement chirurgical des organes lésés^{94,95}.

1.1.2. Diversité génétique et génomique

1.1.2.1. Techniques de séquençage

En microbiologie, le développement des techniques moléculaires a révolutionné l'identification et la classification des microorganismes. Une large gamme de techniques (dérivées de la technique de séquençage Sanger) a été développée pour investiguer les épidémies de maladies infectieuses et la diffusion de microorganismes pathogènes chez l'Homme, l'animal et la plante. La capacité à produire une importante quantité de données pour un coût toujours plus bas était l'un des progrès majeurs offert par les techniques de séquençage de nouvelle génération (Next Generation Sequencing en anglais d'où l'acronyme « NGS » couramment utilisé)⁹⁶. Deux technologies NGS aux propriétés différentes mais complémentaires ont été utilisées pour le séquençage de génomes complets (Whole Genome Sequencing en anglais d'où l'acronyme « WGS »). La technologie Illumina[®], dite de seconde génération, met l'accent sur la durée d'analyse et le nombre de bases séquencées, générant ainsi rapidement une multitude de données. Elle a été utilisée pour produire une ébauche du génome des souches sélectionnées ou *draft genome* en anglais, plus couramment utilisé pour représenter un génome complet mais non circularisé. La technologie PacBio[®] (Pacific Biosciences[®]), dite de troisième génération, met l'accent sur la résolution et cherche à séquencer de longs fragments d'ADN contigus. Elle est plus résolutive et a été utilisée pour produire un génome circulaire complet et ainsi enrichir l'analyse des régions génomiques complexes non couvertes par le séquençage Illumina[®].

1.1.2.2. Analyse des données brutes

A l'image du séquençage Sanger, le rendement et la qualité du séquençage obtenus par les technologies NGS est contrôlé grâce à plusieurs paramètres ou scores. Une fois la qualité des séquences contrôlée, deux approches analytiques principales peuvent être utilisées : l'alignement des séquences sur un génome de référence ou l'assemblage *de novo*⁹⁷⁻⁹⁹.

L'alignement avec un génome de référence est une approche rapide, peu coûteuse en termes de moyen et de temps qui permet une analyse globale d'un grand nombre de génomes en simultané. On peut considérer cette technique comme une approche de comparaison génomique. Cependant, cette méthode laisse peu de place à l'identification de structures génomiques nouvelles car elle repose en grande partie sur l'analyse et la comparaison avec un génome de référence déjà caractérisé. A l'inverse, l'assemblage *de novo* est une approche lente, onéreuse en termes de moyen et de temps mais qui permet une analyse très résolutive d'un ou d'un petit nombre de génomes. On peut considérer cette technique comme une approche d'exploration génomique.

1.1.2.3. Le génome de *Neisseria meningitidis*

Le génome de *N. meningitidis* est constitué d'un chromosome circulaire d'une taille moyenne de 2 millions de paires de base (2-2,2 MB) et présente un taux moyen en GC% compris entre 50 et 52%¹⁰⁰. Le séquençage de génomes complets ne reflète qu'une image ponctuelle d'une culture, d'une souche, d'une espèce bactérienne. Pour obtenir plus d'information et mieux comprendre la dynamique évolutive d'une espèce, plusieurs génomes de souches finement caractérisés sur le plan phénotypique ainsi que d'autres approches « omiques » sont nécessaires. Le séquençage des premiers génomes complets de *N. meningitidis*, celui de deux souches de référence invasives, MC58 de séro groupe B et Z2491 de séro groupe A, a été réalisé en 2000^{101,102}. Les années suivantes, le nombre de génomes disponibles sera agrémenté par le séquençage des souches invasives FAM18 et 053442 de séro groupe C ainsi que par le génome des souches de portage $\alpha 14$, $\alpha 153$ et $\alpha 275$, respectivement, non séro-groupable, de séro groupe E et de séro groupe W¹⁰³⁻¹⁰⁵. Aujourd'hui (10 Mars 2018) plus de 10000 génomes complets (circulaires ou *draft*) de souches de *Neisseria* sont publiquement disponibles sur la base de données BIGSdb (Bacterial Isolate Genome Sequence database en anglais d'où l'acronyme « BIGSdb »)¹⁰⁶.

Le génome des *Neisseria* se caractérise également par la présence abondante d'une large diversité de séquences ADN répétées qui contribuent à la fluidité et à la variabilité génomique^{100,107}. En effet, environ 20% du chromosome de *N. meningitidis* est composé de séquences répétées de toutes sortes. Le méningocoque est également capable de modifier directement le contenu de son chromosome par le transfert horizontal de larges régions d'ADN provenant de la même espèce ou d'espèces proches¹⁰⁸.

Le transfert horizontal d'ADN entre les bactéries intervient souvent dans l'évolution globale de la pathogénicité de nombreuses espèces. Les régions d'ADN acquises par transfert horizontal, appelées îlot de transfert horizontal (Islands of Horizontally Transfer en anglais d'où l'acronyme « IHT ») sont souvent caractérisées par une composition atypique de l'ADN. On les distingue par exemple grâce à un taux en GC variable et une utilisation du code génétique différente. Par exemple, chez la souche MC58, l'IHT-A1 (NMB0066-NMB0074) contient principalement les gènes spécifiques de synthèse de la capsule du sérotype B¹⁰¹.

Variation de l'expression génique

L'expression de plusieurs gènes du méningocoque est soumise à deux variations importantes : la variation de phase et la variation antigénique. Il s'agit de variations clonales, observées dans une lignée bactérienne établie à partir d'une souche donnée. La variation antigénique se caractérise par le fait qu'une souche exprime un seul type antigénique d'une protéine à la fois mais peut en exprimer successivement plusieurs différents. La variation de phase représente la commutation entre un état d'expression (ON) à un état de non-expression (OFF).

Ainsi, grâce à la modification des composants de la membrane externe, principalement des structures antigéniques, le méningocoque est capable d'échapper à la reconnaissance du système immunitaire de l'hôte. *N. meningitidis* possède également un large répertoire de gènes régulés par variation de phase¹⁰⁹⁻¹¹². La diversification intra-souche, permet la génération d'un large répertoire de phénotype à travers l'expression de différentes combinaisons de gènes. On y retrouve les gènes impliqués dans la synthèse et le transport de la capsule polysaccharidique¹¹³, la synthèse et la modification de pili¹¹⁴, la synthèse des LOS¹¹⁵, la protéine PorA^{116,117}, les protéines de membrane externe Opc et Opa^{118,119}, et plusieurs mécanismes impliqués dans l'acquisition du fer^{120,121}. Cette liste a récemment été complétée par des auto-transporteurs comme NadA, IgA and NalP, des gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN (*mod*) et enfin par de nombreux gènes de métabolisme¹²². Les variations de phase et les variations antigéniques permettent de générer une multitude de variants dont certains peuvent être sélectionnés en fonction de leur fitness.

Core/pan génome

Par définition, le pan génome correspond à l'ensemble des gènes retrouvés chez une espèce bactérienne. On y retrouve le core génome ou l'ensemble des gènes présents chez toutes les souches de la même espèce et le génome accessoire qui regroupe les gènes présents uniquement chez certaines souches¹²³. Le core génome du méningocoque est estimé à un peu plus de 1300 gènes et le pan génome environ 3300 gènes¹⁰⁰. Par conséquent, 70% des gènes retrouvés pour chaque génome sont associés au core génome, et représentent 40% du pan génome actuel de l'espèce. Bien que le core génome d'une espèce reste globalement stable, le pan génome lui est en constante expansion. Il est estimé que chaque nouveau génome de méningocoque est composé d'environ 30 à 40 nouveaux gènes.

Comparé au génome accessoire, les gènes du core génome ont un taux en GC et un biais d'usage du code plus élevé. Le core génome est également enrichi avec des gènes domestiques, en particulier de gènes de métabolisme totalement absents au sein des gènes accessoires. Les gènes du core génome codent pour des protéines principalement localisées dans le cytoplasme, au niveau de la membrane interne ou dans l'espace périplasmique. A l'inverse, les gènes accessoires codent principalement pour des protéines de membrane externe. On y retrouve par exemple les protéines impliquées dans les interactions avec les cellules de l'hôte comme l'adhésine Opc, les auto-transporteurs comme NalP, NadA et MspA, ainsi que des protéines du système de sécrétions à deux composants comme TpsA et TpsB (Two Partner Secretion system en anglais d'où l'acronyme « TPS » couramment utilisé). Sur la base des annotations disponibles, chaque génome est composé d'environ 2000 CDS (Coding DNA Sequence en anglais d'où l'acronyme « CDS ») caractérisées ou putatives¹⁰⁰. D'une taille moyenne de 900 pb, les CDS représentent environ 80% du génome complet. Cependant, il faut considérer que 50% des CDS ont été identifiées par approches bio-informatiques et non pas été caractérisées sur le plan phénotypique. Ainsi, des divergences entre les génomes sont observées et sont en grande partie liées à l'identification de courts cadres de lecture putatifs non codants (Open Reading Frame en anglais d'où l'acronyme « ORF » couramment utilisé), déterminés informatiquement par la présence aléatoire de codon start/stop¹²⁴.

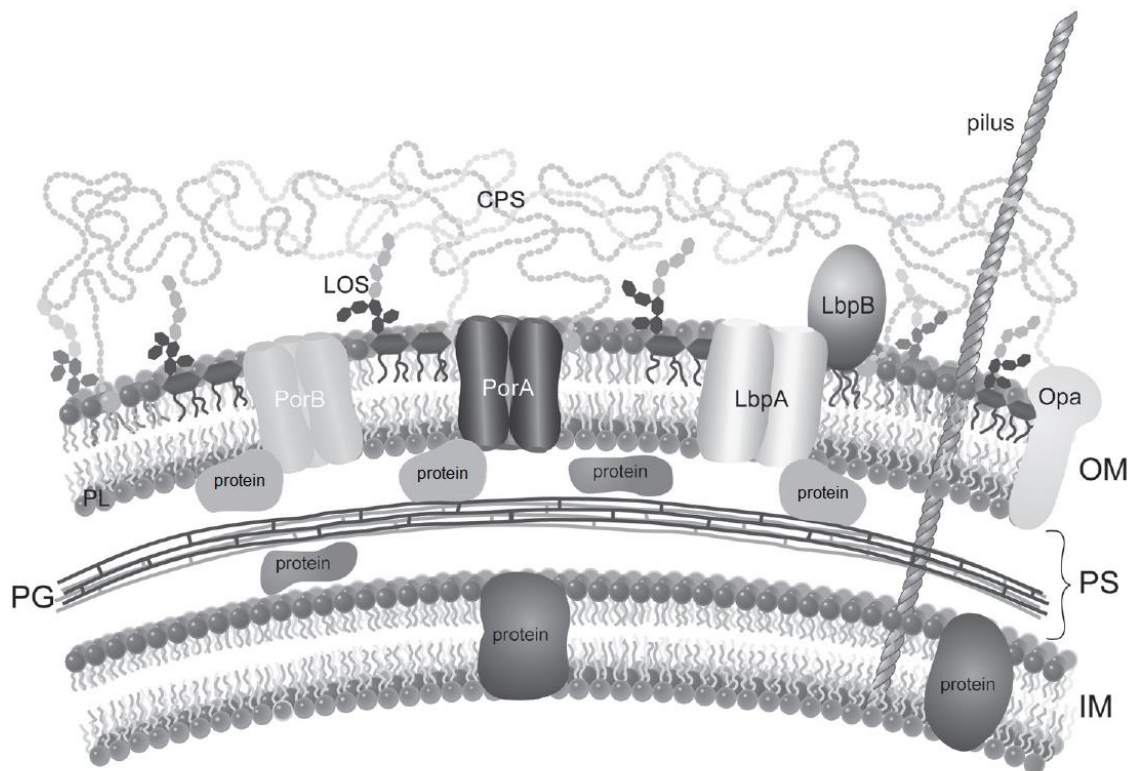


Figure 1 : Représentation en coupe de la surface cellulaire de *Neisseria meningitidis* illustrant les principaux facteurs de virulence.

L'enveloppe cellulaire est principalement composée de la membrane externe (OM) et de la membrane interne (IM), séparé par l'espace périplasmique (PS) qui contient le peptidoglycane (PG). La surface cellulaire est entourée par la capsule polysaccharidique (CPS) qui est ancrée dans la membrane externe par des fragments phosphatidylglycérol. Les pili de type IV (pilus) traversent l'ensemble et s'étendent sur plusieurs nanomètres au-delà de la surface. La membrane interne est composée par une double couche de phospholipide (PL) contenant principalement des protéines impliquées dans le transport de nutriments entre l'espace périplasmique et le cytoplasme. La membrane externe est asymétrique, elle contient des phospholipides sur sa face interne et des lipooligosaccharides (LOS) sur sa face externe. La membrane externe contient également des protéines transmembranaires ou exposées à la surface. On retrouve pour l'exemple, LbpA et LbpB, qui ensemble constituent le récepteur à la lactoferrine, Opa, une protéine d'opacité de classe 5 et les porines PorA et PorB.

D'après Baart¹²⁵

Le pathogénome

Les bases génétiques en cause dans la virulence du méningocoque ne sont pas complètement comprises. Les observations épidémiologiques et expérimentales ont démontré que la capsule polysaccharidique était nécessaire mais pas suffisante pour conférer à elle seule un phénotype de virulence. L'avènement des techniques moléculaires a permis de mieux caractériser les bases génétiques de ce pathogène complexe et de faire le lien entre génotype et phénotype. Plusieurs études visant à identifier et comparer les facteurs de virulence retrouvés au sein du genre *Neisseria* ont été réalisées grâce à la combinaison de techniques *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* et *in silico*^{23,103,126-132}. Ainsi, le méningocoque possède plus d'une centaine de gènes de virulence finement caractérisés sur le plan phénotypique ou putatifs identifiés par bio-informatique. Parmi ces facteurs de virulence, nombreux sont ceux retrouvés au niveau de la membrane externe (Figure 1).

La capsule

Le méningocoque peut être soit capsulé ou non capsulé. Cependant, les souches responsables d'infection sont toujours capsulées (sauf situations exceptionnelles)⁴¹. Les polysaccharides capsulaires principalement associés à la virulence, à l'exception des sérogroupes A et X, sont principalement composés de dérivés de l'acide sialique¹³³⁻¹³⁶. La capsule est le facteur de virulence majeur du méningocoque, essentielle à sa survie, elle permet également de moduler différents aspects de sa pathogénèse. Au cours de l'invasion, la capsule confère au méningocoque plusieurs propriétés comme la capacité de résister système du complément, de se protéger des anticorps bactéricides, d'inhiber les mécanismes de la phagocytose et ainsi de survivre au niveau intracellulaire et dans le sang¹³⁷⁻¹³⁹.

Les gènes de capsules sont localisés au niveau du locus appelé *cps*, une région portée par l'îlot de transfert horizontal A1 (IHT-A1)¹⁴⁰. L'îlot est divisé en 6 régions A, B, C, D, D' et E. La région A contient les gènes impliqués dans la synthèse et la polymérisation des polysaccharides et les régions B et C contiennent les gènes impliqués dans le transport des polysaccharides du cytoplasme vers la surface. Des commutations de capsule (capsule switching en anglais) ont été décrites. Ils sont dus en partie aux similarités structurales et donc génétiques retrouvées entre certains sérogroupes (B, C, Y, W) et résultent de l'échange de gènes spécifiques de chaque séro groupe par transfert horizontal, transformation et recombinaison génomique¹⁴¹.

Les pili

Les souches de méningocoque isolées du rhinopharynx ou d'IIM possèdent des pili de type IV¹⁴². Les pili sont des organelles filamenteuses retrouvées à la surface de la bactérie. La formation de pili complets et fonctionnels chez le méningocoque requière plus de 20 gènes impliqués dans chaque étape de la biosynthèse et nécessaire au fonctionnement¹⁴³. Au sein du genre *Neisseria*, les pili sont formés à partir d'un composant principal, la piline PilE. La partie filamenteuse correspond à un assemblage hélicoïdal de complexes hétéro-multimères de la piline PilE, ponctuée par plusieurs pilines minoritaires comme PilV et PilX et dont l'extrémité est coiffée par la protéine PilC^{144,145}. Après sa translocation dans le périplasma, le signal de sécrétion des prepilines est clivé par la peptidase PilD¹⁴⁶. Une fois maturé, la piline PilE est assemblée dans le périplasma pour former le filament qui est sécrété hors de la membrane externe au travers de pores formés par les protéines de sécrétion PilQ¹⁴⁷. Les pili facilitent les interactions et l'adhésion du méningocoque avec les cellules épithéliales de l'hôte au cours de la colonisation et lors de la phase primaire de l'infection¹⁴⁸. Ils jouent également un rôle important au cours de l'infection ou ils participent à l'attachement du méningocoque au niveau des vaisseaux sanguins et favorisent l'induction de dommages vasculaires importants notamment retrouvés en cas septicémie et de *purpura fulminans*¹⁴⁹. Enfin, les pili permettent l'agrégation bactérienne, favorisent les échanges d'ADN entre des souches de méningocoque et participent à la motilité de la bactérie grâce aux fonctions contractiles¹⁵⁰.

Les lipoolygosaccharides

Les LOS (endotoxine), sont les composants principaux de la membrane externe du méningocoque¹⁵¹. Les LOS sont structurellement proche des lipopolysaccharides (LPS) exprimés par de nombreuses autres espèces bactériennes à Gram négatif mais ne présentent pas de structures répétées au niveau de leur chaîne latérale (antigène O). Plus de 20 gènes impliqués dans la biosynthèse et l'assemblage des LOS ont été décrits¹⁵². A l'image des LPS, les LOS comportent trois régions distinctes, le lipide A, enchâssé dans la membrane externe qui est principalement composée de chaînes d'acides gras et de glucosamines, la chaîne interne qui est composée d'acide 3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique et de résidus heptoses et enfin de la chaîne latérale ou antigène O, qui est composée de courts oligosaccharides¹⁵². Le lipide A est le support de la toxicité de la molécule, or il ne peut se détacher de la bactérie qu'au moment de la lyse (d'où le terme d'endotoxine). Les chaînes interne et latérales sont hautement variables et forment la base de l'immunotypage des LOS^{33,115}.

Les porines

Le méningocoque exprime 2 porines distinctes majoritaires, nommées PorA et PorB. Les porines sont les protéines de membrane externe les plus abondantes chez les souches pathogènes de *Neisseria*¹⁵³. On les retrouve également très représentées à la surface des OMV. Elles sont impliquées dans l'interaction avec les cellules de l'hôte et il a été démontré que différents mécanismes d'opsonisation et certains anticorps bactéricides induits au cours de l'infection les ciblaient spécifiquement¹⁵⁴. Les porines, en particulier PorB sont capables de se fixer et de s'insérer dans la membrane des cellules épithéliales et immunitaires de l'hôte, facilitants ainsi l'attachement intime et les interactions entre la bactérie et celles-ci au cours de l'invasion¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. De plus, PorB est capable d'induire une réaction inflammatoire importante, l'activation et la prolifération des lymphocytes B et de provoquer le relargage de cytokines¹⁵⁹. Grâce à l'activation des récepteurs TLRs (Toll-Like Receptor en anglais d'où l'acronyme « TLR »), en particulier du TLR2, PorB présente également des propriétés adjuvantes, entraîne la sécrétion d'anticorps et joue un rôle dans l'amplification de la réponse immunitaire¹⁶⁰. De son côté, PorA est une cible hautement reconnue par les anticorps bactéricides et entre dans la composition des vaccins OMV¹⁶¹.

Les protéines d'opacités

Le méningocoque possède deux types de protéines d'opacités transmembranaires de classe 5, Opa et Opc¹⁶². La protéine Opc est codée par un seul gène alors que la protéine Opa est codée par plusieurs gènes. Opc agit comme une protéine de fixation à l'héparine ce qui favorise les interactions avec les récepteurs de surfaces HSPGs (Heparan Sulfate ProteoGlycans en anglais) portés par les cellules épithéliales¹⁶³. Enfin, Opc est capable de fixer la fibronectine et d'interagir avec certaines intégrines portées par les cellules de l'endothélium respiratoire, facilitant ainsi l'invasion¹⁶⁴. Opa est capable d'interagir avec plusieurs membres de la famille des CEACAM (CarcinoEmbryonic Antigen-related Cell-Adhesion Molecule en anglais), une classe de molécules largement retrouvées au niveau des cellules épithéliales, endothéliales et immunitaires ce qui favorise l'attachement cellulaire et l'invasion¹⁶⁵.

L'IgA protéase

Le méningocoque possède une protéase capable de couper les IgA et d'inhiber ses fonctions biologiques (IgA protéase)¹⁶⁶. C'est une sérine endopeptidase exprimée par le locus génomique *iga* codant pour un précurseur composé de trois domaines comprenant : un peptide signal N-terminal, un domaine translocation membranaire en C-terminal (Iga β) et le domaine central sécrété (IgaP α) comprenant sous-domaine de la protéase (IgaP) suivi de la région la plus polymorphe, le sous-domaine α -peptide (Iga α) avec des signaux de localisation nucléaire (NLS)^{167,168}. L'IgA protéase est capable de dégrader les IgA sur les surfaces muqueuses. Plus récemment, il a été montré que les NLS dans le domaine α (Iga α) permette le transport de l'IgaP α vers le noyau de la cellule cible où elle y opère le clivage de la sous-unité p65/RelA du facteur transcriptionnel NF- κ B (Nuclear Factor en anglais)¹⁶⁹. Ce clivage est associé avec la capacité du méningocoque à induire l'apoptose dans les cellules infectées. L'induction de l'apoptose est corrélée avec le pouvoir invasif des souches de *N. meningitidis*.

Les mécanismes d'acquisition du fer

Les mécanismes d'acquisition du fer sont depuis longtemps reconnu comme des déterminant majeur de la virulence, indispensable à la survie de la bactérie au cours de la colonisation et de l'infection¹⁷⁰⁻¹⁷². En effet, le fer est un métal de transition qui joue un rôle essentiel dans plusieurs processus biologique (élément régulateur, cofacteur enzymatique, synthèse des acides aminés, production d'énergie). Chez l'hôte, la majorité du fer est stockée au niveau intracellulaire principalement par des molécules comme l'hémoglobine ou la ferritine^{171,172}. Au niveau extracellulaire, le fer est retrouvé complexé avec des protéines de haute affinité comme la transferrine présente dans le sérum et la lymphe ainsi que la lactoferrine présente dans le lait maternel et les sécrétions corporelles¹⁷². Le méningocoque ne produit pas de sidérophores mais a évolué et développé plusieurs mécanismes lui permettant d'acquérir du fer à partir des protéines humaines comme la lactoferrine, la transferrine et l'hémoglobine¹⁷³⁻¹⁷⁸.

Deux systèmes de transport à deux composants sont impliqués dans l'acquisition de la transferrine (TbpA et TbpB) et de la lactoferrine (LbpA et LbpB). Les protéines transmembranaires TbpA et LbpA forment le canal enchâssé dans la membrane externe et les lipoprotéines TbpB et LbpB favorisent les interactions et la fixation du substrat. Au niveau génétique le gène *tbpB* est situé en aval du gène *tbpA*, les deux étant organisés en opéron¹⁷⁹.

Les gènes *lbpA* et *lbpB* sont eux contigus et légèrement chevauchantes^{180,181}. On peut noter que le gène *lbpB* contient une répétition polyG (poly-Guanine) impliquée dans la variation de phase. Les protéines TbpA et TbpB sont toutes les deux capables de fixer indépendamment l'une de l'autre la transferrine, là ou seulement la protéine LbpB est capable de fixer la lactoferrine¹⁸².

Les souches de méningocoque pathogènes sont également capables d'utiliser le fer de l'hème, de l'hémoglobine et du complexe hémoglobine-haptoglobine¹⁷⁵. Le méningocoque possède deux récepteurs de membrane externe indépendants lui permettant d'acquérir du fer grâce à la fixation de l'hémoglobine ou de l'un de ses dérivés. Le premier, formé de la protéine HmbR, est capable de fixer l'hème et l'hémoglobine¹⁷⁶. Le second, le complexe formé des protéines HpuA et HpuB, est capable de fixer l'hémoglobine et l'hémoglobine complexée à l'haptoglobine¹⁸³. Les récepteurs de l'hémoglobine sont inégalement distribués entre les souches de méningocoque. Les souches invasives possèdent HmbR ou les deux récepteurs et la présence de HpuAB seul est rarement associée à l'infection¹⁸⁴. Ces deux récepteurs sont régulés par variation de phase et 70-90% des isolats invasives expriment l'un ou les deux récepteurs^{120,121,184}. Le complexe HpuAB est également un système de transport à deux composants. Il est constitué de la protéine transmembranaire HpuB qui forme le canal retrouvé enchâssé dans la membrane externe et de la lipoprotéine HpuA qui favorise la fixation de l'hémoglobine et ses dérivés¹⁸³. Le récepteur HpuAB est codé par deux gènes retrouvés sur un même opéron, *hpuA* et *hpuB*. Le gène *hpuA* présente également au niveau de sa région codante une séquence polyG répétée qui régule sa transcription par variation de phase^{121,183}. A l'inverse des deux systèmes présentés précédemment, la fixation de l'hémoglobine requiert l'expression des deux protéines HpuA et HpuB¹⁸⁵. Le système HpuAB se démarque également des systèmes LbpAB et TbpAB de par sa capacité à interagir avec des sources de fer exogènes (hémoglobine non humaine). Le second complexe, est constitué de la protéine transmembranaire HmbR qui forme le canal enchâssé dans la membrane et qui présente des homologies avec les protéines LbpA, TbpA et HpuB mais à l'inverse de ces protéines, il n'est pas agrémenté par une lipoprotéine externe^{176,186}. Au niveau génomique le gène *hmbR* est retrouvé à côté du gène codant pour l'hème oxygénase *hemO* et contient une séquence polyG répétée impliquée dans la variation de phase¹²⁰. La protéine HmbR est capable de fixer l'hémoglobine mais aussi l'hème libre avec une haute affinité. Le système HmbR reconnaît préférentiellement l'hémoglobine humaine mais est également capable de fixer d'autres sources d'hémoglobine exogènes^{176,186}.

1.1.2.4. Etude des populations et comparaison génomique

Structure des populations

N. meningitidis est une bactérie pathogène dévastatrice qui bien que décrite depuis plus de 200 ans reste aujourd'hui en de nombreux points, énigmatique. La description du portage asymptomatique au sein de la population générale a permis de mieux comprendre le style de vie de ce pathogène facultatif commensale des voies respiratoires de l'Homme. Différentes approches visant à caractériser les isolats invasifs et de portage ont été développées afin de mieux comprendre la pathogénèse du méningocoque. Les techniques traditionnelles de typage sérologiques initialement développées ont été communément utilisées pendant plusieurs années, notamment la détermination du type capsulaire (séro groupe), et restent aujourd'hui encore couramment utilisées en routine lors du diagnostic biologique¹⁸⁷. Cependant, le méningocoque est une bactérie naturellement hautement compétente pour la transformation et les échanges de matériel génétique sont fréquents entre différentes souches¹⁸⁸. De plus, les structures antigéniques de surfaces utilisées pour l'identification sont soumises à une forte pression de sélection et leur expression est finement régulée. De ce fait la corrélation entre les profils antigéniques et les profils génétiques est faible. Cela rend les techniques de typage phénotypique peu fiable pour établir les liens de parenté phylogénique entre les différentes souches. Au cours des 30 dernières années, de nombreuses approches ont été développées afin de d'apporter une alternative aux méthodes sérologiques. Parmi ces approches, la MLST a été la technique de référence³⁴. Elle est basée sur la caractérisation du profil allélique de 7 gènes codant pour des enzymes de « ménage ». Chaque allèle variable se voit attribuer un nouveau numéro et la combinaison des différents allèles permet de définir le ST de la bactérie (Sequence Type en anglais d'où l'acronyme « ST » largement utilisé). La MLST présente plusieurs avantages. Elle est rapide, non ambiguë et les résultats obtenus sont exportables et comparables dans le monde entier.

Malgré l'importante diversité retrouvée entre les souches, l'analyse des données moléculaires a révélé que la diversité retrouvée au sein de cette espèce était hautement structurée¹⁸⁸⁻¹⁹⁶. En effet, un nombre limité de STs sont fréquemment isolés et apparaissent comme ayant une large distribution temporelle et géographique.

Par MLST, il a également été démontré que les isolats retrouvés en portage asymptomatique sont génétiquement plus diversifiés que les isolats retrouvés en situation invasive, en particulier ceux responsables d'épidémies. En effet, la grande majorité des cas d'infection invasive sont associées à un nombre limité de cc, appelés couramment complexes clonaux hyper-invasives. C'est souches apparaissent comme potentiellement hautement invasives. En présence d'événements de recombinaison fréquents, la persistance de cc particuliers suggère l'importance de la pression de sélection dans le maintien de la structure des populations. Des facteurs tel que les déterminants spécifiques de la virulence, la transmissibilité et le réservoir humain freinent les échanges de gènes entre les souches de méningocoque¹⁹⁷⁻²⁰⁰. Cette observation est en lien direct avec le postulat qui définit la structure des populations comme hautement régulée par le système immunitaire de l'hôte. En conclusion, la MLST peut être utilisé par les laboratoires du monde entier possédant les moyens nécessaires pour séquencer de l'ADN afin d'analyser de façon précise et à grande échelle l'épidémiologie dynamique du méningocoque. Cependant, la MLST reste une approche conservative et ne permet pas une discrimination au niveau clonale ce qui a été possible grâce à l'approche WGS.

Comparaison génomique

Les nombreux progrès réalisés en matière de séquençage haut débit et d'approche bio-informatique ont permis de mieux comprendre la dynamique évolutive globale retrouvée au sein du genre *Neisseria*. Les premières études génomiques réalisées ce sont principalement intéressées à explorer les différences retrouvées entre trois espèces étroitement liées, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* et *N. lactamica*, qui bien que génétiquement proches présentent des phénotypes très différents, notamment en termes de virulence. Les résultats obtenus ont permis d'établir le rôle majeur des transferts horizontaux dans la spéciation de ces espèces et leur implication dans l'évolution structurale de la population. Chez le méningocoque, l'analyse génomique a par exemple été utilisée pour définir les spécificités génétiques impliquées dans sa pathogénèse et identifier des facteurs de virulence nouveaux dont certains ont été utilisés en formulation dans les récents vaccins recombinants²⁰¹. Cependant, malgré les nombreux efforts déployés au cours de ces dernières années, toutes les tentatives visant à définir précisément le pathogénome du méningocoque et à identifier les sous-ensembles de gènes spécifiquement associés aux phénotypes invasifs ont échouées. Concernant les résultats obtenus, la plupart de ces études ont conclues qu'à l'exception de la région codant pour les gènes capsulaires, aucun autre ensemble de gènes impliqués dans la virulence n'était exclusivement présent chez toutes les souches invasives.

L'amélioration et la généralisation des techniques NGS a permis le séquençage de plusieurs centaines de génomes de *Neisseria*. Ces données représentent une source majeure d'information pour l'étude de la diversité bactérienne. Néanmoins, la quantité importante de données générée par NGS nécessite d'être compilée, analysée et interprétée. L'une des approches couramment utilisées consiste à identifier les polymorphismes nucléiques ponctuels (Single Nucleotide Polymorphisms en anglais d'où l'acronyme « SNP » couramment utilisée) en alignant les séquences NGS sur un génome de référence complet et caractérisé. Cependant, cette approche est inappropriée pour les espèces les plus diverses comme le méningocoque qui présente une haute diversité génétique. En effet, la variabilité du méningocoque ne repose pas seulement la présence de SNPs ponctuels mais plutôt sur de larges régions polymorphiques issue d'événement de recombinaison. De plus, cette approche nécessite un génome de référence complet, de haute qualité et génétiquement proche des souches analysées. Enfin, à l'image des techniques d'hybridation de l'ADN anciennement utilisées, cette approche permet une comparaison avec les gènes présents sur la souche de référence et non une comparaison globale du pool de gènes retrouvés chez les souches étudiées, ce qui présente un inconvénient majeur dans l'analyse des gènes accessoires.

L'assemblage *de novo* représente une approche alternative plus largement applicable au méningocoque. Une fois assemblées, les séquences peuvent être annotées grâce à la comparaison avec des bases de données contenant des gènes ou génomes déjà caractérisés. La base de données BIGSdb a été développée spécifiquement pour répondre à cette problématique et permettre l'analyse des données de séquençage de génomes complets sur une large population de souches¹⁰⁶. Elle repose sur la comparaison du profil allélique gène par gène du contenu génomique. Grâce à cette approche il est possible de comparer simultanément plusieurs génomes même relativement distants les uns des autres.

Synthèse

La virulence du méningocoque, une bactérie à multiplication extracellulaire, a de nombreuses facettes et plusieurs facteurs peuvent être impliqués aux différentes étapes de l'interaction entre la bactérie et son hôte.

Trois étapes majeures conditionnent le développement d'une infection invasive à méningocoque et déterminent les stratégies thérapeutiques et prophylactiques :

- La transmission et l'acquisition
- La bactériémie
- Le franchissement de la barrière hémato-méningée

L'acquisition rhino-pharyngée conduit le plus souvent à un portage asymptomatique (souches de portage). Les souches méningocoque isolées chez les porteurs sains ont un potentiel pathogénique faible. Elles ne produisent pas (ou très peu) de polysides capsulaires²⁰². Par opposition, l'acquisition d'une souche au potentiel pathogénique important (rarement rencontrées en portage asymptomatique) peut conduire à l'infection invasive. Les bactéries adhèrent via les pili à des récepteurs spécifiques encore mal définis retrouvés au niveau de l'épithélium du tractus respiratoire supérieur. Cette adhésion provoque à la surface des cellules épithéliales la formation d'une zone très dense en bactéries (plaque de cortex), enrichie en composants tels que les récepteurs CD44 (Cluster of Differentiation), ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule) et le récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou EGFR^{203,204}.

L'ère génomique et les différentes approches moléculaires développées ces dernières années ont grandement contribué à mieux comprendre certains des facteurs bactériens impliqués dans la balance entre les deux facettes de cette interaction du méningocoque avec son hôte : le portage asymptomatique très fréquent, et l'invasion qui est beaucoup plus rare. Cette dualité entre Dr Jekyll et Mr Hyde illustre parfaitement cet organisme complexe. Ainsi, il apparaît que la capsule polysaccharidique est strictement nécessaire à la virulence en permettant à la bactérie d'échapper à l'activité bactéricide du complément et à la phagocytose. La capsule permet également de résister à la dessiccation, favorisant ainsi la phase de transmission. Cependant sa présence pourrait interférer avec la capacité d'adhésion du méningocoque. La modulation de la capsule pourrait donc être un facteur essentiel dans l'interaction bactérie-hôte. A côté de la capsule, le méningocoque possède plus d'une centaine de facteurs de virulences impliqués dans les différentes étapes de sa pathogénèse et en particulier lorsque les bactéries se retrouvent dans la circulation sanguine.

La capacité des souches à croître dans le sang est primordiale pour la virulence. *N. meningitidis* peut utiliser une gamme restreinte de sources de carbone, comme le lactate, le glucose et le pyruvate mais la concentration de ces éléments est très variable entre les différents sites anatomiques de l'hôte.

L'acquisition du fer est également indispensable à la croissance bactérienne et nécessite l'expression de différents mécanismes capables de fixer et extraire le fer contenu au sein de molécules de transports retrouvées dans les différents compartiments du corps humain rencontrés par la bactérie de la colonisation à l'infection. Le fer joue un rôle important comme cofacteur enzymatique mais également comme métal de transition dans les réactions redox.

Ces différents facteurs de virulence ont été souvent étudiés et comparés entre des souches d'origine diverses mais leur rôle pendant un phénomène épidémique clonal n'a pas été abordé. Dans ce contexte l'étude de l'épidémie normande et la comparaison de souches invasives et de portage en apparence clonales grâce aux méthodes de caractérisation moléculaires fines présente un fort intérêt.

1.2. Travail personnel

La récente épidémie normande et l'étude de portage réalisée à son acmé ont rendu possible la comparaison génomique et la caractérisation phénotypique de souches de méningocoque génétiquement très proches, les unes isolées en portage asymptomatique et les autres en situation invasive.

D'où l'étude originale présentée *infra* telle que publiée dans Virulence (2018 ;9 :923-929) et ensuite discutée de façon davantage exhaustive que dans l'article au regard des données de la littérature, avant de tirer quelques perspectives pour ce champ.

1.2.1. Publication dans Virulence

Differential expression of hemoglobin receptor, HmbR, between carriage and invasive isolates of *Neisseria meningitidis* contributes to virulence: lessons from a clonal outbreak

Julien Sevestre^{a,b}, Seydina M. Diene^{c,¥}, Myriam Aouiti-Trabelsi^b, Ala-Eddine Deghmane^b, Isabelle Tournier^d, Patrice François^c, François Caron^{a,e} and Muhamed-Kheir Taha^b

^aResearch group on microbial adaptation (EA 2656) Normandie University, UNIROUEN, Rouen, France; ^bInvasive bacterial Infections Unit and National reference center on meningococci, Institut Pasteur, Paris, France; ^cGenomic research laboratory, Service of infectious diseases, Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland; ^dInserm U1245, UNIROUEN, Normandie University, Normandy center for genomic and personalized medicine, Rouen, France; ^eInfectious diseases department, Rouen University Hospital, Rouen, France

ABSTRACT

Carriage and invasion balance in the pathogenesis of *Neisseria meningitidis* was analyzed during a recent clonal outbreak of meningococcal B in Normandy, France, that offered the opportunity to compare six isolates undistinguishable by conventional typing (B:14:P1.7,16:F3-3/ST-32) isolated from invasive disease or pharyngeal asymptomatic carriage. Data from animal model (transgenic mice rendered susceptible to *N. meningitidis* infection) showed an absence of virulence for two non-capsulated carriage isolates, an intermediate virulence for two capsulated carriage isolates and a marked virulence for two capsulated invasive isolates. This differential pathogenesis well correlated with whole genome sequencing analysis that clustered both isolates of each group together, forming their own arm within the Norman cluster. Gene-by-gene analysis specified that genes involved in iron acquisition were among the elements differentially represented in cluster of invasive isolates compared to cluster of capsulated carriage isolates. The hemoglobin receptor encoding gene *hmbR* was in an ON-phase in the capsulated invasive isolates while carriage capsulated isolates were in an OFF-phase. An ON-phase variant of a capsulated carriage isolate showed enhanced virulence. These data underline the role of phase variation (ON/OFF) of HmbR in the balance between disease isolates/carriage isolates.

ARTICLE HISTORY

Received 22 March 2018
Revised 30 January 2018
Accepted 23 March 2018

KEYWORDS

Animal model; carriage; disease; genomics; iron acquisition; *Neisseria meningitidis*; virulence

Neisseria meningitidis (Nm) is a common inhabitant of the human nasopharynx asymptotically carried in around 3% to 25% of the population worldwide at any time. Rarely, a virulent isolate invades the bloodstream and spreads to provoke devastating life-threatening invasive meningococcal diseases (IMD) such as meningitis and meningococemia. Phase variations create heterogenic phenotypes within a clonal bacterial population that can then facilitate switching between different virulent status [1]. Nm is also capable of spontaneous natural transformation allowing horizontal gene transfer between isolates that facilitates virulent clones to escape host immunity [1]. Thus, in most countries cases of IMD are sporadic, with a large diversity of isolates encountered during a given period, while clonal outbreaks remain uncommon.


The genesis of IMD is not completely elucidated [2]. Invasion involves host susceptibility factors and mainly

bacterial virulence. The major virulence factor is the capsule which is critical for Nm to survive in the blood. Virtually all isolates from IMD express the capsule but other virulence factors are also required for full pathogenesis such as pili, lipooligosaccharide and several outer membrane proteins [3]. In addition, iron-acquisition mechanisms have a dominant role in host-pathogen interactions as iron is an essential micronutrient for Nm (involved as enzyme cofactor or regulatory element) [4]. Several genes encoding these factors undergo phase variation leading to an “ON” or “OFF” state of expression [5].

Among the 12 serogroups, defined according to the composition of the capsular polysaccharide, only 6 are responsible for almost all cases of IMD worldwide [6]. Isolates of these 6 serogroups can further be genotyped by multilocus sequence typing that analyze the DNA sequence from seven chromosomal loci and assign a

CONTACT Muhamed-Kheir Taha  mktaha@pasteur.fr  IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille University, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France.

¥ Present address: IHU Méditerranée Infection, Aix Marseille University, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France.

 Supplemental data for this article can be accessed on the <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1460064>.

© 2018 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

sequence type (ST) for the allele combination of these 7 genes. The related STs (sharing at least 5 alleles) are then clustered into clonal complexes (CC). Few of these CCs are prevalent in IMD and are called hyperinvasive isolates [7].

Few studies used genomic approaches to address differences in virulence between different carriage and invasive isolates [8–10]. The Normandy region has recently experienced a clonal outbreak of IMD due to the spread of an hypervirulent strain of group B, serotype 14, serosubtype P1.7,16 and sequence-type ST-32 of the clonal complex 32 (B:14:P1.7,16/ST-32) [11]. During this crisis, it has been established a collection (unique in France and rare in the World) of isolates apparently identical according to conventional typing (i.e., B:14:P1.7,16/ST-32), some from IMD and others from asymptomatic oropharyngeal carriage. Interestingly, some of the isolates found in asymptomatic carriers did not express the capsule and despite the genogroup B they were non-serogroupable (i.e., NG(B):14:P1.7,16/ST-32). Thus the aim of this study was to analyze the virulence determinants of these related isolates using whole genome sequencing (WGS) and transgenic mice rendered susceptible to Nm infection.

Six isolates from the Norman clone were compared: two capsulated isolates from invasive disease (InvB), two capsulated isolates from asymptomatic carriage (CarB) and two non serogroupable isolates also from asymptomatic carriage, suggesting the absence of capsular polysaccharide at their surface (CarNG) (see Table 1 and supplementary material for the detail of isolates selection). By genomic typing, all the isolates showed the same fine type and MLST typing (i.e., B:14:P1.7,16:F3-3/ST-32). To gain more resolution, the six isolates were submitted to WGS and compared against two reference strains from the same clonal complex (see supplementary material for the characteristics of the two reference

strains as well as the detail of genomic analysis). The phylogenetic tree (Fig. 1A) based on the whole genomic sequencing and SNP (single nucleotide polymorphisms) analysis, first demonstrated that the six Norman isolates (both carriage and invasive isolates) formed a specific cluster, clearly separated from the two reference strains (with about 732 to 1528 SNPs between the six isolates). The tree also showed that both isolates of each group (invasive capsulated [Inv], carriage capsulated [CarB] and carriage non-groupeable [CarNG]) were paired together, forming their own arms within the Norman cluster (Fig. 1A). Of note non-groupeable carriage isolates diverged earlier and were located on a separated arm within the Norman cluster while the invasive and the capsulated carriage isolates appeared closely related (Fig. 1A). We next explored whether the differences between the three groups may be associated to specific genes by using a gene-by-gene analysis on the basis of either the whole pan genome (data not shown) or the 1605 genes of core genome MLST (Fig. 1B). For the two analysis similar results were obtained for both isolates of the three subgroups, as well as for a comparison with a panel of recent French invasive isolates belonging to serogroup B and CC32 (see Figure S1 in supplementary data). To focus on pathogenesis we performed a targeted gene-by-gene analysis on the basis of genes involved in meningococcal virulence such as the capsule synthesis, iron acquisition mechanisms and Maf toxin/anti-toxin systems (Fig. 1C). Interestingly, this latter comparison separated more clearly the capsulated carriage isolates from the invasive isolates (Fig. 1C). In particular, the isolates harbor hemoglobin receptor, HmbR, alone but not the HpuAB outer membrane transport system. Together, these data suggest that genetic differences among these isolates may have an impact on their respective virulence.

The genetic differences revealed by the genomic analysis prompted the analysis of pathogenesis in our

Table 1. Characteristics of the isolates used in this study.

Year	Age (years)	Disease	Serogroup	Genogroup	Genotyping			PubMLST accession (ID)	
					PorB (serotype)	PorA-VR1	PorA-VR2		
Capsulated invasive isolates (InvB)									
InvB-1483	2008	13	Purpura fulminans	B	B	14	7	16	35823
InvB-2018	2008	3	Meningococemia with petechiae	B	B	14	7	16	35824
Capsulated carriage isolates (CarB)									
CarB-3141	2008	24	Carriage	B	B	14	7	16	35821
CarB-3644	2008	19	Carriage	B	B	14	7	16	35822
Non-capsulated carriage isolates (CarNG)									
CarNG-1126	2008	16	Carriage	NG	B	14	7	16	35819
CarNG-2963	2008	9	Carriage	NG	B	14	7	16	35820
Reference strain for NGS									
Ref-MC-58	1983		Invasive	B	B	15	7	16	240
Ref-H44-76	1976		Invasive	B	B	15	7	16	237

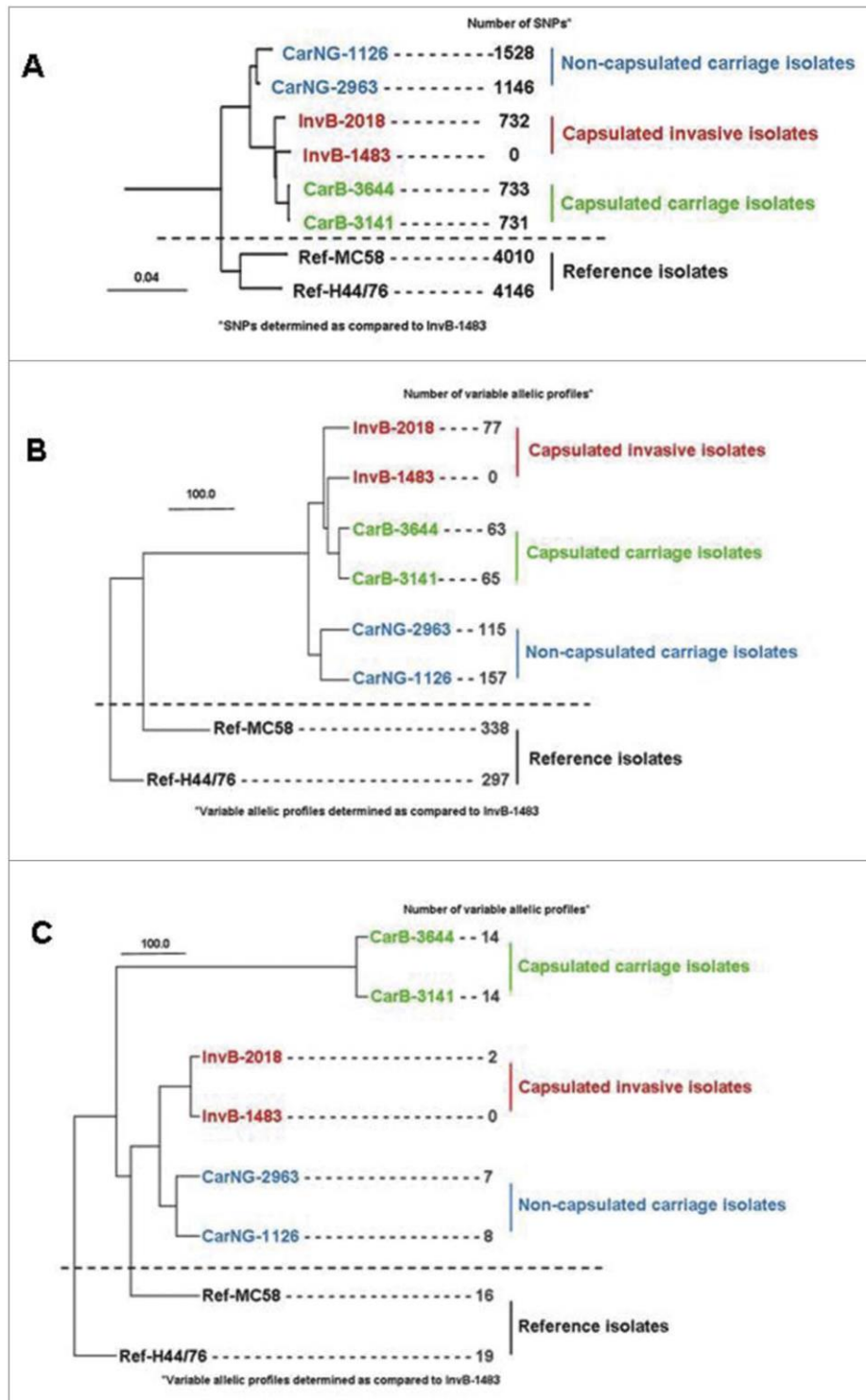


Figure 1. Phylogenetic trees comparing the two reference strains (MC58 and H44/76) with the six isolates from the clonal Norman outbreak: two capsulated isolates from invasive disease (InvB-1483 and InvB-2018), two capsulated isolates from asymptomatic carriage (CarB-3141 and CarB-3644) and two non-groupable (i.e., non-capsulated) isolates from asymptomatic carriage (CarNG-1126 and CarNG-2963); (A) global analysis based on whole genomic single-nucleotide polymorphisms; (B) gene-by-gene analysis based on the 1605 genes of core genome MLST; (C) gene-by-gene analysis based on 102 genes involved in meningococcal virulence (capsule genes, iron acquisition genes (*hpuAB*, *hmbR*, *fetA*, *tbpAB* and *lbpAB*) and Maf toxin/anti-toxin system) that were selected from the drop menu on the scheme box on the PUBMLST.org.

previously described model of experimental infection in transgenic mice expressing the human transferrin (hTf) (see supplementary material for the detail of the procedure) [12]. A total of 10–18 mice were infected by a given Norman isolate and observed at 2h, 6h and 24h post-bacterial challenge. As expected, non-groupable carriage isolates were not able to establish an infection in mice as only low numbers of bacteria were detected after 2h of infection and no detectable bacteria were identified in blood after 6h and 24h of infection. In contrast, in both animal groups infected by capsulated isolates (invasive and carriage), all mice were ill and bacteremia was detectable after 2, 6 and 24h of infection. However, invasive isolates provoked significant higher bacterial load in blood as well as higher IL-6 and KC levels than carriage capsulated isolates (details in Figure S2 in supplementary data).

WGS indicating that iron acquisition genes were among those that discriminate clusters of invasive isolates from capsulated carriage isolates, we next explored whether the differences in virulence between these two groups could be linked to ability to capture iron (see supplementary material for the detail of the analysis). Controls were first performed to demonstrate that the four isolates (InvB-1483, InvB-2018, CarB-3141, CarB-3644) grew without difference in medium supplemented with iron nitrate. It was then observed that the two groups also grew similarly in medium with human transferrin as unique iron source, and this was consistent with the fact that the four isolates harbored the same allelic profiles of the transferrin binding genes *tbpA* and *tbpB*. On the other hand, the addition of human or murine hemoglobin as unique iron source allowed the growth of invasive isolates (Fig. 2A) but not of capsulated carriage isolates (Fig. 2B). Interestingly the hemoglobin receptor encoding genes (*hmbR*) differed among the four strains in the number of G residues. The two capsulated carriage isolates showed 10 and 11 G residues in their polyguanine (G) tracts leading to an “OFF” phase of the corresponding *hmbR* genes (only multiple of G triplets are in “ON” phase). In contrast, both invasive isolates contained 15 G residues (i.e., multiples of G triplets and thus in “ON” phase) (details in Figure S3 in supplementary data).

This led us to select an “*hmbR*-ON” phase variant of capsulated carriage isolates by plating the wild-type carriage isolates (i.e., OFF) on iron depleted plate supplemented with human hemoglobin. Bacteria from recovered colonies were controlled by Sanger sequencing for the number of G residues and found to be “ON”. These phase variants (named CarB-3141-ON and CarB-3644-ON) also recovered the ability to grow, as the invasive isolates level on iron depleted plates supplemented with hemoglobin as unique iron source (Fig. 2C).

We next tested both isogenic capsulated carriage isolates “*hmbR*-OFF” (i.e., wild-type) and “*hmbR*-ON” (i.e., phase variant) in the animal model described above (6 mice in each group). At 2h and 6h post-infection bacterial counts in the blood and levels of pro-inflammatory cytokines were significantly higher in mice infected by the phase variant isolate “*hmbR*-ON” compared to mice infected by the wild-type isolate “*hmbR*-OFF” (Fig. 3). These results suggested that the hemoglobin receptor enhanced the bacterial survival in the blood during the infection as well as the ability to provoke a higher systemic infection. We finally focused on the spleen as it is the frontline in mechanical filtration of red blood cells and in recycling hemoglobin. Compared to spleens from control mice (non-infected), infected spleens (either with OFF or ON isogenic isolates) showed more cellular density in the follicular regions of the white pulp as well as more red blood cells in the red pulp, confirming that both isolates induced a systemic infection. Of note bacteria and macrophages were only observed in the spleen of mice infected with a phase variant capsulated carriage isolate “*hmbR*-ON”, underlying their global enhanced virulence and their capacity to exceed the spleen phagocytosis ability (Fig. 4).

Thus the concordant and major results were that Nm isolates apparently identical by conventional genotyping (B:14:P1.7,16/ST-32) were distinguishable either by WGS and by their hierarchy of virulence in a transgenic mice model. In mice, non-capsulated carriage isolates failed to induce any infection, capsulated carriage isolates produced moderate disease and invasive isolates a marked systemic infection. Classically, IMD occurs upon acquisition of hyperinvasive isolates that usually show high attack rate but are rarely detected as carriage isolates. The phylogenetic analysis based on virulence genes (Fig. 1C) showed that non-groupable carriage isolates remained close to the invasive isolates despite the complete loss of invasiveness in the mouse model of infection. This confirmed that the capsule expression is the major determinant of Nm virulence as its absence compromised bacterial invasiveness. In contrast, the genomic analysis on the basis of genes involved in virulence allowed more distinction among the carriage and invasive capsulated isolates that showed the same genotype (B:14:P1.7,16/ST-32) (Fig. 1C).

Our results highlight the role of iron acquisition systems in meningococci during infection. It is well known that pathogenic *Neisseria* differs from many other pathogenic bacteria by the absence of siderophores production and the direct use of human sources of iron (transferrin, lactoferrin, haptoglobin and hemoglobin) through specific receptors [4]. It is also known that changes in virulence genes may be responsible for the within-host

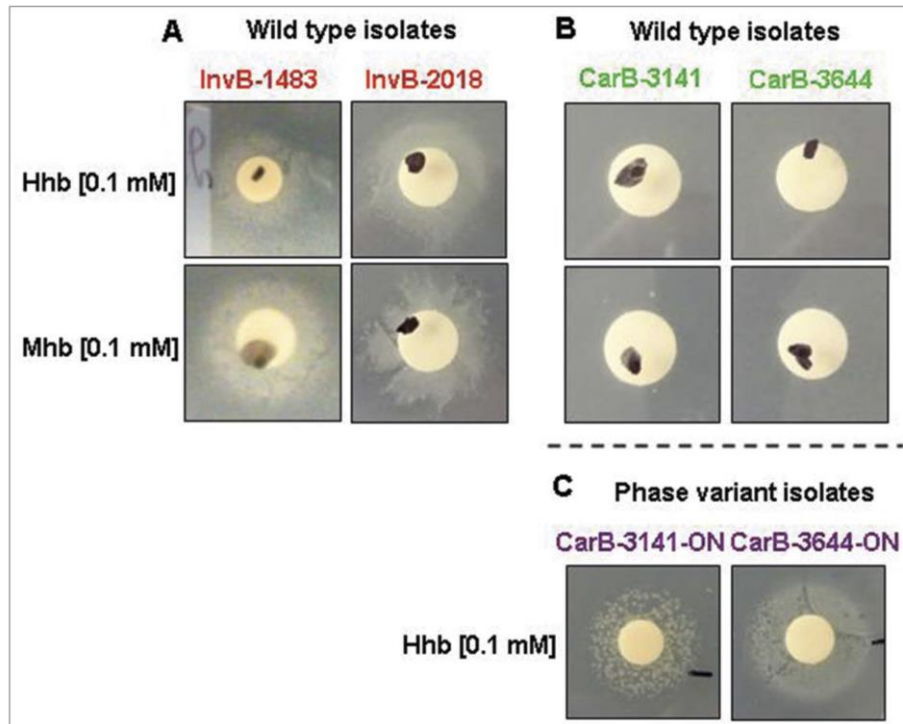


Figure 2. Ability or not of isolates from the clonal Norman outbreak to grow on iron depleted plate around disk impregnated with human (Hhb) or murine (Mhb) hemoglobin; (A) growth of two capsulated isolates from invasive disease (InvB-1483 and InvB-2018); (B) no growth of two capsulated isolates from asymptomatic carriage (CarB-3141 and CarB-3644); (C) growth of “ON” phase variants of the two previous carriage isolates (CarB-3141-ON and CarB-3644-ON) selected to express the hemoglobin receptor protein (HmbR).

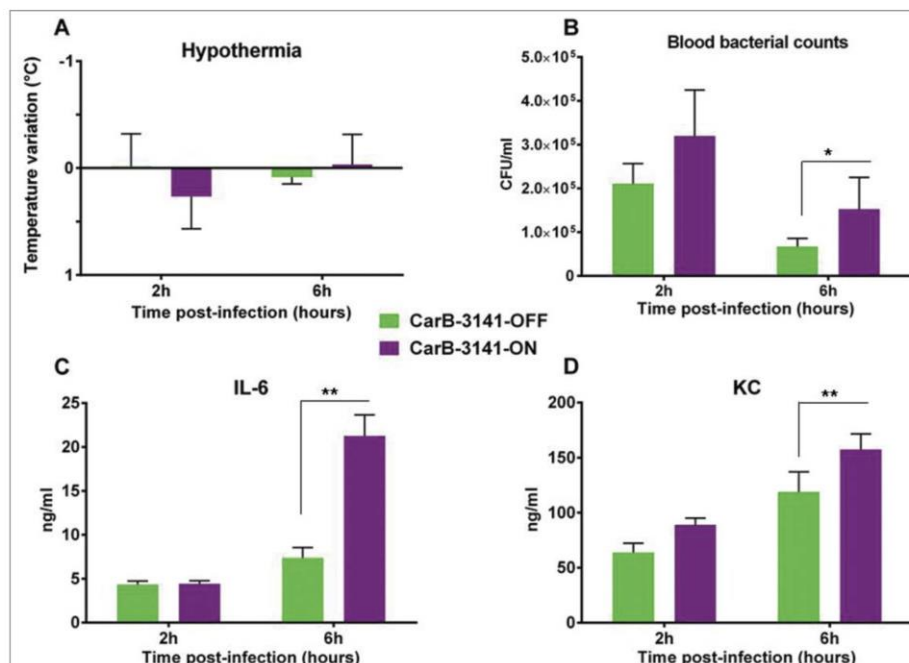


Figure 3. Comparative virulence in transgenic mice of wild-type capsulated isolates from asymptomatic carriage (CarB-3141 and CarB-3644) and their phase variants able to express the HmbR receptor protein (CarB-3141-ON and CarB-3644-ON); (A) kinetic of hypothermia post infection (i.e., symptom of infection); (B) blood bacterial counts; (C and D) levels of inflammatory cytokine IL-6 (C) and KC (D). Each point represents the mean of values achieved in 6 animals for each isolate of the given group. (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$).

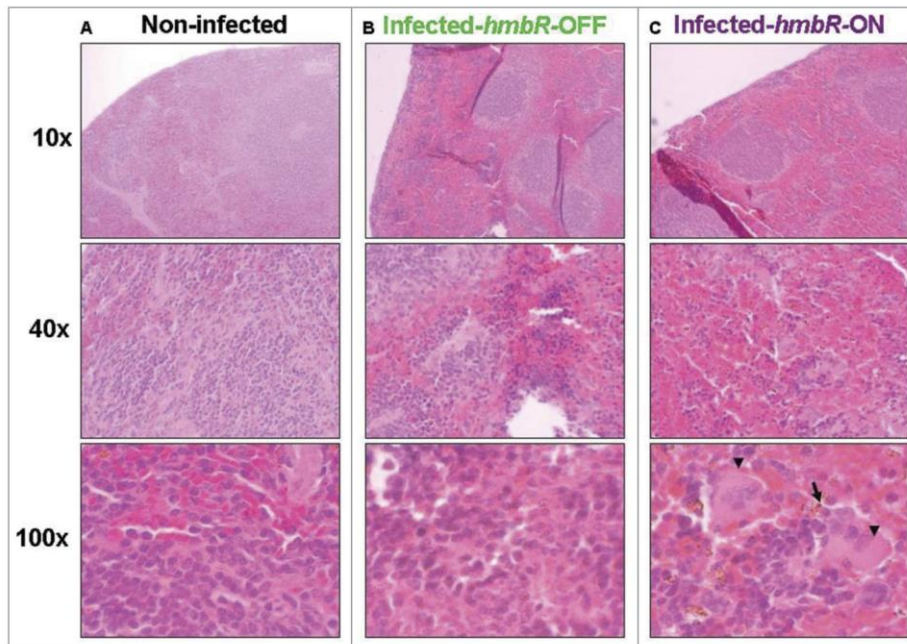


Figure 4. Spleen histopathology at different magnifications in transgenic mice either: (A) non-infected (negative control), (B) infected by the wild-type capsulated carriage isolate (CarB-3141-OFF) unable to express HmbR or (C) infected by the phase variant capsulated carriage isolate (CarB-3141-ON) able to express HmbR. Bacteria (arrow) and macrophages (arrow heads) are visible only for this later isolate. Presented data are typical representative pictures of three repeats for each of the two isogenic isolates (CarB-3141-OFF and CarB-3141-ON).

fitness allowing Nm to be adapted for carriage and transmission [13]. Our data demonstrated a marked role of the hemoglobin receptor, HmbR, in meningococcal virulence (beside capsule expression). In Nm, the HmbR and HpuAB outer membrane transport systems allow the bacteria to use heme-loaded proteins as iron source [14,15]. Nm strains express HmbR, HpuAB or both systems [16]. Most invasive strains express HmbR alone or both heme uptake systems, as reported in isolates of the hyperinvasive clonal complex ST-11 while most of the isolates of the clonal complex ST-32 (as our isolates) only harbor HmbR [16]. Strains expressing only the HpuAB heme uptake system have been mostly described as carriage strains [16]. *hmbR* and *hpuA*, that contain a poly (G) tract, undergo phase variation [17,18]. In the current work the expression of HmbR in invasive isolates but not in carriage isolates was suggestive of involvement in enhancing virulence (ON) or association with carriage (OFF) in agreement with previous reports [19]. In particular, our data in mice showed an enhanced virulence of the “ON” variant derived by phase variation from an “OFF” carriage serogroup B isolate and the direct evidence of the HmbR implication. Previous animal experiments having focused only on blood infection by Nm had suggested that HmbR protein is not required during early stages of invasion [20]. Indeed, binding transferrin (mediated by TbpAB) seems to play an important role during blood phase of Nm infection while binding of

hemoglobin could contribute to the spread of meningococci into other body compartments. The use here of a complete infected model (i.e., transgenic mice) allowed to address the role of HmbR not only in blood but also in other organs (such as the spleen). Our data clearly indicated the involvement of spleen in meningococcal disease in direct link to the expression of HmbR. The spleen is crucial to limit bacterial infection by resident phagocytes including macrophages that have also a role in facilitating iron metabolism and preventing its availability to bacteria [21]. Our histological data suggest that during infection, an important amount of blood cells is present in the red pulp where they may encounter macrophages that are also involved in removing dying red blood cells. Phase variation generates high levels of genetic diversity that enhancing bacterial fitness. The expression of HmbR may allow meningococci to escape clearance by the macrophage at the sinusoidal venous system and provide iron to bacteria.

One strength of our work is to compare related meningococcal variants from a clonal outbreak in the absence of vaccination. The small number of isolates is a limitation that can be explained by the rarity of carriers of the epidemic strain in the general population. In conclusion while the virulence role of HmbR in Nm has been previously described, what is fully new in that study is to have identified changes in gene expression at a clonal level, both by WGS and

in an animal model. In particular we have show directly in the model the role of phase variation (ON/OFF) of HmbR in the balance between disease isolates/carriage isolates.

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Funding

This work was supported by Institut Pasteur and Rouen University. JS receives a fellowship from the Normandy Region (formerly 'Conseil Régional de Haute-Normandie'). The isolates have been collected during a study funded by the French Ministry of Health ('Programme Hospitalier de Recherche Clinique').

References

- [1] Hallet B. Playing Dr Jekyll and Mr Hyde: combined mechanisms of phase variation in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2001;4:570–81.
- [2] Soriani M. Unraveling *Neisseria meningitidis* pathogenesis: from functional genomics to experimental models. *F1000Res.* 2017;6:1228.
- [3] Pizza M, Rappuoli R. *Neisseria meningitidis*: pathogenesis and immunity. *Curr Opin Microbiol.* 2015;23:68–72.
- [4] Perkins-Balding D, Ratliff-Griffin M, Stojiljkovic I. Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68:154–71.
- [5] Bayliss CD, Field D, Moxon ER. The simple sequence contingency loci of *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*. *J Clin Invest.* 2001;107:657–62.
- [6] Halperin SA, Bettinger JA, Greenwood B, et al. The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine.* 2012;30:Suppl 2:B26–36.
- [7] Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:3140–5.
- [8] Jones CH, Mohamed N, Rojas E, et al. Comparison of phenotypic and genotypic approaches to capsule typing of *Neisseria meningitidis* by use of invasive and carriage isolate collections. *J Clin Microbiol.* 2016;54:25–34.
- [9] Joseph B, Schneiker-Bekel S, Schramm-Gluck A, et al. Comparative genome biology of a serogroup B carriage and disease strain supports a polygenic nature of meningococcal virulence. *J Bacteriol.* 2010;192:5363–77.
- [10] Schoen C, Kischkies L, Elias J, et al. Metabolism and virulence in *Neisseria meningitidis*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:114.
- [11] Caron F, du Chatelet IP, Leroy JP, et al. From tailor-made to ready-to-wear meningococcal B vaccines: longitudinal study of a clonal meningococcal B outbreak. *Lancet Infect Dis.* 2011;11:455–63.
- [12] Szatanik M, Hong E, Ruckly C, et al. Experimental meningococcal sepsis in congenic transgenic mice expressing human transferrin. *PLoS One.* 2011;6:e22210.
- [13] Watkins ER, Maiden MC. Metabolic shift in the emergence of hyperinvasive pandemic meningococcal lineages. *Sci Rep.* 2017;7:41126.
- [14] Stojiljkovic I, Hwa V, Desaintmartin L, et al. The neisseria-meningitidis hemoglobin receptor – Its role in iron utilization and virulence. *Mol Microbiol.* 1995;15:531–41.
- [15] Lewis LA, Dyer DW. Identification of an iron-regulated outer-membrane protein of neisseria-meningitidis involved in the utilization of hemoglobin complexed to haptoglobin. *J Bacteriol.* 1995;177:1299–306.
- [16] Tauseef I, Harrison OB, Wooldridge KG, et al. Influence of the combination and phase variation status of the haemoglobin receptors HmbR and HpuAB on meningococcal virulence. *Microbiology-Sgm.* 2011;157:1446–56.
- [17] Richardson AR, Stojiljkovic I. HmbR, a hemoglobin-binding outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*, undergoes phase variation. *J Bacteriol.* 1999;181:2067–74.
- [18] Lewis LA, Gipson M, Hartman K, et al. Phase variation of HpuAB and HmbR, two distinct haemoglobin receptors of *Neisseria meningitidis* DNM2. *Mol Microbiol.* 1999;32:977–89.
- [19] Tauseef I, Harrison OB, Wooldridge KG, et al. Influence of the combination and phase variation status of the haemoglobin receptors HmbR and HpuAB on meningococcal virulence. *Microbiology.* 2011;157:1446–56.
- [20] Bidmos FA, Chan H, Praekelt U, et al. Investigation into the antigenic properties and contributions to growth in blood of the meningococcal haemoglobin receptors, HpuAB and HmbR. *PLoS One.* 2015;10:e0133855.
- [21] Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:606–16.

1.2.2. Discussion de la virulence du méningocoque

Le présent travail a donc été réalisé grâce à la collection d'isolats normands constituée au cours de la période épidémique. Les isolats invasifs et de portage ont été plus finement sélectionnés afin d'être temporellement proches, sur la période 2008, année de l'étude de portage.

Les deux principaux résultats furent d'une part, l'indentification, grâce à l'approche génomique, de variations génétiques importantes entre les différents groupes de souches (invasif et portage) qui semblaient paradoxalement identiques selon le typage classique (immunotypage et génotypage par MLST) et d'autre part, le reflet de ces variations sur la virulence dans un modèle d'infection *in vivo*.

1.2.2.1. *Neisseria meningitidis*, une bactérie pathogène ?

Le méningocoque est une bactérie considérée comme commensale, qui dans de très rares cas s'avère être un pathogène dévastateur. Le terme commensal est bien souvent employé pour définir les souches de méningocoques observées en situations non invasives comme le portage asymptomatique. Néanmoins, bien que le méningocoque tire un bénéfice évident de son hôte de par son tropisme exclusif, les bénéfices pour l'hôte ne sont pas si évidents. Par opposition, le terme pathogène est employé pour définir les souches de méningocoques isolées en situations invasives.

L'étude et la comparaison des souches entre elles et à *fortiori* de la virulence est donc pour les raisons ici évoquées complexe. Néanmoins, certains éléments phénotypiques et génomiques se dégagent et permettent en partie de mieux comprendre cette dualité très étroite entre souches invasives et souches de portage.

1.2.2.2. Rôle de la capsule

La capsule polysaccharidique a été l'un des premiers facteurs à avoir été finement caractérisé de par son rôle essentiel dans la virulence mais également de par son immunogénicité et son utilisation en tant qu'antigène vaccinale. L'importance de la capsule au cours de la transmission et de l'infection est bien documentée. A la surface des muqueuses respiratoires, la capsule exerce des propriétés antiadhérentes en masquant directement les structures adhésives retrouvées au niveau de la membrane externe¹³⁷.

Une réduction de la capacité d'adhésion facilite la transmission et la diffusion du méningocoque au sein de la population. A l'inverse, la sous-expression de la capsule permet de démasquer les structures indispensables à la colonisation des muqueuses respiratoires comme les pili, les protéines d'adhésion et favorise l'invasion^{163,164}. Une étude récente réalisée par Bartley *et al* a montré sur un panel de souches hyperinvasives de séro groupe B que la capsule était un déterminant majeur de l'inhibition de l'adhésion, affectant à la fois l'attachement et l'invasion²⁰⁵. Ainsi, comme démontré par Hammerschmidt *et al*, la pénétration des muqueuses respiratoire requiert une sous-régulation ou un switch en phase OFF de l'expression capsulaire pour permettre le passage au travers de cette barrière avant une réexpression afin de résister aux défenses immunitaires de l'hôte²⁰⁶. Hammerschmidt *et al* ont également démontré que cette capacité à finement réguler l'expression capsulaire était étroitement associée à l'invasion¹¹³. Par opposition, Caugant *et al* ont démontré sur une collection de 100 souches isolées en portage asymptomatique que 50% de ces souches n'exprimaient pas de capsule et étaient de ce fait non sérogroupables²⁰⁷. Deux raisons principales expliquent cette absence de capsule, une variation de l'expression temporaire ou permanente comme observé par Hammerschmidt *et al* ou la délétion du locus codant pour les gènes capsulaires, dans ce cas remplacé par un locus appelé *Capsule Null Locus (cnl)* caractérisé sur le plan moléculaire par Claus *et al*²⁰⁸. Enfin, une étude réalisée en 2004 par Yazdankhah *et al* sur une collection de 700 souches invasives et de portage isolées en Europe a confirmé ces résultats¹⁹⁶. Ils ont observé que 40% des souches de portage et seulement une seule souche invasive étaient non capsulé. Ils ont également démontré une association significative entre certains sérogroupes et l'infection avec par exemple pour le séro groupe C un ratio infection/portage 14 fois supérieurs à celui retrouvé pour le séro groupe B. Dans la circulation sanguine, la capsule permet essentiellement de lutter contre la lyse bactérienne suite à l'insertion du complexe d'attaque membranaire constitué des composants tardifs du complément (C5-C9). A noter que des cas d'infection causés par des souches non capsulées ont été décrits chez des patients atteints de déficits dans les composants tardifs du complément²⁰⁹⁻²¹¹.

Sur la plan bactériologique, les souches invasives sont presque toujours capsulées et appartiennent à un nombre limité de complexes clonaux dits hyperinvasifs (en Europe ce sont les cc8, cc11, cc32, cc41/44 et cc269)¹⁹⁶.

Notre étude confirme cette vision et l'importance de la capsule. En effet, les souches de portage du complexe clonal hyperinvasif cc32 dépourvues de capsule (NG:14:P1.7,16) étaient non-virulentes et incapables d'établir une infection invasive dans notre modèle de souris transgéniques. La perte de la capsule seule rend ces souches non-virulentes et cela malgré la conservation, au moins sur le plan génomique, des autres facteurs de virulence. Cependant, l'étude des souches de portage capsulées (B:14:P1.7,16) du cc32 nous a permis de confirmer que la virulence du méningocoque est bien multifactorielle et ne repose pas sur un facteur de virulence en particulier (à l'exception de la capsule) mais plutôt sur un ensemble, une combinaison qui lui permet d'être au mieux adapté à chaque phase de l'infection. Ces résultats ont été obtenus par l'observation *in vivo* d'une hiérarchie marquée de la virulence entre les souches capsulées invasives et de portage.

1.2.2.3. Rôle d'autres facteurs

D'autres facteurs apparaissent également distincts entre souches invasives et souches de portage et concernent principalement des structures de la membrane bactérienne impliquées dans la virulence. Parmi ces facteurs on peut citer les LOS qui de par leur activité toxique exacerbe la réponse inflammatoire de l'hôte en entraînant une importante production de cytokines pro-inflammatoires, conduisant à des lésions tissulaires à la surfaces des muqueuses. Cette tempête cytokinique dans le sang peut conduire au choc septique.

La structure du LOS définit les immunotypes allant du type L1 au L12. Hubert *et al* ont caractérisé plus précisément les différences structurales de ces différents immunotypes et leur impact sur la virulence²¹². Tous d'abord, ils ont démontré que l'expression de ces différents immunotypes était régulée par la variation de phase des gènes *lgt* impliqués dans la synthèse capsulaire. L'immunotype L3,7,9, est souvent détecté à la surface des souches invasives. Cet immunotype permet une sialylation du LOS favorisant ainsi la résistance de l'organisme vis-à-vis de l'activité bactéricide du sérum. La chaîne de l'immunotype L8 est-elle tronquée et ne peut pas fonctionner comme un accepteur pour le sialyltransférase ce qui entraîne pour cet immunotype une sensibilité accrue vis-à-vis de l'activité bactéricide du sérum²¹³. Ces études confirment l'importance de la variation de phase dans l'adaptation bactérienne mais démontrent également que certains variants sont mieux adaptés à l'infection. Cependant, dans notre étude, aucune différence n'a été observée entre le LOS des souches étudiées (souches invasives et de portage).

1.2.2.4. Rôle des systèmes d'acquisition du fer

Il est largement admis que l'accès aux métaux influe sur l'équilibre entre le pathogène et l'hôte. Plus précisément, les bactéries doivent acquérir des nutriments pour survivre au sein de l'hôte, que ce soit en situation de portage ou invasive. Ces nutriments comprennent, en plus d'une source de carbone, les métaux de transition (tels que Fe, Mn, Zn, Ni, Cu, Co et Mo) qui sont nécessaires pour la stabilisation structurale de certaines protéines ou encore comme cofacteurs enzymatiques indispensables dans la majorité des processus métaboliques. Par conséquent les métaux de transition sont essentiels pour la survie des bactéries. Parmi les métaux de transition, *N. meningitidis* semble utiliser préférentiellement le fer^{214,215}. Le méningocoque est capable d'acquérir le fer via des molécules de transport présentes chez l'hôte comme la lactoferrine retrouvée à la surface des muqueuses et la transferrine retrouvée dans le sang (cf introduction). L'utilisation de l'hémoglobine comme source de fer était controversée car dans le sang elle est séquestrée par les globules rouges²¹⁶. Deux systèmes bactériens ont été caractérisés chez le méningocoque pour l'acquisition du fer à partir de l'hémoglobine, le système HpuA/B souvent présent chez les souches de portage et le système HmbR qui est étroitement associé avec les souches invasives (seul ou avec le système HpuA/B)¹⁸⁴. Nos résultats sont en accord avec cette distribution. Les souches du cc32 (portage ou invasive) possèdent le système HmbR et les souches de portage non-capsulées, bien que virtuellement non-virulentes en raison de la perte capsulaire, ont conservé le gène *hmbR* en phase ON, comme les souches invasives. Par opposition, les souches de portage capsulées portent le gène *hmbR* en phase OFF. Cela suggère que la fixation de l'hémoglobine par la bactérie via ce récepteur de l'hémoglobine (HmbR) est importante pour la virulence du méningocoque. Cette hypothèse est corroborée par nos résultats obtenus avec les souris transgéniques exprimant la transferrine humaine. Les souches de portage sauvages HmbR-OFF présentaient un niveau de bactériémie plus faible que les souches invasives sauvages HmbR-ON.

Le rôle de HmbR a été définitivement confirmé grâce aux expériences réalisées avec une souche de portage HmbR-ON (souche variante) dérivée d'une souche de portage HmbR-OFF (souche sauvage). La comparaison entre ces 2 isolats isogoniques (ON et OFF) nous a montré que la souche de portage HmbR-ON retrouvait un niveau de virulence proche de celui des souches invasives ainsi que la capacité à induire une importante réponse inflammatoire (niveaux de KC et IL-6 significativement plus élevés).

L'hémoglobine n'est pas accessible dans le sang où c'est la transferrine qui est la source majeure de fer. La question du rôle de la fixation de l'hémoglobine par le méningocoque reste posée. Nos résultats peuvent fournir une explication à cette question. En effet, nos données suggèrent clairement une implication de la rate dans les infections invasives à méningocoque en lien direct avec l'expression de HmbR. La rate est cruciale pour limiter l'infection bactérienne par les phagocytes résidents qui ont aussi un rôle dans le métabolisme du fer et en empêchant toute disponibilité pour les bactéries²¹⁷. Cette hypothèse est confortée par nos données histologiques qui suggèrent que pendant l'infection la capacité à exprimer HmbR dans la rate rend ces bactéries plus adaptées à un environnement hostile, leur permet de supplanter les mécanismes de phagocytose et de se procurer le fer essentiel sur le plan métabolique. Cependant, d'autres rôles en lien avec la fixation de l'hémoglobine par HmbR sont également possibles et restent à être explorés.

Notre analyse génomique globale (sur la base SNP ou sur le core-génome) a bien séparé les souches en trois groupes : les souches de portage capsulées, les souches invasives et les souches de portage non-capsulées. Cependant, une analyse plus fine et la comparaison sur la base des gènes de virulence a permis de séparer plus clairement les souches de portage capsulées des deux autres groupes de souches. Cela suggère que la perte de la capsule seule est suffisante pour perdre la virulence alors que plusieurs autres facteurs de virulence doivent être vraisemblablement impactés chez les souches de portage capsulées. L'étude génomique pourrait se poursuivre pour analyser l'absence/présence de gènes de virulence mais également des différences qualitatives (différents allèles ou variation de phase).

Le rôle du HmbR a déjà été décrit. Cependant, ce qui est essentiel dans notre travail c'est d'avoir identifié l'importance de la variation de phase dans l'expression génique d'*hmbR* à un niveau clonal. Ce qui est nouveau, c'est que nous avons pu montrer directement dans un modèle expérimental défini le rôle de la variation de phase (ON/OFF) de HmbR dans la balance entre portage et invasion.

1.2.3. Perspective

L'analyse génomique et la comparaison gène par gène nous a permis d'identifier plus de 600 gènes au profil génétique variable entre nos différents groupes de souches. Parmi ces gènes, plusieurs facteurs et mécanismes impliqués dans la virulence présentent des variations au niveau génomique, que ce soit par la présence de SNPs ou par la présence de larges régions hétérologues.

L'étude du locus capsulaire (*cps*) nous a permis d'identifier chez les souches non capsulées (NG:14:P1.7,16) que le gène *siaC* nouvellement nommé *cssC* impliqué dans la synthèse des constituants capsulaires présentait une délétion de 11pb¹⁴⁰. Cette délétion entraîne virtuellement un décalage du cadre de lecture et potentiellement la non expression de ce gène. Ainsi, nous supposons que cette délétion puisse être à l'origine de l'absence de capsule observée pour ces souches. Il serait intéressant de caractériser plus précisément l'impact de cette délétion sur l'expression capsulaire. En effet, hormis l'absence de capsule, les souches de portage non capsulées présentent un profil génomique très proche des souches de référence (invasives) utilisées pour la comparaison. La conservation sur le plan génétique de l'ensemble des facteurs de virulence, du moins ceux aujourd'hui caractérisés et ici étudiés, est surprenante car la perte stricte de la virulence (ici via la perte de la capsule) est fréquemment associée à la perte d'autres facteurs de virulence non indispensables au commensalisme. Des essais préliminaires visant à caractériser le pouvoir pro-apoptotique de nos souches réalisés *in vitro* sur une lignée de cellules épithéliales ont montré que les souches invasives mais également de portage non capsulées étaient capables d'induire un niveau d'apoptose significativement plus élevé que les souches de portage capsulées. Ces résultats confirment l'analyse génomique et la conservation pour les souches de portage non capsulées d'un phénotype de virulence. Ces résultats apportent également une nouvelle donnée quant aux différences observées *in vivo* chez l'animal. Bien que les mécanismes en jeu ne soient pas pour l'instant plus finement caractérisés sur le plan génomique et phénotypique, une étude plus poussée de ce pouvoir pro-apoptotique est à envisager.

La présence de variabilités observées pour plusieurs facteurs de virulence majeurs pourrait expliquer ces différences de phénotypes.

Nous avons identifié plusieurs variations importantes au niveau des gènes *frpC* et *frpD* entre la souche de portage capsulée re-séquencé par la méthode PacBio® et les souches de référence. Ces gènes font partie de la famille des toxines RTX (de l'anglais Repeats in ToXin)^{218,219}. Leur rôle chez le méningocoque est peu documenté mais chez d'autres espèces bactériennes à Gram négative ils sont impliqués dans l'activité cytotoxique et jouent un rôle essentiel dans la virulence²²⁰. Leur caractérisation n'a pas été réalisée sur l'ensemble des souches de l'étude car la présence de motifs répétés au niveau génomique entraîne des difficultés d'assemblage avec les séquences Illumina® trop courtes pour permettre l'obtention d'une séquence continue (les séquences Illumina® se chevauchent arbitrairement lors de l'assemblage). Ainsi, il serait intéressant de séquencer les autres souches de l'étude par la méthode PacBio® afin de vérifier si ces variations sont spécifiques à nos souches de portage capsulées ou retrouvées chez l'ensemble des souches « B14 ».

La plus importante variabilité identifiée entre nos souches concerne les gènes de la famille Maf (Multiple Adhesin Family). Les protéines Maf ont été nommées selon MafA qui chez le gonocoque a été caractérisé pour ses propriétés d'adhésion²²¹. Plus récemment, des études ont identifié que ces gènes et en particulier MafB étaient impliqués dans la compétition bactérienne grâce à leurs propriétés cytotoxiques^{222,223}. Les gènes Maf sont localisés au niveau de 3 îlots génomiques²²². La comparaison a révélé la présence de larges variations chromosomiques pour les îlots 1 et 3, là où l'îlot 2 était strictement conservé chez l'ensemble de nos souches. Pour les souches de portage non capsulées, aucune variation n'a été identifiée et les 3 îlots de ces souches présentaient une homologie de 100% avec ceux de la souche de référence H44/76. L'îlot 1 des souches invasives était également identique à celui de la souche H44/76. A l'inverse, l'îlot 1 des souches de portage capsulées présentait de larges variations et une forte homologie avec l'îlot 1 d'une autre souche de portage, la souche Alpha14. Enfin, les îlots 3 des souches invasives et de portage capsulées, bien que relativement homologues à celui de la souche H44/76 (70-80%), étaient différents entre ces 2 groupes de souches. Les différences portaient principalement sur la région N-terminal du gène MafB et sur les gènes accessoires en aval de celui-ci. MafB est supposé être médiateur de l'activité cytotoxique, une activité supposé médiée par le domaine N-terminal du gène qui présente une forte homologie avec le domaine terminal de plusieurs toxines polymorphiques, comme les toxines Rsh (de l'anglais Rearrangement Hot Spot Toxin) plus précisément caractérisées chez d'autres espèces à Gram négative (*Escherichia. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*)²²⁴⁻²²⁷.

Le rôle des protéines Maf et l'importance de chaque îlot est peu documenté. Néanmoins, la présence de variations entre nos différents groupes de souches reste une piste intéressante qui devra être explorée.

Le séquençage tout génome et la comparaison génomique sont des approches qui permettent de produire une quantité très importante de données. La caractérisation génétique apporte un certain nombre de réponses mais ne permet pas de répondre à toutes les questions. Ainsi, les approches phénotypiques restent cruciales afin de comprendre dans sa globalité le fonctionnement d'un gène, d'un groupe de gènes et des différents mécanismes sous-jacents à la base de certains phénotypes, dont la virulence. Notre étude comparative nous a permis d'identifier la présence de nombreuses variations entre nos différents groupes de souches pourtant en l'apparence clonales. Parmi ces variations, une majorité ont été retrouvées pour des gènes sans fonction établie ou de fonction putative avec des pistes très prometteuses quant aux facteurs de virulence ici évoqués. Ainsi, la caractérisation plus fine de ces variations sur le plan phénotypique reste à être explorée. Néanmoins, cette approche nous a permis d'identifier et d'étudier un des mécanismes clé de la virulence, l'acquisition du fer. Nous avons démontré le rôle clé du fer au cours de l'invasion et supposé son rôle d'un point de vue métabolique. Pour continuer sur cette analyse, une caractérisation plus large de l'impact du fer dans le phénotype invasif serait intéressante.

Ainsi le recours aux collections bactériennes constituées lors de « l'épidémie normande » a permis d'identifier un mécanisme de virulence déterminant dans l'adaptation du clone B:14:P1.7,16/ST-32. L'autre biothèque établie lors de l'épidémie consiste en une collection de sérums recueillis de sujets vaccinés par MenBvac[®], le vaccin OMV alors utilisé (les vaccins polyvalents B tels le Bexsero[®] n'étant pas encore disponibles). Les derniers sérums collectés très à distance du schéma vaccinal initial ont permis une évaluation de la durabilité et de l'ampleur de la protection OMV, objet de l'étude originale présentée dans le second volet de cette thèse après un état des connaissances en ce domaine.

2. Durabilité et importance de la couverture vaccinale OMV

2.1. Etat des connaissances

Ce chapitre présente une revue des différentes approches vaccinales anti-méningococciques après un panorama de l'épidémiologie mondiale des IIM, laquelle est nettement variable selon les continents puis les pays, justifiant des stratégies préventives adaptées.

2.1.1. Epidémiologie

2.1.1.1. Données générales

N. meningitidis est l'agent pathogène causal principal de la méningite bactérienne à travers le monde. Malgré la disponibilité de traitement antibiotique et le développement de vaccin efficace, il est recensé annuellement plus de 1 million de cas d'IIM²²⁸. Le taux de mortalité en l'absence de traitement est compris entre 50 et 80% et reste supérieure à 10% pour les individus traités²²⁹. De plus, les morbidités associées sont nombreuses et dans 15 à 20% des cas, les IIM engendrent d'importantes séquelles (paralysies, retards mentaux, surdités, amputations)⁸⁹. L'ensemble de ces données contribue au classement de la méningite bactérienne parmi les 10 causes principales de décès liées aux infections dans le monde.

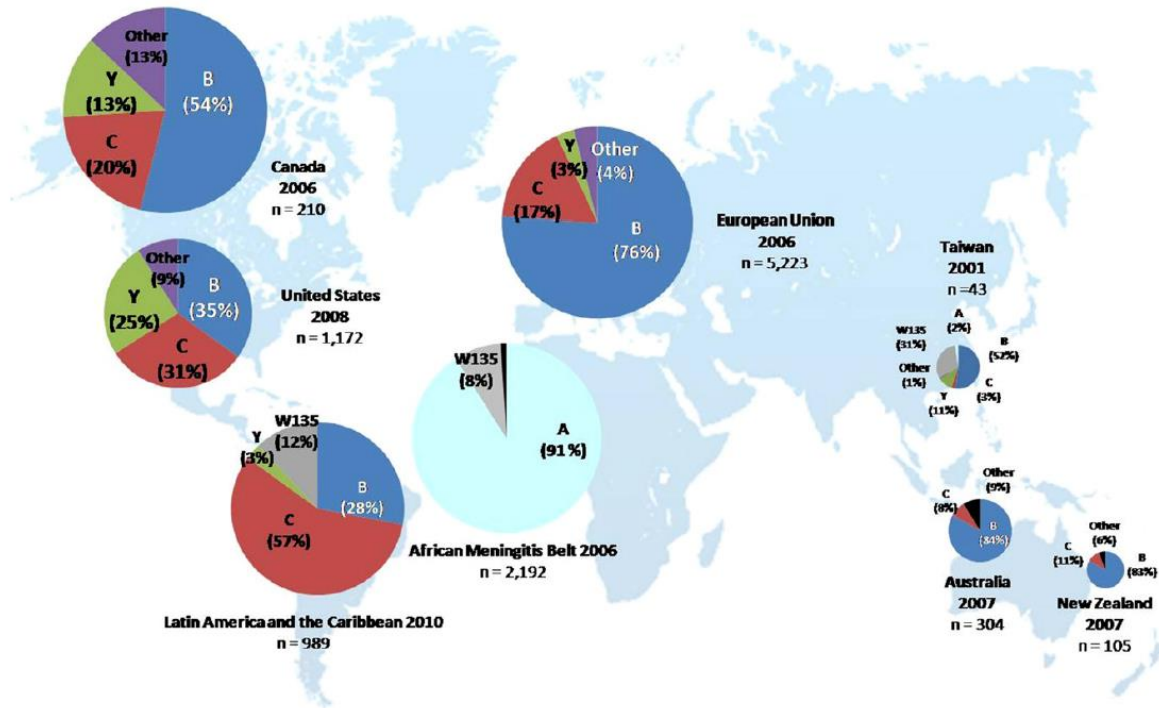


Figure 2 : Répartition des infections invasives à méningocoque par sérotype et par région dans le monde, 2001-2010.

D'après Harrison *et al*²³⁰

Les IIM sont recensées sur l'ensemble des continents. Néanmoins, l'épidémiologie mondiale varie selon les régions et à travers le temps. Considérées comme endémiques, les IIM se manifestent toute l'année, principalement sous forme de cas sporadiques mais également au cours d'épidémies localisées ponctuelles ou saisonnières. Chaque groupe d'âge est concerné mais l'incidence est plus élevée chez l'enfant de moins d'un an et chez l'adolescent.

Une surveillance efficace est donc cruciale pour comprendre l'évolution épidémiologique des IIM et ainsi pouvoir évaluer l'impact des mesures vaccinales préventives mises en œuvre²³⁰. Sur le plan épidémiologique, 6 sérogroupes (A, B, C, W, X et Y) sont virtuellement responsables de l'ensemble des IIM mais leur répartition est variable selon les continents²³⁰⁻²³².

L'épidémiologie des IIM est un processus dynamique étroitement lié à l'émergence de nouveaux variants au sein de la population. Les clones virulents se diversifient rapidement par transformation et recombinaison génétique¹⁸⁸. Le suivi épidémiologique de ces clones par typage moléculaire (MLST, WGS), est mieux adapté, plus discriminant et permet une meilleure compréhension de la dynamique globale^{34,233}. La distribution des sérogroupes et l'incidence des IIM a évolué au cours du dernier siècle. Les raisons de ces fluctuations ne sont pas totalement connues mais peuvent être en partie expliquées par le caractère cyclique des IIM, l'émergence de clones hypervirulents, les changements appliqués en termes de stratégie vaccinale, l'immunité naturelle de la population et une diminution des comportements à risques.

La surveillance et la déclaration des IIM dans le monde est hétérogène et la sous déclaration reste importante. Dans plusieurs pays, un taux extrêmement bas d'IIM et une haute proportion de méningites bactériennes déclarées sans étiologie précise sont rapportées chaque année et suggèrent une sous-estimation importante du nombre de cas liés au méningocoque. Malgré un nombre limité de données disponibles pour certaines parties du monde et la nature dynamique des IIM, l'épidémiologie globale a pu être résumée par région comme schématisé dans la figure 2 et détaillé par continents puis pays *infra*.

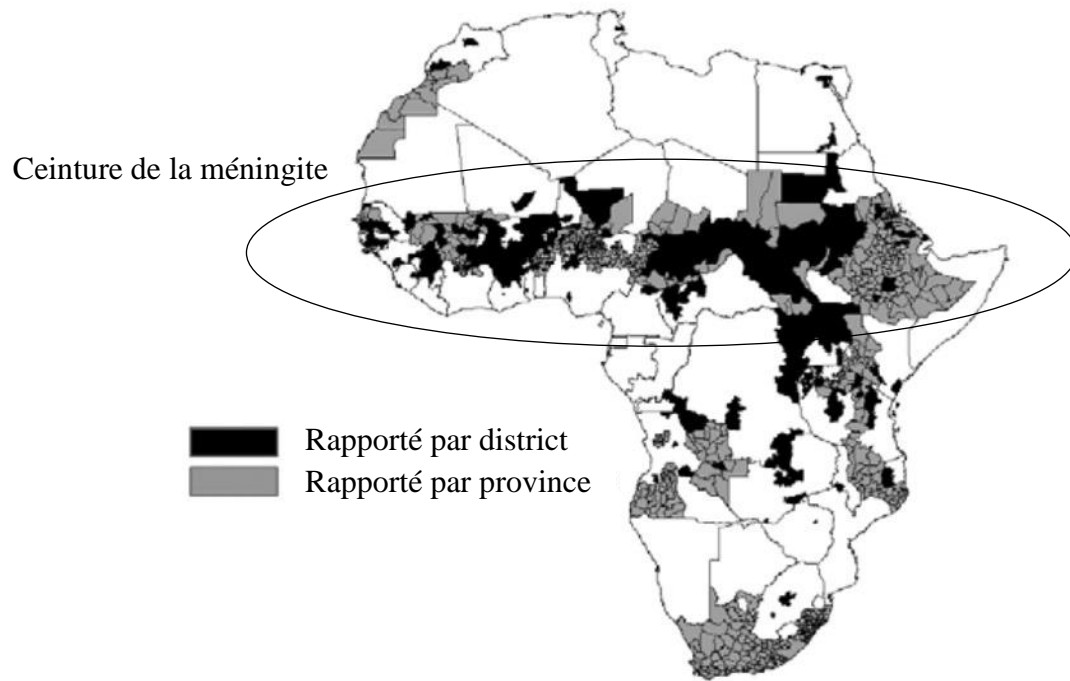


Figure 3 : Répartition des épidémies de méningite à méningocoque notifiées en Afrique, 1841-1999.

D'après Molesworth *et al*²³⁴

2.1.1.2. Situations selon les continents

En Afrique

Depuis plus de 100 ans, des épidémies de méningite à méningocoque sont décrites en Afrique sub-saharienne, zone communément appelée ceinture de la méningite africaine²³⁵. Définie par Lapeyssonnie en 1963 cette « ceinture de la méningite » s'étend sur 18 pays allant du Sénégal à l'Ethiopie (Figure 3), regroupant plus de 270 millions de personnes et marquée par la plus haute incidence mondiale d'IIM^{3,230,231}. Jusqu'à une vaccination dédiée toute récente (cf *infra*), l'endémie importante et la récurrence d'épidémies périodiques entraînaient chaque année plusieurs centaines de milliers de cas et des dizaines de milliers de décès par IIM, principalement de groupe A (IIM A)²³⁶.

A l'image de ce qui est observé avec les autres sérogroupes, les épidémies africaines d'IIM A sont associées à la diffusion de souches appartenant à un nombre limité de complexes clonaux, essentiellement de ST-1, ST-4 et ST-5²³⁷⁻²³⁹. Le séro groupe W a également causé plusieurs épidémies africaines, notamment due au complexe clonal ST-11^{240,241}. L'introduction du vaccin trivalent ACW non-conjugué dans plusieurs pays au sein de la ceinture de la méningite a entraîné un déclin significatif de l'incidence des épidémies de séro groupe W en Afrique avant une quasi éradication des IIM A depuis l'avènement du vaccin conjugué A (MenAfriVac) agissant aussi sur le portage d'où une immunité de groupe (cf *infra*, pages 95)²⁴²⁻²⁴⁶.

Entre 1970 et 1980, le séro groupe C a aussi entraîné plusieurs épidémies en Guinée, au Nigéria et au Burkina Faso^{247,248}. En 2013, une nouvelle souche de séro groupe C de complexe clonal ST-10217 a émergé au Nigeria et provoqué deux épidémies importantes dans le pays²⁴⁹. Ainsi, dans la région de Sokoto, capitale du Nigeria, l'incidence cumulée en 2013 a atteint 673 cas pour 100 000 habitants. La diffusion de ce clone au sein des pays voisins a provoqué de 2015 à aujourd'hui, la plus grande épidémie d'IIM de séro groupe C jamais observée en Afrique. Ainsi au Niger, entre janvier et juin 2015, l'incidence cumulée dans le pays était de 50 cas pour 100 000 habitants et de 544 cas pour 100 000 habitants dans la région de Niamey sa capitale^{249,250}.

Enfin le séro groupe X, pour lequel aucun vaccin polysaccharidique n'est à ce jour disponible, est émergent.

Sporadiquement présent en Afrique depuis les années 1990, ce groupe (à travers le complexe clonal ST-181) a été responsable d'épidémies depuis 2006 dans différents pays : Uganda, Kenya, Togo et Burkina Faso²⁵¹⁻²⁵⁵. Bien que le sérotype X n'aie pour l'instant pas causé d'épidémies à grande échelle à l'image des sérotypes A, C et W, sa rapide expansion au sein de la ceinture de la méningite et son potentiel pathogénique important en font une problématique inquiétante. Une analyse sérologique récente est toutefois en faveur d'une efficacité du Bexsero® sur les souches Africaines du sérotype X (alors que cet effet semble manquer sur des souches isolées en Europe, dans la limite d'une analyse d'un nombre limité d'isolats)²⁵⁶.

En Asie

L'impact des IIM y est peu documenté. En *Chine* plus de 95% des IIM survenues au 20^{ème} siècle, étaient de sérotype A, les sérotypes B et C étant responsable de rares cas sporadiques²⁵⁷. Ainsi 4 épidémies majeures liées au sérotype A sont survenues de 1959 à 1984, avec des incidences annuelles atteignant plus de 500 cas pour 100 000 habitants dans certaines régions. Au cours des années 2000, plusieurs changements dans la distribution des sérotypes ont été observés : augmentation des IIM C (émergence d'un nouveau clone hyperinvasif appartenant au complexe clonal ST-4821) ayant conduit à une vaccination A + C conjuguée, puis augmentation des IIM B et W^{258,259}.

Le sérotype A reste néanmoins très présent en Asie et en 2005 des épidémies ont été décrites à New Delhi en Inde et à Baguio aux Philippines^{260,261}. Illustrant la disparité retrouvée entre les pays, au Japon, l'incidence des IIM est faible avec 0,028 cas pour 100 000 habitants notifiés en 2014²⁶². Les cas endémiques sont également rares en Malaisie, en Thaïlande et à Taiwan²⁶³⁻²⁶⁵. Ces dernières années en Asie, la répartition des sérotypes a évolué, l'endémie associée au sérotype A étant progressivement remplacée par des épidémies localisées de sérotypes B et C.

En Amérique latine

L'incidence des IIM y est globalement faible, variant de moins de 0,1 cas pour 100 000 habitants au Mexique, Paraguay, Pérou et en Bolivie à plus de 2 cas pour 100 000 habitants au Brésil, Chili et en Uruguay^{266,267}. La plupart de cas sont liés aux sérotypes B et C, même si W et Y sont émergents. Toutefois différentes épidémies nationales sont survenues ces dernières décennies, entraînant des stratégies vaccinales spécifiques.

L'île de Cuba a été touchée à la fin des années 1970 par une épidémie d'IIM B liée à la diffusion du clone hyper virulent B:4:P1.15 (incidence annuelle autour de 14 cas pour 100 000 en population générale atteignant 50 cas pour 100 000 chez les moins de 6 ans)²⁶⁸. Cette situation a conduit à la mise au point du premier vaccin OMV (cf *infra*) mis en œuvre en 1989. En coïncidence l'incidence des IIM s'est abaissée de 6,5 cas pour 100 000 en 1989 à 0,8 cas pour 100 000 en 1993²⁶⁹. Depuis l'incidence des IIM est restée globalement faible à Cuba (< 1 cas pour 100 000 habitants) avec une dominance de formes B, dues à une diversité de souche sans résurgence du clone B:4:P1.15²⁷⁰.

Au Brésil, deux épidémies concomitantes sont survenues dans les années 1970²⁷¹. La première, de sérotype C, a entraîné une augmentation de l'incidence dans le pays à 30 cas pour 100 000 habitants en 1973²⁶⁶. La seconde, de sérotype A, a entraîné une augmentation de l'incidence à plus de 180 cas pour 100 000 habitants à Sao Paulo en 1974²⁷². Dans les années 1980, l'incidence nationale a progressivement diminué pour atteindre 1 cas pour 100 000 habitants. Cependant, la fin des années 1980 a été marquée par une épidémie d'IIM B, essentiellement due à la diffusion du clone B:4:P1.15, conduisant en réponse à une campagne avec le vaccin OMV « cubain »²⁷³. Depuis les IIM sont redevenues endémiques à un niveau faible (<2 cas pour 100 000 habitants) avec une dominance du sérotype C et plus récemment l'émergence du W (de complexe clonal ST-11)^{274,275}.

En Uruguay, le nombre de cas d'IIM notifiés a augmenté à partir de 2001 (plus de 30 cas pour 100 000 habitants observés dans certaines régions), là encore du fait de la diffusion du clone B:4,7:P1.15,19 ayant entraîné en réponse une vaccination de masse des 4-19 ans par l'OMV « cubain »²⁷⁶. Depuis l'incidence est globalement stable et faible (1 cas pour 100 000 habitants) le sérotype B restant majoritaire, mais sans clone dominant²⁶⁷.

Au Chili, l'incidence depuis les années 1990 est faible, autour de 0,5 cas pour 100 000 habitants. Cependant, une émergence d'IIM W depuis 2010 a conduit à introduire en 2012 au calendrier vaccinal le vaccin tétravalent ACWY conjugué chez l'enfant entre 9 mois et 5 ans²⁶⁷.

En Amérique du Nord

Aux Etats Unis d'Amérique, depuis le dernier pic observé en 2000 avec 1,2 cas pour 100 000 habitants, le taux de notification des IIM décline régulièrement et a atteint le taux historiquement bas de 0,12 cas pour 100 000 habitants en 2015 puis en 2016²⁷⁷. De 1996 et 2016, l'incidence des IIM a significativement diminuée pour tous les groupes d'âges, le déclin le plus important concernant l'enfant de moins d'un an (incidence de 11,04 cas pour 100 000 habitants en 1996 à 0,93 cas pour 100 000 habitants en 2016)²⁷⁸. La diminution a concerné les trois sérogroupes majoritaire du pays (B, C et Y) et est survenue avant l'introduction des vaccins polysaccharidiques conjugués.

Au Canada les IIM sont faiblement endémiques et peu d'épidémies sont rapportées. Depuis 1941, dernier pic observé avec une incidence de 12,8 cas pour 100 000 habitants, le taux d'IIM a progressivement diminué et atteint ces dernières années moins de 2 cas pour 100 000 habitants^{279,280}. La majorité des IIM sont dues aux sérogroupes B et C. Le séro groupe B est associé aux cas sporadiques alors que le séro groupe C est associé aux cas épidémiques^{281,282}. L'émergence du clone ST-11 de séro groupe C au début des années 1990 a occasionné deux épidémies successives en 1991 et 2001 et entraîné une importante proportion de cas chez l'enfant entre 1 et 4 ans^{283,284}.

En 2001, le Canada était l'un des premiers pays à inclure le vaccin conjugué dirigé contre le séro groupe C en routine chez l'enfant et l'adolescent²⁸⁵. Depuis, l'incidence des IIM de séro groupe C a significativement décliné, passant de 0,41 cas pour 100 000 habitants en 2002 à 0,07 cas pour 100 000 habitants en 2006. Peu prévalent dans les années 90 (0,1 cas pour 100 000 habitants), le taux d'IIM de séro groupe Y a augmenté fin des années 90 et atteint 22% des cas (n=41/191) en 2003²⁸⁰. L'augmentation du nombre de cas d'IIM de séro groupe Y a motivé l'ajout du vaccin tétravalent ACWY conjugué dans le calendrier vaccinal national en 2011²⁸⁶. Depuis l'incidence du séro groupe Y a diminué et atteint moins de 0,1 cas pour 100 000 habitants. Le séro groupe B est actuellement majoritaire, représentant plus de 60% des cas d'IIM avec depuis 2003 l'émergence du complexe clonal ST-269 responsable de cas endémiques mais aussi épidémiques^{287,288}.

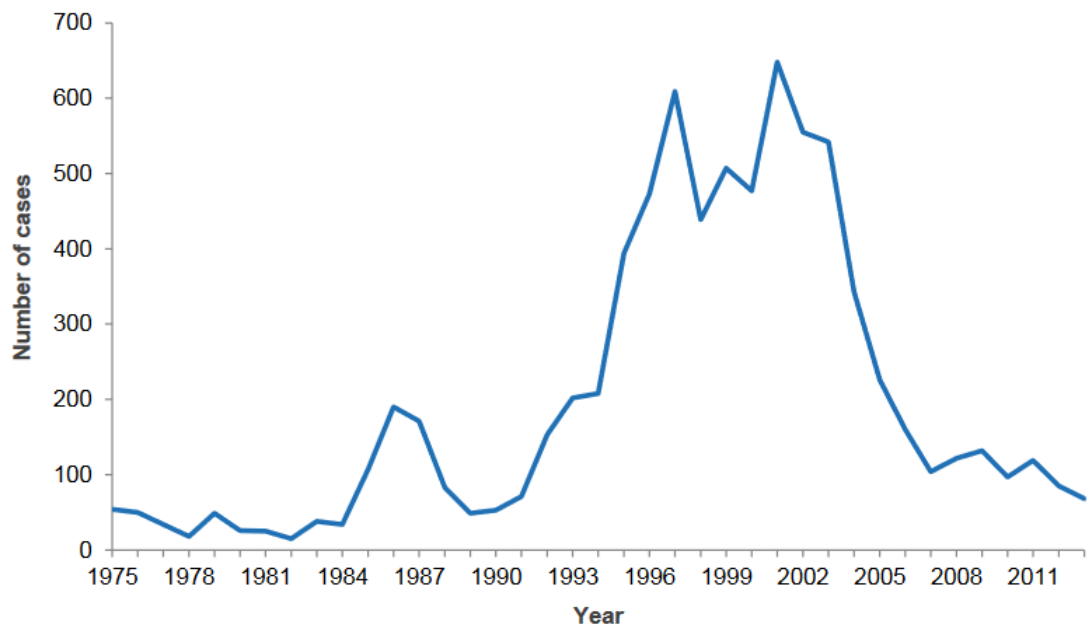


Figure 4 : Evolution du nombre total de cas confirmés d'infections invasives à méningocoque, Nouvelle-Zélande, 1975-2013.

D'après Lopez et Sherwood²⁸⁹

En Océanie

En Australie, depuis les années 1990, une augmentation du nombre de cas d'IIM liés au sérotype C du complexe clonal ST-11 a été observée, en particulier chez l'adolescent et l'adulte jeune, concourant à une incidence globale des IIM a plus de 3 cas pour 100 000 habitants au début des années 2000 et conduisant un programme d'immunisation national en 2003²⁹⁰⁻²⁹². Depuis, le nombre de cas d'IIM de sérotype C a significativement décliné de 1,15 cas pour 100 000 habitants en 2002 (année pré-vaccination) à 0,07 cas pour 100 000 habitants en 2009²⁹³. Depuis 2003, une baisse de l'incidence globale des IIM est observée, avec toutefois des émergences W et Y depuis 2009²⁹⁴.

En Nouvelle-Zélande, une épidémie clonale d'IIM B (souche B:4:P1,7-2,4/ST-41/44) est survenue dans les années 1980, se traduisant par une augmentation de l'incidence annuelle des IIM de 1,6 cas pour 100 000 habitants en 1990 (53 cas) à 17,8 cas pour 100 000 habitants en 2001 (648 cas), le clone épidémique pesant à lui-seul en 2001 pour 85% des cas caractérisés et plus de la moitié des cas concernant l'enfant de moins de 5 ans (Figure 4)^{289,295}. Cette situation a conduit au développement du vaccin OMV MeNZB[®] (détaillé plus bas) administré à plus de 1 million de personnes de 2004 à 2008²⁹⁶. Depuis, l'incidence des IIM a substantiellement déclinée, s'établissant à 1,5 pour 100 000 habitants en 2015 (64 cas)²⁹⁷.

En Europe

Des données épidémiologiques détaillées sont connues, fruit de programmes nationaux de surveillance centralisés depuis 2007 à l'échelon de l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control)²⁹⁸. Globalement l'incidence des IIM dans les différents pays de l'Union est actuellement faible, la plupart des cas étant sporadiques et les épidémies rares^{230,231,299,300}. Selon les données disponibles de l'ECDC (année 2015), 3 121 cas d'IIM confirmés ont été notifiés par 30 pays, pour une incidence moyenne de 0,6 cas pour 100 000 habitants et une incidence stable en comparaison des années précédentes³⁰¹. Les taux de notification les plus élevés sont observés en Lituanie (1,9 cas pour 100 000 habitants), en Irlande (1,5 cas pour 100 000 habitants), et au Royaume Uni (1,4 pour 100 000 habitants).

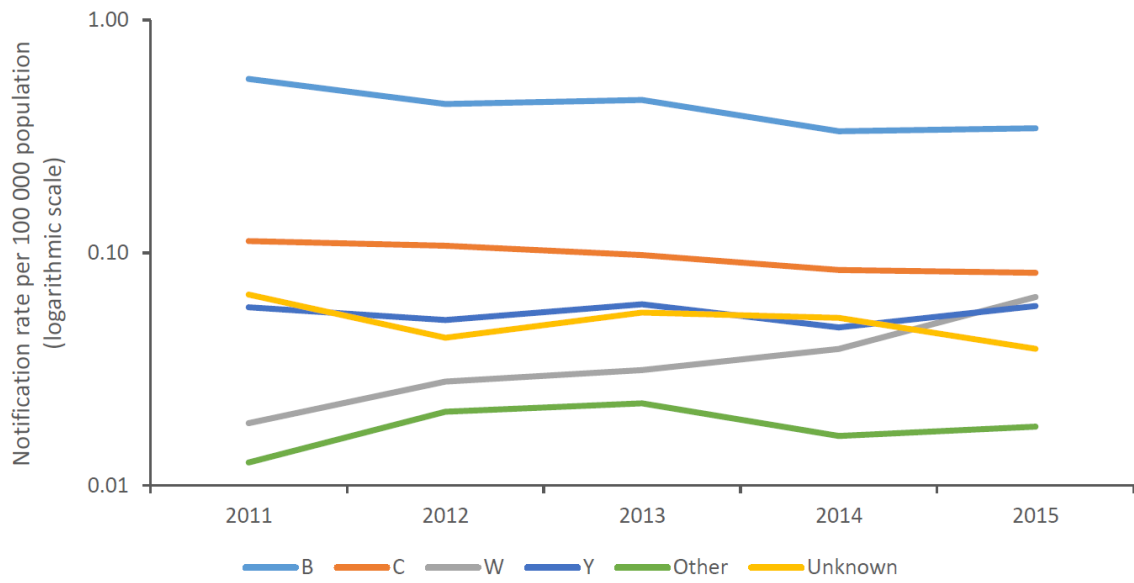


Figure 5 : Evolution du taux de notification des cas confirmés d'infections invasives à méningocoque par séro-groupe, UE/EEE, 2011-2015.

D'après le centre européen de prévention et contrôle des maladies³⁰¹

Au sein des 26 pays pour lesquels les données épidémiologiques étaient disponibles et complètes pour la période 2011-2015, l'incidence moyenne des IIM B a diminué (de 0,56 à 0,34 cas pour 100 000) de même dans une moindre mesure que celle des IIM C (de 0,11 à 0,08 cas pour 100 000) tandis qu'émergeait le W (de 0,02 à 0,06 cas pour 100 000), le Y étant stable (à 0,04 cas pour 100 000) (Figure 5).

A la fin des années 1990, une augmentation importante du nombre de cas d'IIM de sérotype C liée à l'émergence d'un clone hypervirulent de complexe clonal ST-11 a été observée dans plusieurs pays européens, incluant le Royaume Uni, l'Irlande, l'Espagne, la Belgique et les Pays Bas^{36,299,300,302-304}. En 1999, le Royaume Uni était le premier pays au monde à introduire le vaccin polysaccharidique conjugué dirigé contre le sérotype C en routine dans son calendrier vaccinal^{305,306}. Suivant l'exemple du Royaume Uni, ce vaccin a été successivement introduit au sein de plusieurs programmes d'immunisation nationale dans quatorze pays de l'UE (Union Européenne) et de l'EEE (Espace Economique Européen) ; Irlande (2000), Espagne (2000), Pays Bas (2002), Belgique (2002), Portugal (2006)³⁰⁷. Son introduction a permis un déclin massif de l'incidence des IIM de sérotype C au sein des pays les plus fortement touchés^{304,308-313}. Par exemple, au Royaume Uni, l'incidence du sérotype C a décliné de 1,85 cas pour 100 000 habitants entre 1998 et 1999 à 0,02 cas pour 100 000 habitants entre 2008 et 2009³¹⁴.

Le sérotype B est également très présent en Europe. Fortement endémique dans plusieurs pays avec une prévalence supérieure à 50% des cas, l'incidence des IIM B est régulièrement ponctuée par des épidémies clonales localisées, liées à l'émergence et l'expansion de clones hypervirulents. De telles situations ont par exemple été décrites en Norvège (B:15:P.16, entre 1970 et 1980)^{315,316}, à Gloucestershire, en Angleterre (B:15:P.16, au milieu des années 1980)³¹⁷, et en Normandie, en France (B:14:P.1.7,16, entre 2003 et 2013)³¹⁸. Ces 10-15 dernières années, une tendance à la baisse est observée concernant l'incidence des IIM de sérotype B dans plusieurs pays européens. Malgré cela, l'impact des IIM de sérotype B reste encore marqué dans certains pays et en 2015, le vaccin multivalent Bexsero® a été introduit au sein du programme d'immunisation nationale au Royaume Uni et en Irlande du Nord³¹⁹. Le sérotype Y est rare en Europe. Cependant, une augmentation du nombre de cas notifiés a été observée ces dernières années, en particulier au sein des pays nordiques, principalement du fait de l'émergence du complexe clonal ST-23³²⁰⁻³²³. Le sérotype W du complexe clonal ST-11 a aussi émergé et diffusé en Europe suite à l'épidémie survenue à la Mecque en 2000^{241,324}.

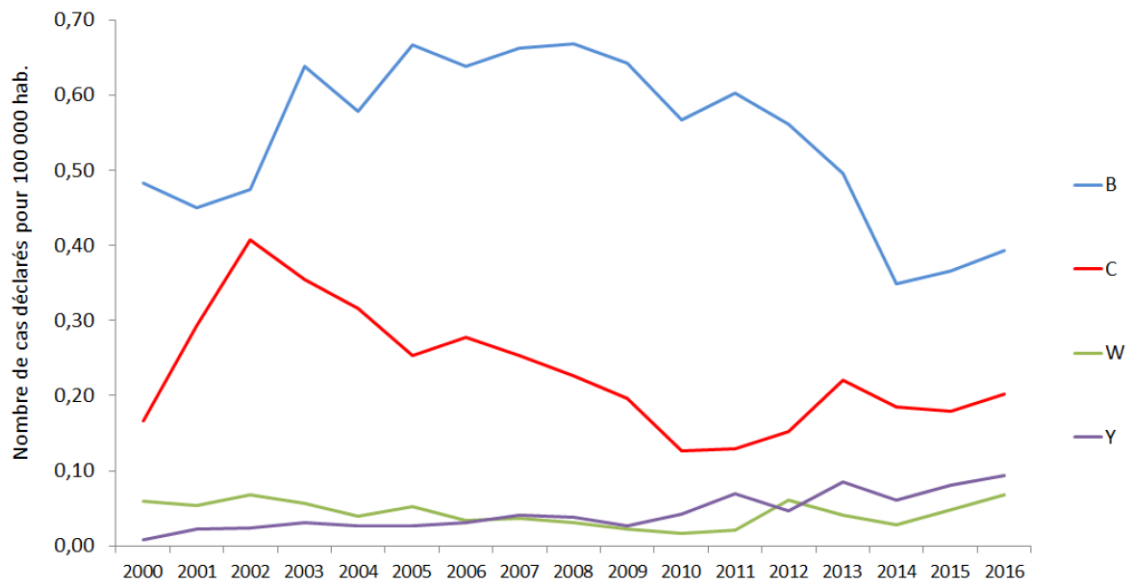


Figure 6 : Evolution du taux de notification des infections invasives à méningocoque par sérogroupe, France entière, 2000-2016

D'après l'agence nationale de santé publique³²⁵

2.1.1.3. Contexte national et normand

En France

La surveillance nationale des IIM repose d'une part sur la déclaration obligatoire des cas (signalés à l'Agence Régionale de Santé [ARS] concernée puis remontant à Santé Publique France [SPF]) et d'autre part sur la caractérisation des souches par le Centre National de Référence (CNR) des méningocoques (Institut Pasteur de Paris). Au fil des années et des progrès diagnostiques (avènement de la PCR) la définition « officielle » des cas d'IIM a connue de petites inflexions. Depuis la mise en place des nouveaux critères de déclaration en 2002 (actualisés en 2014), entre 400 et 800 cas ont été déclarés chaque année, représentant une incidence moyenne comprise entre 0,65 et 1,6 cas pour 100 000 habitants³²⁶. Sur la période 2002-2016 le sérotype B est resté prédominant pour tous les groupes d'âges (à l'exception de l'adulte de plus de 60 ans), représentant en moyenne plus de 60% des cas, devant le C (30% des cas) puis le W et le Y (chacun 5% des cas)³²⁵. Comme indiqué figure 6 des fluctuations d'incidence par sérotype ont été observées au cours des 15 dernières années dans la nation : baisse du B, émergence récente des W et Y (en particulier chez les sujets de plus de 60 ans)³²⁵. Quant au C, après un pic survenu en 2002 (0,42 cas pour 100 000), il a progressivement diminué jusqu'en 2010 (0,13 cas pour 100 000) avant même l'introduction du vaccin C conjugué³²⁷. Or depuis, une augmentation des IIM C est observée pour les groupes d'âges non ciblés par la vaccination (enfant de moins d'un an et adulte de plus de 25 ans)³²⁵.

L'épidémiologie nationale est régulièrement ponctuée d'épidémies localisées, de grappes de cas ou de situations inhabituelles conduisant à des vaccinations ciblées au-delà des recommandations générales. Ont ainsi été observés 3 cas groupés d'IIM C dans le Finistère en 2012 (clone C:P1-5,2) déclenchant une intensification de la couverture vaccinale jugée insuffisante (vaccin monovalent conjugué pour les 1-24 ans) ; 4 cas d'IIM B par le clone B:P1.7,16/ST-32 en Aquitaine sur 3 mois 2012 déclenchant une vaccination chez les sujets contacts des cas et les enfants de 2 à 24 mois de la zone par le MenBvac[®] (la souche étant couverte par ce vaccin OMV) ; une alerte internationale d'IIM (surtout C) en milieu gay ayant affectée notamment l'Île de France en 2013 et fait proposer le vaccin conjugué au-delà de 24 ans chez les sujets à risque ; 3 cas groupés d'IIM W chez des étudiants de l'université de Dijon en 2016 faisant déclencher sur le campus concerné une vaccination quadrivalente conjuguée couvrant ce risque³²⁸⁻³³¹.

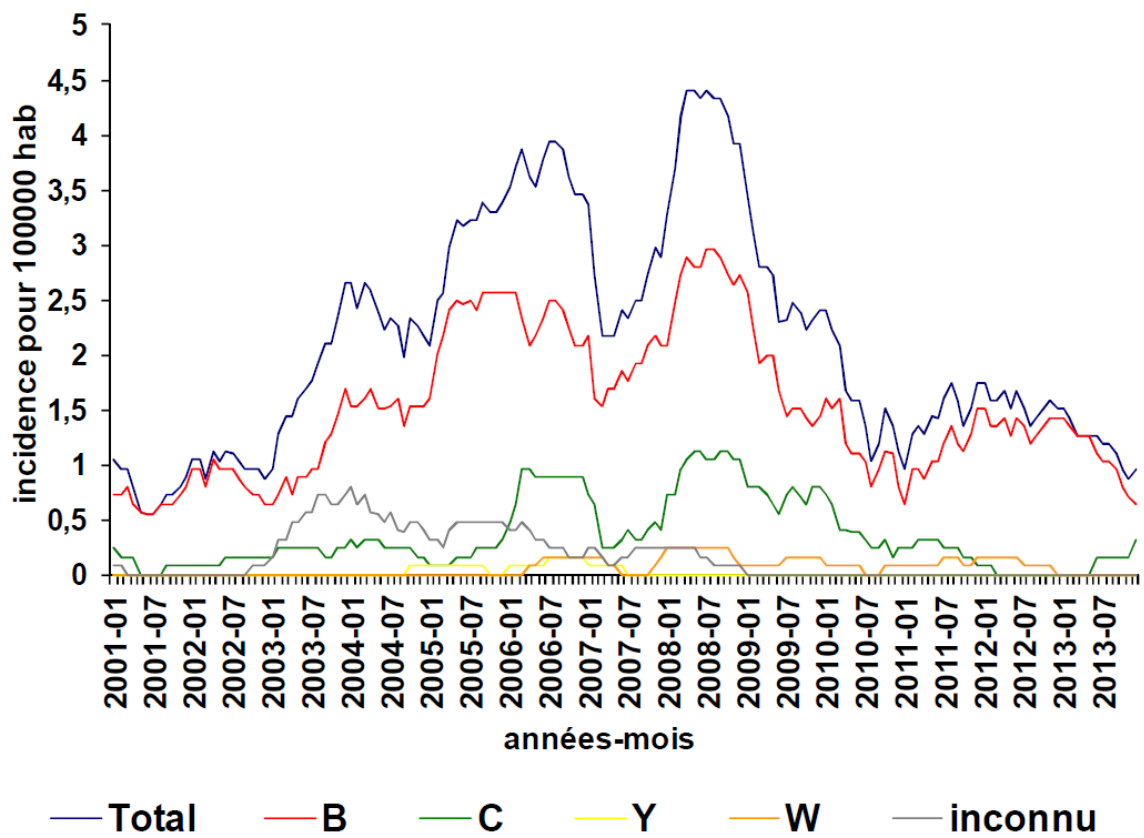


Figure 7 : Evolution du taux de notification des infections invasives à méningocoque par sérogroupe, Seine Maritime, 2001-2013.

D'après le Cire de Normandie³³²

Cependant la situation nationale de loin la plus inhabituelle en termes de durée, d'ampleur de bassin, de population touchée, de nombre de cas total et de décès observés fut l'hyper-endémie d'IIM B:14:P1.7,16/ST-32 vécue en Normandie de 2003 à 2012 ayant conduit notamment aux deux travaux de recherche originaux présentés dans ce mémoire. L'épidémiologie en est rappelée *infra* avec une discussion plus bas des performances du vaccin OMV MenBvac[®] mis en œuvre (cf chapitre 2.2.).

En Normandie

Le clone hyper-invasif B:14:P1.7,16/ST-32 a émergé en Seine-Maritime en 1997, étant responsable de 10 cas (45%) se traduisant par une augmentation de l'incidence des IIM dans le département par 6 par rapport à 1996 (0,24 cas/100 000 en 1996 contre 1,61 cas/100 000 en 1997)³³³.

C'est à compter de 2003 qu'est survenue l'hyper-endémie, alerte qui dans la définition française correspond à une augmentation anormale et durable de l'incidence des IIM sans toutefois atteindre le taux épidémique (fixé à 10 pour 100 000 en population générale)³¹⁸.

De fait, l'incidence moyenne des IIM en Seine-Maritime sur la période 2003-2006 (soit avant que la vaccination dédiée ne débute : cf *infra*) ne s'établissait "qu'à" 3,1 cas pour 100 000 habitants, contre 1,5 cas pour 100 000 habitants pour l'ensemble de la France. (Figure 7) Cependant certaines années une incidence supérieure à 10/100 000 fut notée dans la zone de Dieppe. A noter que d'autres pays n'ont pas établie un tel distinguo entre hyper-endémie et épidémie, et que les publications en langue anglaise ont rapporté le phénomène normand comme une épidémie ("outbreak" ou "epidemic" selon les articles).

Plus précisément, du 1er janvier 2003 au 30 juin 2006 (début de la vaccination, cf *infra*), 134 cas d'IIM ont été notifiés en Seine-Maritime. La souche B:14:P1.7,16/ST-32 était totalement dominante, soulignant son caractère épidémique en Seine-Maritime : alors qu'elle ne représentait que 5% (108/2160) de l'ensemble des souches invasives B caractérisées en France sur la période, elle pesait pour 66% (47/74) des souches de séro groupe B de Seine-Maritime.

En d'autres termes, durant cette période, la Seine-Maritime comptait pour près de la moitié de l'ensemble des souches B:14:P1.7,16/ST-32 identifiées en France entière (47/108 soit 44%). De surcroît la proportion importante de *purpura fulminans* (49%) et la létalité élevée (19%) des cas confirmés pour la souche de phénotype B:14:P1.7,16/ST-32 furent été des éléments de gravité supplémentaires. Le foyer d'hyper-endémie a été identifié dans une zone regroupant 75 communes (environ 85 000 habitants) dans et autour de la ville de Dieppe. En Seine-Maritime, 60% des IIM associées à la souche B:14:P1.7,16/ST-32, identifiées entre 2003 et juin 2006, étaient survenues dans cette zone ne pesant que pour 7% de la population départementale. Le taux moyen d'incidence cumulé des cas d'IIM avérés ou possibles associés à la souche B:14:P1.7,16/ST-32 y était de 11,4 cas pour 100 000 habitants. Les enfants entre 1 et 4 ans et les adolescents entre 15 et 19 ans furent les plus touchés.

Au moment de l'épidémie normande, il n'existait pas de vaccin permettant de protéger contre l'ensemble des IIM de séro groupe B (les vaccins recombinants tels le Bexsero[®] ont été développés à la fin des années 2000 : cf *infra*). Cependant l'Institut de Santé Publique de Norvège (NIPH) avait développé dans les années 1980 un vaccin OMV dénommé MenBvac[®], en réponse à une épidémie clonale due à une souche proche : B:15:P1.7,16/ST-32³³⁴. Une étude d'immunité croisée fut alors réalisée en collaboration par le CNR et le NIPH à partir d'une sérothèque d'une trentaine d'adolescents norvégiens jadis vaccinés par le MenBvac[®] ; il fut démontré une parfaite droite de corrélation entre les titres bactéricide du sérum vis-à-vis de B:15:P1.7,16/ST-32 et B:14:P1.7,16/ST-32³³⁵. Aussi en juin 2006, les autorités sanitaires françaises décidèrent de proposer la vaccination par MenBvac[®], avec alors pour cible l'ensemble des sujets âgés de 1 à 19 ans habitant ou fréquentant la Seine-Maritime³³⁶⁻³³⁸.

Le schéma vaccinal recommandé par le NIPH était de type "3+1 (J0-S6-S12-M15)" : primo-vaccination par trois doses à 6 semaines suivie d'un rappel un an après la 3^{ème} dose. Ceci supposait de pouvoir disposer de 1 millions de doses de MenBvac[®] sur 2 ans. Cependant, cette stratégie ne put jamais être appliquée, compte-tenu des difficultés récurrentes de production du vaccin. La vaccination débuta à partir d'un lot résiduel de vaccins cédé par la Norvège, ce pays ayant entretenu à distance de l'épidémie initiale une production en faible nombre pour se prémunir d'une éventuelle résurgence³³⁹. Un partenariat avec une firme pharmaceutique fut recherché, en vain. Aussi, la production resta pilotée par le NIPH, dimensionné bien davantage comme un institut de recherche que comme un industriel du médicament³³⁹.

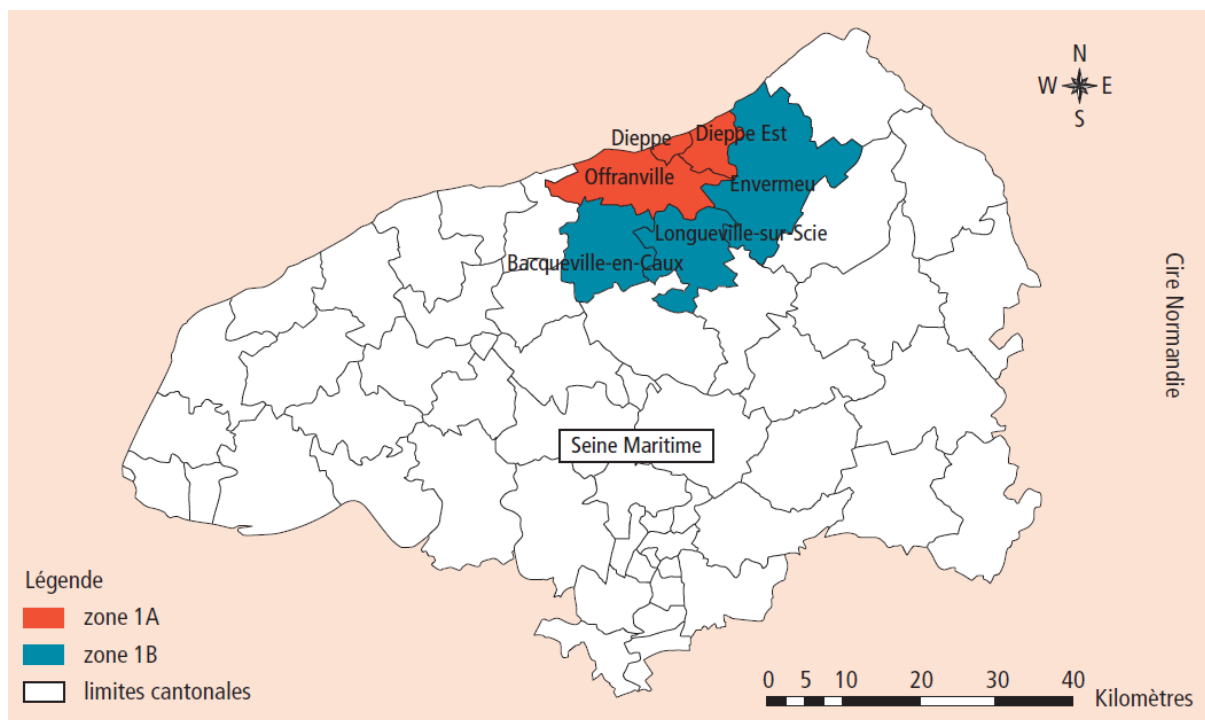


Figure 9 : Campagne de vaccination MenBvac® : localisation des cantons de la zone de vaccination de Dieppe en Seine-Maritime, France.

D'après Blanchard *et al*³⁴⁰

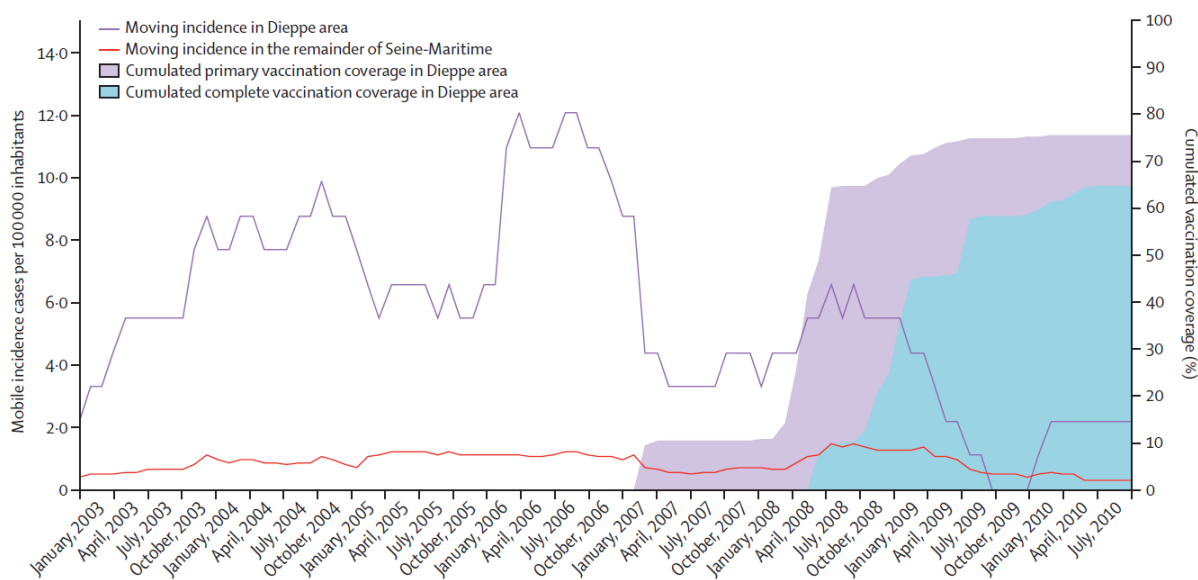


Figure 8 : Evolution du taux de notification des cas confirmés d'infections invasives à méningocoque liées aux clone B:14:P1.7,16 dans la zone de Dieppe contre le reste de la Seine-Maritime et couverture vaccinale cumulée dans la zone de Dieppe, 2003-2010.

D'après Caron *et al*³¹⁸

De ce fait la stratégie vaccinale connut maintes inflexions pour s'adapter à la pénurie de production et cibler à chaque fois les catégories les plus prioritaires en termes d'âge et de lieu de résidence. Ainsi à la mi-2006, la campagne vaccinale débuta dans seulement trois des six cantons de la zone de Dieppe (zone 1A) et uniquement pour les enfants entre 1 et 5 ans (Figure 8). Cependant du fait d'un différé de livraison des nouveaux lots vaccinaux, la 3^{ème} dose ne put être faite qu'au 8^{ème} mois pour ces enfants-là, réalisant *de facto* un schéma "2+1 (J0-S6-M8)", *in fine* complété d'un second rappel à 23 mois 2+1+1 (J0-S6-M8-M23). Cette cohorte-là fut enrôlée pour une première étude d'immunogénicité évaluant l'apport du 1er rappel³¹⁸. En 2007, le schéma "3+1" initialement recommandé par le NIHP put lui être appliqué aux enfants entre 1 et 5 ans des trois autres cantons de la zone de Dieppe (zone 1B).

En 2008, l'étude d'immunogénicité évoquée *supra* permis de valider le schéma "2+1" et de l'étendre à tous les sujets de moins de 19 ans de la zone. Par ailleurs la vaccination fut élargie dès l'âge de 2 mois en gardant pour les moins de un an un schéma "3-1" (du fait de l'immunogénicité traditionnellement moins bonne à cette tranche d'âge)^{341,342}.

Entre 2008 et 2010, le clone B:14:P1.7,16/ST-32 s'étendit très au-delà de la zone de Dieppe, vers l'Est de la Seine-Maritime (cantons de Neufchâtel-en-Bray) et de l'Ouest limitrophe de la Somme^{343,344}. Ceci impliqua une nouvelle inflexion de la campagne vaccinale, élargie des nourrissons aux jeunes adultes jusqu'à 24 ans dans l'ensemble de ces cantons, avec une disponibilité en doses de MenBvac[®] autorisant le schéma "3+1" pour l'ensemble des nouveaux vaccinés (et pas seulement les moins de un an) ainsi qu'un second rappel pour ceux ayant reçu trois doses lors des années précédentes (schéma "2+1" complété en "2+1+1")³⁴⁵.

A partir de 2013 les toutes dernières vaccinations initiées contre l'hyper-endémie en Seine-Maritime et dans la Somme purent faire appel au Bexsero[®] (couvrant bien le clone B:14:P1.7,16/ST-32, ce vaccin recombinant B "universel" laissant en fait de côté environ 15% des souches b circulant en Europe ; cf *infra*)^{346,347}.

A compter de 2009, une diminution de l'incidence des IIM B:14:P1.7,16 fut observée dans la zone de Dieppe, démontrant ainsi l'impact favorable de cette campagne de vaccination mise en œuvre depuis 2006 (Figure 9). En 2013, le contrôle de l'hyper-endémie fut prononcé permettant de réduire la zone de vaccination de 18 à 6 cantons (les derniers touchés : 3 dans l'Est de la Seine-Maritime et 3 dans l'Ouest de la Somme).

Comme la campagne vaccinale ne put être jamais menée, pour des raisons d'insuffisance d'approvisionnement, dans l'ensemble de la Seine-Maritime, et notamment dans les arrondissements de Rouen et du Havre très peuplés (où des cas clonaux étaient survenus mais à moindre fréquence) cela apportera une forme d'étude cas-témoin, démontrant l'impact du MenBvac[®] dans les cantons traités, et *vice versa* (Figure 8).

Depuis 2014 l'épidémiologie régionale est comparable à celle du pays, avec quelques fluctuations annuelles (dues aux relatifs petits nombres) et globalement une incidence d'IIM faible (autour de 1 cas pour 100 000) avec une moitié d'IIM mais pour lesquelles le poids de B:14:P1.7,16 est redevenu marginal (<5-10%)³⁴⁸.

2.1.2. Vaccins anti-méningococciques

Ce chapitre va traiter des différentes approches vaccinales anti-méningococciques historiquement développées, avec un focus sur celles ayant pu cibler les IIM B, historiquement les OMV puis les recombinants. Pour tous les vaccins, seules seront détaillées les indications en population générale (telles qu'indiquées au calendrier vaccinal) ou pour contrôler telle épidémie. Ne seront pas abordées ici les indications beaucoup plus rares chez des sujets à haut risque d'IIM : entourage propre d'un cas avéré, sujet immunodéprimé (notamment par déficit en complément), personnels des laboratoires experts sur *N. meningitidis*.

2.1.2.1. Vaccins polysidiques non conjugués

En 1907, Simon Flexner démontre que l'approche d'immunisation passive utilisant des antisérums équins dirigés contre le méningocoque permet de réduire de moitié le taux de mortalité lié aux IIM⁹. En 1935, Scherp et Rake identifient la nature polysaccharidique de la capsule des méningocoques de sérogroupe A, qui servira de base au développement des premiers vaccins anti-méningocoque³⁴⁹. Néanmoins, l'introduction de l'antibiothérapie dans les années 30 et l'utilisation des sulfamides relèguera au second plan le développement de vaccins dirigés contre le méningocoque¹⁵. A la fin des années 1960, l'augmentation du nombre de cas notifiés au sein de bases militaires et l'apparition des premières souches résistantes aux sulfamides, relance la nécessité de développer un moyen de prévention sûr pour lutter contre les IIM¹⁷⁻¹⁹.

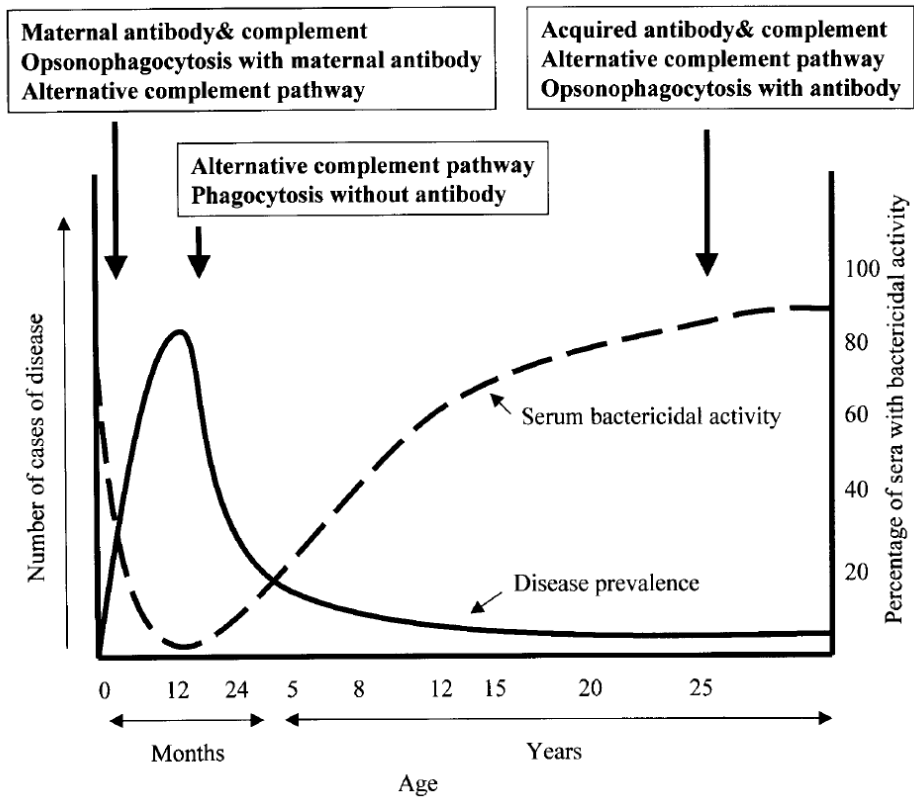


Figure 10 : Prévalence des infections invasives à méningocoque en fonction de l'âge et relation avec l'immunité générale définie par l'activité bactéricide du sérum humain.

D'après Pollard et Frasch³⁵⁰

L'importance de l'activité bactéricide du sérum (Serum Bactericidal Activity en anglais, l'acronyme « SBA » étant très utilisé et donc repris plus bas) corrélée à la protection contre les infections invasives a tout d'abord été démontrée par Goldschneider, Gotschlich et Artenstein au sein du Walter Reed Army Institute of Research en 1969⁵⁹. Ces essais réalisés *ex vivo* ont identifié que la plupart des personnes adultes possèdent un taux d'anticorps circulants protecteurs contre le méningocoque (anticorps bactéricides) et que la survenue d'IIM est inversement proportionnelle à l'activité bactéricide du sérum de chacun (Figure 10). Les enfants âgés de 6 mois à 1 an sont plus fortement touchés par les IIM car ils possèdent un faible taux d'anticorps protecteurs. En cause, le déclin de l'immunité maternelle qui survient avant le développement de l'immunité acquise^{52,350}. Les tests réalisés sur différents sérogroupes ont montré que les anticorps protecteurs étaient en particulier dirigés contre les antigènes capsulaires³⁵¹. Ces résultats ont permis le développement des vaccins polysidiques non conjugués dits simples, dérivés de la capsule de souches de méningocoque de séro groupe A, C, W et Y³⁵². Ceci a conduit à la mise en place de campagnes vaccinales d'abord dirigées contre les sérogroupes A ou C (dans les années 1970-1980) puis plus récemment contre les sérogroupes Y et W, et ceci au sein de collectivités fermées (casernes...) comme en population générale^{353,354}.

L'efficacité du vaccin polysidique dirigé contre le séro groupe C a été démontrée par Artenstein au cours d'une étude réalisée au sein d'un camp militaire de jeunes recrues aux Etats Unis d'Amerique³⁵³. Un seul cas d'IIM fut décrit parmi les 13 763 sujets vaccinés, là où 38 cas avérés furent décrits parmi les 68 072 sujets du groupe contrôle. La campagne vaccinale permit ainsi de réduire l'incidence des IIM de 87% pour le groupe vacciné. L'introduction successive des vaccins dirigés contre le séro groupe C en 1971, contre les sérogroupes A et C en 1978, et contre les sérogroupes A, C, Y et W en 1982, a ainsi permis de diminuer par 10 le nombre de cas d'IIM notifiés au sein de l'armée américaine entre 1964 et 1984^{21,355}.

Comme détaillé plus bas le développement de tels vaccins n'a pas été possible contre le séro groupe B en raison de la faible immunogénicité des polysaccharides capsulaires B et de similitudes structurales avec des composants de cellules neurales humaines (Neural Cellular Adhesion Molecule en anglais ou NCAM) exposant potentiellement à des réactions d'auto-immunité³⁵⁶.

Les effets secondaires de ces vaccins polyosidiques "classiques" (désormais les préparations sont "conjuguées" cf *infra*) se limitaient à une irritation locale au niveau du site d'injection et à des symptômes mineurs (maux de tête, fatigue, malaise, état fébrile). Cependant, ces vaccins étaient entachés de nombreuses limites. Comme d'autres vaccins polyosidiques (dirigés contre *S. pneumoniae* et *H. influenzae* de type B), ils sont peu immunogènes (à l'exception du sérotype A) chez les nourrissons de moins de 2 ans pourtant principale population à risque. Ils sont antigènes T indépendants, induisant une réponse immunitaire primaire médiée par des immunoglobulines de classe M (IgM) de faibles affinités, ne générant pas de réponse mémoire^{354,357}. De plus, l'administration de doses répétées visant à booster la durée de protection engendre une hyporéactivité immunologique, une diminution du taux d'anticorps induits étant alors observée chez le sujet vacciné en particulier pour les sérotypes C, W et Y³⁵⁸⁻³⁶¹.

De surcroît, et c'est un fait majeur, ces vaccins polyosidiques classiques n'ont pas d'effet sur le portage rhinopharyngé et ne génèrent donc pas d'immunité de groupe si nécessaire à l'interruption de la chaîne de transmission entre les personnes (cf *infra*)^{353,362-365}.

Seuls disponibles pendant deux décennies (hormis les rares OMV dirigés contre un clone B particulier) ces vaccins polyosidiques classiques ont évidemment eu un impact majeur sur l'incidence des IIM, en particulier dans le cas où il s'agissait d'apporter une protection de faible durée mais suffisante : protection des voyageurs avant séjour dans une zone à risque et surtout campagne vaccinale ciblée en réponse à une, épidémie ponctuelle (camp militaire, université). Désormais ces vaccins sont supplantés par l'approche conjuguée.

2.1.2.2. Vaccins polyosidiques conjugués

L'invention des vaccins conjugués dans les années 1980 fut donc une avancée majeure dans le développement des vaccins polyosidiques³⁶⁶. La liaison des saccharides à une protéine porteuse immunogène (anatoxine diphtérique ou tétanique), à la base des vaccins conjugués, fut en fait tout d'abord étudiée par Avery et Goebel dès 1929³⁶⁷. Contrairement à l'utilisation de saccharide seul, la conjugaison permet de recruter spécifiquement des lymphocytes T auxiliaires et d'induire une réponse immunitaire mature médiée par les lymphocytes B via l'immunogénicité de la protéine de transport.

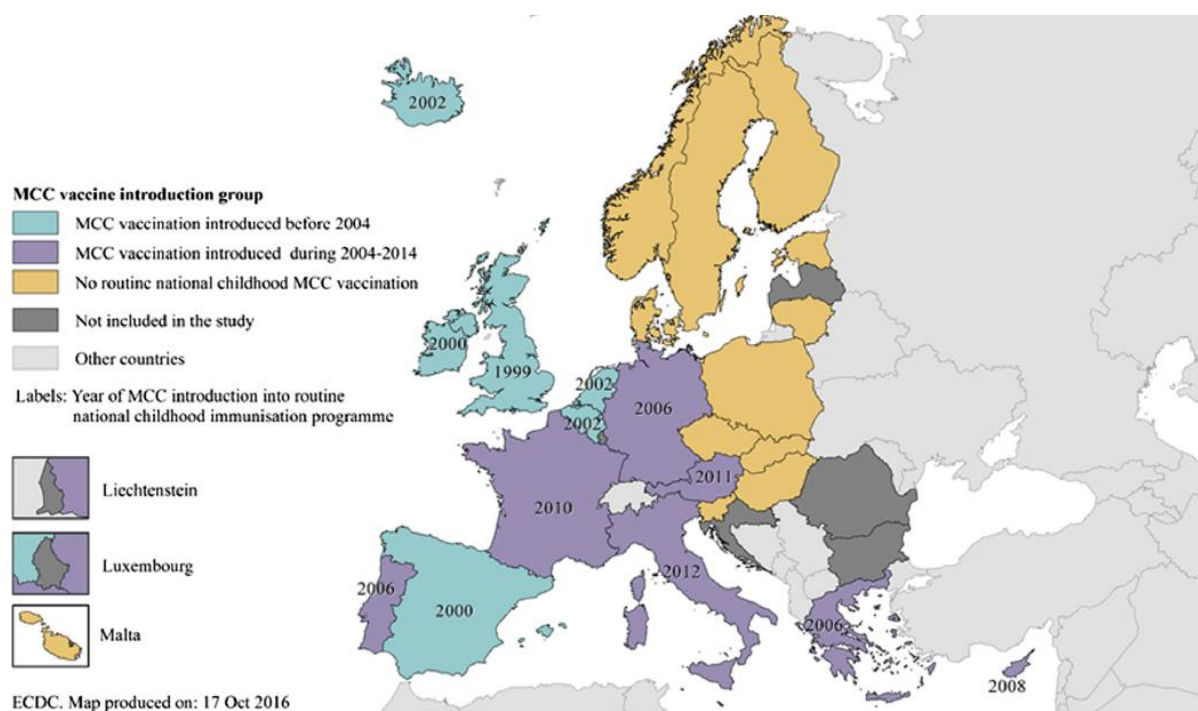


Figure 11 : Année d'introduction du vaccin dirigé contre le méningocoque C en routine chez l'enfant par pays, UE/EEE, 1999-2014.

D'après Whittaker³⁰⁰

Cette approche résout toutes les difficultés des vaccins "classiques" : les vaccins conjugués sont immunogènes chez l'enfant de moins de 2 ans; il n'y a pas de phénomène d'épuisement vaccinal, car ils induisent une mémoire immunitaire et un taux d'anticorps (IgG) élevé après plusieurs injections ; ils sont actifs, y compris à long terme sur le portage nasopharyngé, diminuant ainsi la transmission et apportant une "immunité de groupe" ou "effet troupeau" (les sujets non vaccinés ont un risque diminué d'acquérir un clone invasif, bénéficiant donc de la vaccination de leurs congénères)³⁶⁸⁻³⁷¹. Tout comme les vaccins "classiques" les "conjugués" sont globalement très bien tolérés. Tout ceci en fait d'excellent candidat pour la prévention en population des infections invasives à haut taux de létalité/séquelles. Historiquement les vaccins conjugués ont été développés vis-à-vis des méningites et autres infections invasives à *H. influenzae* de type b qui faisaient des ravages chez les jeunes enfants et qui ont quasiment disparues à l'échelon mondial grâce à la vaccination de masse (inclue dans les programmes de l'OMS). Ce succès contre *H. influenzae* de type b a permis d'accélérer le développement des vaccins polysidiques conjugués dirigés contre le méningocoque vers la fin des années 1990^{372,373}.

La première introduction d'un vaccin polysidique conjugué monovalent dirigé contre le méningocoque a été réalisée au Royaume Uni en 1999, suite à l'augmentation de l'incidence des IIM de séro groupe C du complexe clonale ST-11 (Figure 11)^{305,306}. Une large campagne vaccinale ciblant l'ensemble des enfants de moins de 19 ans fut mise en place, avec un grand succès : immunité induite comprise entre 88 et 98% au cours de l'année suivant la vaccination ; réduction du portage rhinopharyngé des souches de séro groupe C de 75% chez l'adolescent (principal réservoir) et de 66% au sein de la population générale ; spectaculaire diminution d'incidence des IIM C chez les personnes de moins de 20 ans (de 5.34 cas pour 100 000 habitants à 0.03 cas pour 100 000 habitants entre 1998 et 2009)^{308,314,374-377}. A l'époque une crainte était que la vaccination C de masse favorise des "switchs capsulaires" en particulier au profit des IIM B, échappant elles aux vaccinations de masse³⁷⁷. Cependant ceci n'eut jamais un impact à grande échelle, et ne représente pas un facteur limitant dans les décisions vaccinales.

Depuis, le spectre des vaccins polysidiques conjugués anti-méningocoque disponibles s'est élargi à quatre sérogroupes (A, C, Y, W). Plusieurs formulations et approches de conjugaison ont été développées entraînant la production des vaccins conjugués monovalents A et C et tétravalents ACWY, chacun utilisant différentes protéines de transport ; toxine tétanique, toxine diphtérique, et la toxine diphtérique mutante non toxique CRM₁₉₇ (de l'anglais Cross Reacting Material).

Ces vaccins conjugués ont été introduit différents selon les pays, en s'adaptant à l'épidémiologie locale. En Europe, tous les pays membres de l'ECDC ont une vaccination conjuguée C dans l'enfance (avec une obligation vaccinale seulement pour la France) ; à l'adolescence la stratégie est soit l'abstention, soit le rattrapage pour tous les sujets non vaccinés dans l'enfance (position française), soit un rappel C conjugué systématique, soit enfin un quadrivalent ACWY conjugué (en réponse à l'émergence W et Y notamment en Europe du Nord) chez l'adolescent (cible prioritaire du fait d'un second pic de fréquence d'IIM à cette tranche d'âge apportée à l'augmentation de la socialisation, à un haut taux de portage pour les mêmes raisons, de sorte que l'adolescent non immunisé peut être un fort vecteur de diffusion)³⁷⁸.

Aux Etats-Unis d'Amérique, aucune vaccination n'est actuellement recommandée chez les jeunes enfants au motif d'une incidence historiquement basse, rendant la mesure peu "coût-efficace" tandis que bien d'autres priorités vaccinales existent à ce stade. Par contre du fait d'épidémies régulières dans les universités le conjugué tétravalent ACWY est recommandé à cette tranche d'âge dès 2005, à l'époque en une dose unique³⁷⁹.

L'efficacité moyenne des 3 vaccins disponible a été estimée au cours des 5 premières années pour les sérogroupes C et Y à respectivement 87-96% et 91-94%³⁸⁰. En considérant le délai post vaccination, l'efficacité moyenne a été estimée à 95% après 1 an, 91% entre 1 et 2 ans et à 58% entre 2 et 5 ans. Cette diminution importante de l'efficacité moyenne après 5 ans est en particulier lié à la chute du titre SBA observée pour le séro groupe A (38-53%). En 2010, un rappel sera introduit dans le schéma vaccinal à 16 ans pour contrer le déclin de l'immunité et du taux d'anticorps protecteurs³⁸¹. Cette politique a permis de réduire l'incidence des IIM causées par les sérogroupes C, W et Y chez l'enfant âgé de 11 à 18 ans de 1.13 cas pour 100 000 habitants en 1998 à 0.05 cas pour 100 000 habitants en 2011.

En Afrique, le contrôle des IIM A ayant fait historiquement des millions de morts cumulés et en chemin grâce au développement du vaccin conjugué MenAfriVac dirigé contre le séro-groupe A³⁸². Jadis le contrôle des épidémies africaines était en pratique impossible par les vaccins polysaccharidiques non conjugués car cela aurait nécessité la mise en place de la campagne vaccinale dès les premiers signes épidémiques, un stock de vaccin utilisable important et une mobilisation sans précédent. Jusqu'au début des années 2000, l'approche conjuguée n'était également pas possible pour le continent africain : aucun vaccin monovalent conjugué A, coût trop élevé des quadrivalents d'autant que ce sur-ajoutaient des difficultés logistiques (chaîne du froid)³⁸³. Le développement de MenAfriVac depuis 2010 a révolutionné cette situation désastreuse. En effet, le projet MVP (Meningidis Vaccine Project) initié en 2001 par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et le PATH (Programme for Appropriate Technology in Health), et financé par la fondation Bill et Melina Gates, a permis le développement d'un vaccin conjugué A parfaitement adapté grâce à une solidarité internationale : cession de brevets, fabrication en Inde, composé thermostable, le tout aboutissant à une dose individuelle à moins de 1 dollar (là où le prix public du monovalent C Neisvac[®] s'établit en France à 20 euros)^{382,384}. En 2010, au moment des premières applications de masse (au Burkina Faso, au Mali et au Niger), peu d'informations sur le portage générale étaient disponibles et pour assurer une efficacité maximum, il fut décidé d'immuniser tous les individus jusqu'à 29 ans^{245,385}.

Au Burkina Faso, un an après le début de la campagne, l'incidence nationale des IIM avait diminué de 99,8% et aucun cas d'IIM de séro-groupe A n'était rapporté³⁸⁶. Le taux de portage de souche de séro-groupe A au Burkina Faso est ainsi passé de 0,39% avant l'introduction du vaccin à virtuellement 0% un an après la campagne (aucun cas de portage de souches de séro-groupe A n'a été décrit parmi les 5 000 personnes échantillonnées)^{387,388}. Ainsi à l'instar du C conjugué C MenAfriVac confère une excellente immunité de groupe.

2.1.2.3. Vaccins anti-méningococciques B

Alors que tant de progrès ont été réalisés en matière de prévention des IIM A, C, Y et W, la prévention des IIM B est restée longtemps un défi, l'approche polysaccharidique étant ici impossible comme évoqué plus haut pour des raisons à la fois de faible immunogénicité et de risque d'auto-immunité³⁵⁶. Dès lors, deux autres approches ont vu le jour : les vaccins OMV puis les recombinants.

Tableau 1 : Utilisation des vaccins OMV dans le monde

Localisation	année	Nom	Formulation	Souche	Formule antigénique
Iquique, Chili	1987	-	OMV et polysaccharide C	8529	B:15:P1.3
Cuba	1989	VA-MENCOG-BC	OMV, polysaccharide C et protéines d'enveloppes	Cu385/83	B:4:P1.15
Sao Paulo, Brésil	1990	VA-MENCOG-BC	OMV, polysaccharide C et protéines d'enveloppes	Cu385/83	B:4:P1.15
Norvège	1988	MenBvac	OMV	H44/76	B:15:P1.7,16
Nouvelle Zélande	2004	MeNZB	OMV	NZ98/254	B:4:P1.7-2,4
Normandie, France	2006	MenBvac	OMV	H44/76	B:15:P1.7,16

Approche « OMV »

La capsule n'étant pas une cible possible pour les vaccins B, le développement de vaccins dirigés contre le séro groupe B s'est concentré sur les antigènes sous-capsulaires. Les vaccins les plus largement développés ont été basés sur l'extraction de vésicules de membrane externe. Les OMV sont naturellement reléguées par le méningocoque au cours de sa croissance et présente l'avantage de contenir les protéines de membranes externes dans leur conformation natives³⁸⁹. Les LOS, très présents à la surface des OMV et potentiellement toxiques, sont tronqués sous l'action des détergents utilisés pour l'extraction afin de réduire leur pouvoir réactogène. Cependant, par extraction conventionnelle, certaines protéines de membranes externes immunogènes, tels que la protéine de liaison au facteur H (fHpb) sont également solubilisées et éliminées. De ce fait, l'immunogénicité des vaccins OMV est principalement médiée par la protéine PorA contre laquelle sont dirigés les anticorps bactéricides^{161,390}. En raison de la haute diversité des porines PorA, ce type de vaccin était jusqu'alors réputé offrir une protection spécifique à la souche utilisée pour la fabrication et ne pouvoir être utilisé que pour contrôler des épidémies clonales. Par exemple, il a été évalué en 2000 qu'il conviendrait d'apporter 20 variants différents de la protéine PorA afin de couvrir 80% des souches endémiques aux Etats Unis³⁹¹. Ce type de vaccin présente donc un intérêt limité pour les programmes d'immunisation nationaux, nécessitant de couvrir une plus large variété de souches.

Les vaccins OMV sont sûrs. Ils ont une efficacité comprise entre 50 et 90% contre les souches homologues³⁹². Cependant, pour être pleinement efficaces, les vaccins OMV nécessitent une administration de doses répétées, en particulier chez le jeune enfant. Malgré cela l'immunité induite décline rapidement au cours du temps. La réponse immunitaire croisée vis-à-vis de souches hétérologues est classiquement considérée comme inexistante chez l'enfant et limitée chez l'adulte. Néanmoins, ce type de vaccin a permis le contrôle de plusieurs épidémies localisées de par le monde (Cuba, Brésil, Chili, Nouvelle Zélande, Norvège, France)^{268,273,296,318,334,393}.

A cette fin, plusieurs formulations vaccinales ont été développées ces 30 dernières années à partir d'OMV seules ou combinées avec d'autres antigènes et utilisées à grande échelle : vaccin chilien, vaccin cubain, vaccin norvégien et vaccin néo-zélandais (Tableau 1). Les données d'immunogénicités et de spectre d'action des vaccins OMV utilisés en clinique seront détaillées plus bas dans la discussion du travail personnel.

Malgré le développement des vaccins recombinants (cf *infra*), l'histoire des OMV n'est potentiellement pas terminée³⁹⁴. En effet depuis le début des années 1990, plusieurs vaccins candidats contenant de multiples variants de la protéine PorA ont été développés pour contrer les limitations liées à la spécificité de souche^{395,396}. Sur la base de souches épidémiques prévalentes, des formulations contenant six et neuf valences antigéniques (Hexamen et Nonamen, respectivement), ont été préparés à partir de souches recombinantes exprimant chacune trois sous-types différents de la protéine PorA. En théorie, de tels vaccins offrent une large couverture dirigée contre les souches responsables de la plupart des cas endémiques³⁹⁷. Les études cliniques ont cependant montré que certains sous-types de PorA apparaissaient comme dominant et ces vaccins non pas été plus amplement développés à des fins commerciales. Le vaccin OMV natif Nonamen, formulé à partir de neuf valences a donné des résultats encourageant chez l'animal mais n'a pas encore été testé chez l'humain. De ce fait, aucun vaccin OMV « multi-valent » offrant une large couverture vaccinale n'a été commercialisé, même si une l'approche nonavalente, le Nonamen, est envisagé.

Néanmoins, ces 10 dernières années, le développement des vaccins OMV a offert de nouvelles perspectives en matière de design et de formulation. Il est établi que la persistance des complexes clonaux virulents et leurs profils antigéniques sont maintenus par la pression de sélection immunitaire. En théorie, cela simplifie le design de nouveaux vaccins et suggère qu'une formulation basée sur les antigènes majeurs pourrait spécifiquement cibler les souches invasives³⁹⁸. Ainsi, une formulation contenant plusieurs variants des protéines de membrane externe intègres, tels que PorA et FetA, pourrait former à l'avenir la base de vaccin offrant une plus large protection¹⁹⁸. Les vaccins OMV monovalent produits directement à partir de souches de méningocoque exprimant PorA et FetA sont sûrs et immunogènes pour ces deux protéins³⁹⁹. En parallèle, le développement de vaccin OMV natifs, offre la possibilité d'étendre ce concept et d'inclure les protéines et lipoprotéines membranaires, tel que fHbp, qui sont pour l'instant solubilisées et éliminées sous l'action des détergents utilisés dans l'extraction conventionnelle. Des vaccins OMV natifs ont été préparés à partir de souches génétiquement modifiées pour sur-exprimer le gène *fHbp* dans un mutant du gène *rmpM* (impliqué dans la stabilisation des complexes oligomériques des porines PorA et PorB) qui permet d'augmenter le rendement d'extraction des OMV et du gène *lpxI* (impliqué dans la synthèse du lipide A du LOS) qui exprime une forme de LOS peu réactogène⁴⁰⁰⁻⁴⁰².

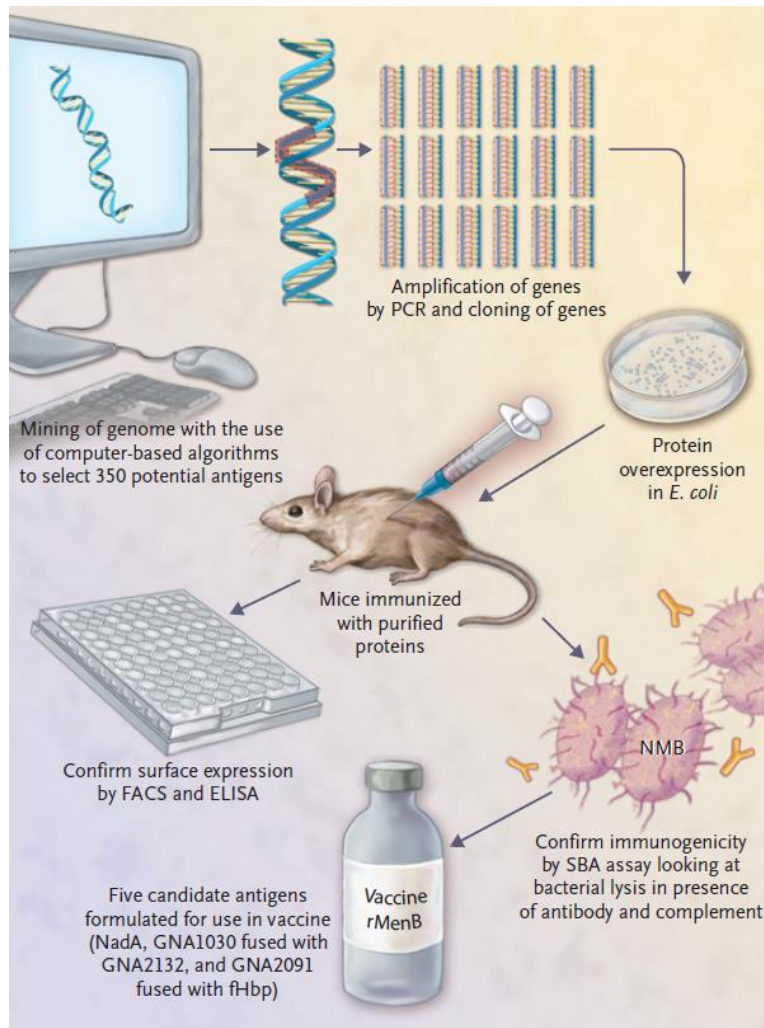


Figure 12 : Application de la vaccination inverse dans le développement de vaccins dirigés contre le méningocoque de sérotype B.

D'après Tan *et al*⁴⁰³

Ils sont sûrs, immunogènes et induisent potentiellement une protection croisée chez l'animal et l'Homme, bien que pour l'instant aucune étude clinique chez l'enfant n'ait été réalisée^{404,405}. Enfin, le développement futur d'un vaccin LOS ne peut être totalement exclu. Les analyses réalisées sur les anticorps bactéricides humains ont montré que les anticorps anti-LOS contribuent largement à l'activité bactéricide globale du sérum et que certains sous-types induisent une protection croisée, dirigée contre différents immunotypes du LOS⁴⁰⁶. De plus, les LOS pourraient avoir des propriétés adjuvantes. Les vaccins OMV dépourvus de LOS sont moins immunogènes que ceux formulés à partir d'OMV mutées pour le gène *lpxL*, qui conservent une immunogénicité similaire aux OMV naturelles et ont une toxicité réduite chez l'animal⁴⁰⁰. Cependant, une étude *in-vitro* réalisée à partir de cellules humaines dendritiques suggère que ces propriétés ne sont pas retrouvées chez l'Homme⁴⁰⁷. Néanmoins, les premiers essais cliniques ont apporté des résultats prometteurs et démontré l'immunogénicité des LOS utilisés comme formule vaccinale^{405,408}.

Tout récemment le vaccin OMV néozélandais a fait la preuve d'une efficacité partielle dans la protection vis-à-vis des gonococcies⁴⁰⁹. Dans une étude chez des sujets globalement exposés aux IST (les témoins souffrant de chlamydie) le fait d'avoir reçu MenZB[®] 10 ans auparavant était un facteur protecteur des infections à *N. gonorrhoeae*, l'homologie génétique (estimée à 80-90%) pouvant expliquer cet effet inattendu. Même si les infections à gonocoque ne sont qu'exceptionnellement invasives et mortelles, le fardeau de ces IST en termes d'inconfort, de risque de stérilité, de facteur favorisant la dissémination du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) et l'émergence de souches multi-résistantes font que le développement de vaccins anti-gonococciques pourrait être envisagé, *a fortiori* si le bénéfice survient en marge de la prévention des IIM. C'est dire que les OMV pourraient demeurer plus que jamais "anciens mais non oubliés" pour reprendre le titre de l'éditorial ayant accompagné la présentation dans le *Lancet Infectious Diseases* de l'article ayant démontré le bénéfice du MenBvac[®] dans la zone de Dieppe.

Approche « recombinante »

La nécessité d'identifier des antigènes hautement conservés pour la fabrication d'un vaccin universel dirigé contre le sérotype B a conduit au développement de techniques alternatives. Décrite en 2000, la technique de vaccinologie inverse (de l'anglais « reverse vaccinology »), a permis d'identifier 350 gènes candidats codant pour des protéines de membrane externe potentiellement antigéniques (Figure 12)^{201,410}.

Ces protéines ont été évaluées selon leur capacité à induire un taux d'anticorps bactéricides. Cinq antigènes dérivés du génome de *N. meningitidis* (Genome-derived Neisserial Antigens en anglais d'où l'acronyme « GNAs ») ont alors été identifiés comme les plus prometteurs. La protéine d'adhésion GNA1994 (NadA), la protéine de liaison au facteur H GNA1870 (fHbp), la protéine de liaison à l'héparine GNA2132 (NHBA), et les protéines GNA2091 et GNA1030 ont ainsi été sélectionnés et combinés dans une formulation vaccinale appelée rMenB. Le sérum des souris immunisées par cette formulation vaccinale a montré une activité bactéricide contre 78% des souches de méningocoque B testées⁴¹¹. Cette approche alternative permettait d'outrepasser les limites du vaccin OMV « monovalent » et d'élargir la couverture vaccinale en associant différentes protéines recombinantes antigéniques.

Le rMenB a conduit au développement clinique du 4CMenB (Bexsero[®]), vaccin contenant trois antigènes recombinants identifiés par vaccinologie inverse (fHbp, NadA, NHBA), formulés avec l'OMV néozélandaise dérivée de la souche NZ98/254 (formule antigénique B:4:P1.7-2,4), l'OMV étant apportée tant pour ajouter un motif antigénique que pour booster la réponse immunitaire. Les protéines fHbp et NHBA sont incluses sous formes chimériques fusionnées avec les protéines GNA2091 et GNA1030 (fHbp-GNA2091 et NHBA-GNA1030). Ce vaccin est sûr mais peut engendrer un état fébrile, particulièrement lorsqu'il est coadministré avec d'autres vaccins en routine pédiatrique (tétanos, diphtérie, polio, *H. influenzae* type b)^{412,413}. Les études cliniques réalisées chez l'enfant ont également démontré que les quatre composants choisis permettaient l'induction d'anticorps bactéricides spécifiques dirigés contre des souches exprimant un profil antigénique identiques à ceux ciblés par ce vaccin^{412,413}. Cependant, l'immunité induite est directement dirigée contre les antigènes sous-capsulaires qui sont hautement variables et différemment exprimés. Le système de typage des antigènes du méningocoque (Meningococcal Antigen Typing System en anglais d'où l'acronyme « MATS ») a été développé pour prédire la réponse immunitaire induite par le vaccin et pour quantifier le pouvoir bactéricide des anticorps produits contre une souche donnée⁴¹⁴. Selon les résultats obtenus, le vaccin Bexsero[®] permettrait de couvrir 78% des souches de séro groupe B isolées en Europe³⁴⁷.

Le vaccin Bexsero[®] a été agréé en Europe en Janvier 2013 sur la base des résultats sérologiques obtenus et non sur l'évidence directe de la protection conférée⁴¹⁵. A ce jour il n'a été introduit que dans un seul calendrier vaccinal national, celui du Royaume Uni⁴¹⁶.

Dans le contexte d'une prévalence élevée d'IIM B dans le pays (628 cas notifiés en 2014) affectant principalement les jeunes enfants (incidence élevée chez l'enfant âgé de 5 mois), la vaccin Bexsero[®] est recommandé depuis septembre 2015 à l'ensemble des nourrissons selon un schéma à 2 doses plus 1 rappel administré à 2 mois, 4 mois et 12-13 mois de vie⁴¹⁶. Cette situation a donnée l'opportunité de mesurer l'impact du vaccin Bexsero[®] contre des souches diverses et endémique sur une large population à l'échelle d'un pays. Dix mois après le début du programme, l'impact initial du Bexsero[®] chez les enfants éligibles à la vaccination a montré une efficacité avant l'administration du rappel de 82,9% contre les souches de séro groupe B circulantes en Angleterre⁴¹⁷. La comparaison de l'incidence moyenne observée au cours des 4 années précédant la mise en place du programme et de l'incidence observée en 2016 a montré une diminution de 42% du nombre de cas d'IIM de séro groupe B associé à la vaccination.

A ce jour le vaccin Bexsero[®] n'est pas introduit dans le calendrier vaccinal en France, les arguments contre associant un spectre de protection incomplet vis-à-vis des IIM B endémique, un schéma multi-doses complexe à insérer à côté des autres vaccins, une durée de protection *a priori* brève, une absence démontrée d'efficacité sur le portage et donc en termes d'immunités de groupe, un rapport de coût-efficacité défavorable, tandis que l'incidence des IIM B en France est nettement inférieure à celle du Royaume Uni.

Un second vaccin recombinant anti-B a été développé, le vaccin fHbp bivalent rIP2086 (Trumenba[®]), approuvé par l'administration américaine en Octobre 2014 pour les personnes âgées de 10 à 25 ans⁴¹⁸. La protéine fHbp est un facteur de virulence majeur, exprimée par la plupart des souches invasives. Son rôle est de fixer le facteur H humain afin de réduire l'activation de la voie alterne du complément, permettant ainsi au méningocoque de résister à la lyse bactérienne médié par le sérum. Les anticorps induits contre cet antigène ont potentiellement un double rôle dans l'activation des protéines du complément. Ils ont une activité bactéricide directe via l'activation de la voie classique du complément mais ils bloquent également l'effet inhibiteur de la protéine fHpb, permettant ainsi l'activation de la voie alterne du complément. Bien que très diverse, la protéine fHpb peut être divisée en deux sous-familles génétiquement distinctes^{419,420}.

L'efficacité du vaccin fHbp bivalent est donc basée sur les différences antigéniques observées entre les deux sous-familles mais également sur l'immunité croisée observée entre les différents variants de chaque sous-famille. Des études cliniques ont ainsi démontré que ce vaccin induisait la production d'anticorps bactéricides dirigés contre des souches exprimant différents variants antigéniques de la protéine fHbp⁴²¹⁻⁴²³. Des essais cliniques de phase 1 et 2 ont été réalisés chez l'enfant, l'adolescent et l'adulte. Chez l'adolescent et l'adulte, il est parfois observé une réaction au niveau du site d'injection et de la fièvre⁴²⁴⁻⁴²⁸. Au contraire, chez l'enfant, les études se sont terminées prématurément car le vaccin engendrait de la fièvre chez une majorité des patients⁴²⁹⁻⁴³¹.

Compte tenu de ces résultats et des risques chez l'enfant âgé de moins de 10 ans, les essais cliniques de phase 3 et l'efficacité du vaccin rL2086 n'ont été étudiés que chez l'adolescent et l'adulte⁴³². Il n'est donc pas recommandé chez l'enfant et la protection de ce groupe d'âge dépend directement de la capacité de ce vaccin à limiter la transmission entre les personnes vaccinées pour ainsi augmenter l'immunité de groupe, ce qui n'est pour l'instant pas démontré.

Synthèse

Ainsi, l'analyse de la littérature révèle que les IIM de groupe B restent dominantes dans de nombreux pays, en particulier en Europe et en Amérique du Nord. Bien que les incidences soient faibles hors phénomènes épidémiques les IIM notamment B représentent pour autant une cause dominante de mortalité infectieuse chez l'enfant, l'adolescent et l'adulte jeune ainsi que de séquelles très lourdes, maintenant que tant d'autres pathogènes sont contrôlés.

Si les vaccins recombinants très récemment développés représentent une importante avancée dans la prévention des IIM B, ils n'apportent pas une protection universelle vis-à-vis du groupe tandis que leur efficacité sur le portage reste très incertaine et que demeurent beaucoup d'incertitudes sur la durée de protection conférée.

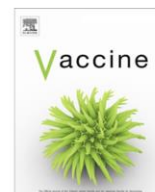
Dans ce contexte les vaccins OMV pourraient garder un intérêt, notamment en situation d'épidémie à clone non ou mal couvert par l'approche recombinante. Cependant deux domaines restent mal cernés pour ces vaccins OMV : la durabilité au long cours de la protection et l'ampleur de celle-ci au-delà de la souche vaccinale.

2.2. Travail personnel

L'utilisation du MenBvac[®] pour le contrôle de l'épidémie « B14 » normande apporta l'opportunité de combler les connaissances dans les deux champs d'incertitudes rappelés plus haut : la durabilité au long cours de la protection et l'ampleur de celle-ci au-delà de la souche vaccinale.

D'où l'étude originale présentée *infra* telle que publiée dans Vaccine (2017 ;35 :4029-4033) puis discutée de façon davantage exhaustive que dans le manuscrit au regard des données de la littérature, avant de tirer quelques perspectives pour ce champ.

2.2.1. Publication dans Vaccine



Durability of immunogenicity and strain coverage of MenBvac, a meningococcal vaccine based on outer membrane vesicles: Lessons of the Normandy campaign



Julien Sevestre^{a,b,c,1}, Eva Hong^{c,1}, Valérie Delbos^{a,b}, Aude Terrade^c, Eric Mallet^{a,b}, Ala-Eddine Deghmane^c, Ludovic Lemée^{a,b}, Muhamed-Kheir Taha^{c,*}, François Caron^{a,b,2}

^a Centre Hospitalier Universitaire, Rouen, France

^b Université de Rouen, France

^c Institut Pasteur, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 July 2016

Received in revised form 22 May 2017

Accepted 23 May 2017

Available online 16 June 2017

Keywords:

Neisseria meningitidis serogroup B

Serum bactericidal activity

Outbreak

Persistence of vaccine response

Invasive meningococcal disease

PorA

Vaccination

ABSTRACT

Objectives: MenBvac[®] is an outer membrane vesicle (OMV)-based meningococcal vaccine. From 2006 to 2012, it was used to control a clonal B outbreak in Normandy (France). We aimed to analyse the durability of the response against the epidemic strain and coverage beyond the vaccine strain. These data should help to optimize the use of OMV-containing vaccines, such as the new 4CMenB/Bexsero[®] recombinant vaccine.

Methods: Serum bactericidal activity (SBA) was measured in two cohorts of children who received their first dose of MenBvac[®] at 1–5 years of age and accepted to provide a blood sample either one or four years after a 2 + 1 + 1 schedule. All sera were tested against the outbreak strain. Sera from responder subjects were also tested against 12 additional B or C strains which were chosen to entirely, partially, or not at all match the two variable regions (VR1 and VR2) of the PorA vaccine strain.

Results: Only 47.9% and 31.3% of subjects showed an SBA titre consistent with protection one and four years, respectively, after the last boost. Protective SBA titres were observed in all sera against B or C strains that entirely matched P1.7,16, and was high (75–100%) for all but one strain that partially matched VR1 or VR2. Extrapolating our data to the OMV component of 4CMenB/Bexsero[®] suggests that 14.5% of the current B strains would be covered based on PorA matching to the OMV component of 4CMenB/Bexsero[®] (regardless of the coverage of the three other vaccine components).

Conclusions: Our data confirm that OMV-based vaccines elicit short-lasting SBA titres and may require repeated booster injections. However, strain coverage may be greater than expected.

© 2017 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Capsular polysaccharide vaccines have been successfully developed against *Neisseria meningitidis* of serogroup A, C, W, and Y. Such an approach is not possible for serogroup B strains due to the homology between the group B capsule and the human neural cellular adhesion molecule, leading to poor immunogenicity and a potential risk of autoimmunity. This is particularly problematical because most invasive meningococcal disease in developed countries is caused by serogroup B strains. Since the 1980s, tailor-made meningococcal B vaccines, based on outer membrane vesicles (OMV), have been developed in response to outbreaks, with campaigns in South Africa, Cuba, Norway, Brazil, Chile, and New Zealand [1]. OMV vaccines elicit an immune response that is mainly directed against the protein porin A (PorA) of the outer membrane which includes two variable regions, VR1 and VR2, with a large diversity for both of them. The response is generally “strain specific” and is not cross-reactive with divergent PorA variants. The last application of an OMV alone-based meningococcal B vaccine was reported in Normandy, France, from 2006 to 2012, where a clonal meningococcal outbreak, due to a strain of serotype 14, sero-subtype P1.7,16 and clonal complex 32 (B:14:P1.7,16/cc32), was controlled using MenBvac[®], a Norwegian vaccine designed in the 1980s against a strain expressing the same PorA variant (B:15:P1.7,16/cc32) [2].

* Corresponding author.

E-mail address: mktaha@pasteur.fr (M.-K. Taha).

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Both authors contributed equally to this work as senior authors.

Since then, multi-component protein-based vaccines that offer broad coverage against group B *N. meningitidis* have been developed. Such new vaccines do not necessarily make former OMV meningococcal vaccines obsolete [3]. The new multi-component protein-based vaccines do not cover all circulating serogroup B isolates. Indeed, 4CMenB/Bexsero[®], the only meningococcal B vaccine available in Europe, has been first evaluated to cover 73–87% of the B strains circulating in different European countries [4]. More recent data have predicted a 66% coverage in the UK [5]. These data imply that a tailor-made OMV vaccine might be requested in the future to control an outbreak due to an uncovered strain. Moreover, OMV have adjuvant properties [6]. They have therefore been included in 4CMenB/Bexsero[®] (using the preparation developed for MenZB, the OMV vaccine used in New Zealand) to increase both the immunogenicity and persistence of the immune response against the other vaccine components. Also, OMV vaccines may provide cross protection against strains that do not express perfectly matching PorA proteins [7–9]. Importantly, antibodies generated by OMV are independent of those targeting the capsule; thus OMV should work against meningococcal strains from different serogroups, providing that they partially or entirely share the PorA of the vaccine strain. Finally, animal experimentation, as well as several clinical studies, suggest that the Norwegian OMV-based vaccine reduces meningococcal carriage and may hence confer herd protection [10,11].

During the Normandy outbreak, we performed two immunogenicity studies [11,12] to evaluate different schedules of MenBvac[®]. Several volunteers accepted to provide blood five years after the first dose to evaluate the durability of the response and the spectrum of coverage by measuring serum bactericidal titres (SBA), not only against the epidemic strain, but also against other B and non-B strains which are currently endemic in the country.

2. Methods

2.1. Serum bactericidal activity

SBA assays were performed using human serum, devoid of meningococcal lysis activity, as a complement source (hSBA) for serogroup B isolates. Baby rabbit complement (rSBA) was used for serogroup C isolates as previously described [2,12]. The serum bactericidal activity titres corresponded to the inverse of the final serum dilution causing 50% killing of the inoculum after 1 h of incubation. A protective immune response was defined by an hSBA titre ≥ 4 or a rSBA titre ≥ 8 , as these titres have been suggested as a surrogate for protection [13,14].

Titres were compared using the percentage of subjects achieving the threshold for protection and by calculating the geometric means of titres (GMT). Data were analyzed using the Chi-squared test, Student's *t*-test, and analysis of variance (ANOVA). A *P* value of <0.05 was considered to be statistically significant. The Bonferroni correction was applied when the Chi-squared test involved several comparisons.

2.2. Durability of immunogenicity against the targeted epidemic strain

The SBA titres against the epidemic clone were analyzed for the two previously assembled cohorts, the first in 2006 from subjects living in the Dieppe area and the second in 2009 from subjects living in the Neufchâtel-en-Bray area [2,12]. Briefly, children were aged 1–5 years at the time of the first MenBvac[®] dose. They were selected by random sampling from all subjects of the same age-range of the area eligible to receive MenBvac[®]. Both cohorts had received a 2 + 1 + 1 schedule. The time of administration of the second boost (i.e., the last dose) differed slightly between the two

cohorts due to a production shortage of the vaccine that required several adaptations of the initially planned scheme [2]. Thus, subjects received MenBvac[®] at D0, W6, M8, and M23 in the Dieppe area, and at D0, W6, M8, and M36 in the Neufchâtel-en-Bray area. Previously enrolled subjects were asked to provide a blood sample four years after the last boost (i.e., at M71) for the Dieppe area [2] and one year after the last boost (i.e., at M50) for the Neufchâtel-en-Bray area [12]. The extension of the former study was approved for both cohorts by the regional ethics committee (Comité de Protection des Personnes Nord-Ouest-1) and written informed consent was obtained from parents or legal guardians of every participant.

2.3. Strain coverage

We evaluated the range of strain coverage by MenBvac[®] by testing a subset of frozen serum samples (collected six weeks after the second boost) of 12 subjects from the Neufchâtel-en-Bray area cohort. The sera came from subjects who responded against strain LNP21362 (B:14:P1.7,16/cc32), which was previously used as a reference strain for SBA assays for the Normandy outbreak [2]. These subjects did not show protective SBA titres before vaccination (D0). Sera were tested against the reference strain (LNP21362), as well as 13 other strains of serogroup B or C harbouring different PorA variable regions (14 SBA tests being the maximal possible due to the low volume of residual serum available for each of these sera). The other 13 strains were selected from B- and C-subgroup strains analyzed in 2015 by the National Reference Centre (NRC) for meningococci. In France, almost all cases of invasive meningococcal disease are biologically confirmed by culture and/or PCR at the NRC. The NRC performs complete genotyping of all strains by multi-sequence locus typing (clonal complex) of PorA and FetA [15]. The 13 strains were selected to represent the different combinations of variable regions, VR1 and VR2, partially matching PorA P1.7,16, that are currently circulating in the country. When the same PorA profile was shared by several strains belonging to different clonal complexes, one strain per clonal complex was selected. Human complement was used for the SBA assay of serogroup B isolates. Baby rabbit complement was used for serogroup C isolates due to the intrinsic meningococcal lysis against these serogroup C strains in all human sera that were used as complement sources.

Finally, the results were extrapolated to the 2015 NRC data to determine the percentage of invasive meningococcal strains currently endemic in the country that completely or partially match the OMV component of MenBvac[®] (P1.7,16) or 4CMenB/Bexsero[®] (P1.7-2, 4).

3. Results

3.1. Durability of immunogenicity against the targeted epidemic strain

Table 1 shows the long-term SBA titres for the two cohorts (last line) and compares them to the results previously reported for each scheme [2,11].

For the Dieppe area cohort, 115 children among the 243 initially included (47%) agreed to participate in the final phase of the study four years after the second boost, amongst which only 31.3% (95% CI 22.8–39.8) had an hSBA titre consistent with protection, whereas the geometric mean hSBA was only 3.3 (95% CI 2.8–3.9). These data are in accordance with the marked decline of hSBA titres previously observed 15 months after the first boost, for which only 56% of subjects showed protective titres.

For the Neufchâtel-en-Bray area cohort, 96 children among the 213 initially included (45%) agreed to participate in the final phase of the study one year after the second boost, amongst which only

Table 1

Immunogenicity of MenBvac[®] vaccine and persistence of the response against B:14:P1.7,16 (strain LNP21362) in two cohorts of children of 1–5 years of age at first dose and previously analyzed at short term.

Dieppe cohort MenBvac at D0-W6-M8-M23				Neufchâtel-en-Bray cohort MenBvac at D0-W6-M8-M36			
Time of sampling	Number	% of subjects with hSBA \geq 4 [95% CI]	GMT of hSBA titres [95% CI]	Time of sampling	Number	% of subjects with hSBA \geq 4 [95% CI]	GMT of hSBA titres [95% CI]
–	–	–	–	D0 ^a	213	10.8 (6.6–15)	2.3 (2.1–2.5)
–	–	–	–	M3	172	41.3 (33.9–48.7)	3.3 (2.9–3.7)
M8 ^a	243	37.0 (30.9–39.8)	2.8 (2.6–2.9)	M8 ^a	159	25.5 (19–32.6)	2.8 (2.5–3.1)
M9.5	235	87.7 (83.5–91.9)	11.3 (9.5–13.4)	M9.5	126	84.1 (77.7–90.5)	10.9 (8.7–13.6)
–	–	–	–	M20	126	39.7 (31.2–48.2)	4.1 (3.4–5)
M23 ^a	193	56.3 (49.2–63.3)	3.9 (3.5–4.5)	–	–	–	–
–	–	–	–	M36 ^a	117	21.4 (14–21.4)	2.7 (2.4–3.1)
–	–	–	–	M37.5	99	86.9 (80.3–93.5)	17.5 (13.2–23.2)
–	–	–	–	M50	96	47.9 (37.9–57.9)	4.4 (3.5–5.5)
M71	115	31.3 (22.8–39.8)	3.28 (2.8–3.9)	–	–	–	–

D = day. W = week. M = month.

^a Sample collected before dose.

47.9% (95% CI 37.9–57.9) showed protective hSBA titres. This percentage, as well as the geometric mean hSBA value (4.4; 95% CI 3.5–5.5), were not significantly different from those previously achieved one year after the first boost (i.e., at M20).

3.2. Strain coverage

The characteristics of the 14 strains studied and the hSBA or rSBA titres achieved against each of them in the sera from 12 (10 for serogroup C due to a limited amount of sera) high responders to MenBvac are presented Table 2.

Among the 14 strains, two (one of serogroup B used as a control and one of serogroup C) completely matched the PorA of MenBvac (P1.7,16) and both belonged to cc32. Nine strains (seven of serogroup B and two of serogroup C) shared either VR1 or VR2 with the vaccine strain or were variants of the P1.7 (VR1) or P1.16 (VR2) family. The last three serogroup B strains had PorA which completely differed from that of the strain vaccine (P1.22, 9, P1.19-2, 13-1 and P1.19-1, 15-11). Ten of the 14 strains (71%) belonged to major hyperinvasive clonal complexes (cc11, cc32, cc41/44, cc269).

As expected, hSBA titres against the serogroup B isolate (LNP21362) that matched the vaccine strain (P1.7,16) were significantly higher than the threshold of 4 for all 12 sera tested, with a lower limit of the 95% CI > 4.

In contrast, the lower limit of the 95% CI of the GMT was lower than the threshold of 4 for the SBA titres against the three isolates (LNP27143, LNP27050 and LNP27000) that did not at all match PorA. One of these strains (LNP27000) did not show coverage in any tested serum. However, 25% and 42% of the volunteers had hSBA titres of 4 and 8 against the other two strains LNP27143 and LNP27050, respectively. Additionally, strain LNP27200, a non-cc32 strain with a partial PorA match (P.21,16-36), also showed a low GMT, with 25% of tested sera displaying hSBA titres of 4.

The GMT and the lower limits of the 95% CI were above 4 for the remaining six B strains. The SBA titres were high in all 12 tested sera for three of the six strains (LNP27338, LNP27087 and LNP27386 all belonged to the cc32) and were not significantly different from those achieved against the reference strain (LNP21362). The hSBA titres differed greatly (depending on the strain) for the three remaining strains (LNP27372, LNP27010 and LNP27114). However, the lower limit of the 95% CI remained higher than 4, although the GMT were significantly lower than those obtained against the reference strain LNP21362.

We also studied three strains of serogroup C, amongst which one entirely matched PorA of MenBvac (LNP25514) and two par-

tially matched (LNP25553 and LNP26251). The rSBA threshold of 8 was achieved against the three C strains in all tested sera. A hierarchy of responses was however observed, with the rSBA titres being significantly higher against the strain which entirely matched the vaccine PorA than the other two serogroup C strains.

The percentages of invasive meningococcal strains predicted to be covered by either MenBvac[®] or 4CMenB/Bexsero[®] based on their PorA variable regions, and regardless their serogroups, are shown in Table 3. For MenBvac[®], only 2.6% of the current French strains totally matched PorA. This putative coverage increased to 16.9% when considering both complete and partially matching (i.e. strains with family 7 VR1 and/or strains with family 16 VR2). For 4CMenB/Bexsero[®], the respective percentages were 8.1% and 14.5%.

4. Discussion

This study was performed in an area of Normandy recently affected by a clonal meningococcal B outbreak that was controlled using MenBvac, an OMV vaccine [2]. The two major results of this study were: (i) the short durability of protection against the targeted strain, despite a four dose vaccination scheme and (ii) an extension of the strain coverage to other B and non-B strains that at least partially shared the PorA of the vaccine strain.

The short persistence of protection was observed even after a second booster dose, although the absence of samples from six weeks after the second booster dose in the Dieppe cohort limits the extrapolation of this conclusion. Several previous studies on OMV vaccines have also reported the rapid decline of SBA titres elicited against the targeted strain [16]. This is not necessarily a major drawback, as such “tailor-made” vaccines are aimed to control an outbreak rather than to offer persistent protection against sporadic events. For the control of a clonal outbreak, two doses of a targeted OMV vaccine given at a 4–6 week interval can be sufficient to “put the fire out” as reported during the first application of MenBvac[®] in Norway [17]. However, because clonal B outbreaks might naturally persist for up to two decades, obtaining immunity for several years in an affected area is probably pertinent. The four-dose MenBvac[®] regimen applied during a two-year period in Normandy resulted in limited persistence of the SBA titres against the outbreak strain (B:14:P1.7,16/cc32) which was observed in less than one third of vaccinated 1–5 year-old children 5 years after the first dose. Such poor results do not necessarily exclude a better response in adolescents and young adults, as shown for other OMV vaccines [18]. The short observed persistence of bactericidal antibodies against B:14:P1.7,16/cc32 (even in the Dieppe area, epicentre of the outbreak) may be due to the rapid decline of the response

Table 2
Immunogenicity of MenBvac[®] vaccine against strains of serogroups B or C in 12 responder subjects. Results are expressed in comparison to reference strains that completely match PorA of the vaccine strain.

Study strain number (LNP)	Genotyping				SBA				p-value
	Group	PorA VR1	PorA VR2	cc	FetA	Range of SBA titres (Proportions of sera with protective titres)	GMT of hSBA titres [95% CI]	GMT [95% CI]	
Serogroup B strains; SBA using human complement (hSBA); protective response for hSBA \geq 4									
Complete match with the vaccine strain									
LNP21362	B	7	16	32	F3-3	16–128 (100%)	107.6	73.5–157.6	Ref [*]
Partial match with the vaccine strain									
LNP27010	B	7–2	4	41/44	F1-5	2–16 (92%)	6.4	4.3–9.4	0.0005
LNP27087	B	7	16–26	32	F3-3	32–128 (100%)	114	88.4–147.1	> 0.99
LNP27114	B	7–2	4	162	F5-9	2–128 (75%)	15.1	5.9–39	0.002
LNP27338	B	7–2	16–26	32	F3-3	128–128 (100%)	128	128–128	> 0.99
LNP27372	B	7–1	1	32	F3-3	2–128 (92%)	24	9.7–59.5	0.00195
LNP27200	B	21	16–36	865	F5-8	2–4 (25%)	2.4	1.9–2.9	0.0005
LNP27386	B	21	16	41/44	F1-7	128–128 (100%)	128	128–128	> 0.99
No match with the vaccine strain									
LNP27000	B	19–1	15–11	269	–	2–2 (0%)	2	2–2	0.0005
LNP27050	B	19–2	13–1	461	–	2–8(42%)	4	2.1–7.5	< 0.0001
LNP27143	B	22	9	269	F1-5	2–8 (25%)	2.7	1.9–3.8	0.0005
Serogroup C strains; SBA using rabbit complement (rSBA); protective response for rSBA \geq 8									
Complete match with the vaccine strain									
LNP25514	C	7	16	32	F3-3	16–512 (100%)	64	26.7–153.2	Ref ^{**}
Partial match with the vaccine strain									
LNP25553	C	17	16–3	11	F1-1	16–32 (100%)	18.4	14.9–22.7	0.016
LNP26251	C	21–7	16	1157	F5-36	64–512 (100%)	161.3	59.7–435.8	0.019

* Significance level $p < 0.005$ after Bonferroni correction for 10 comparisons.

** Significance level $p < 0.025$ after Bonferroni correction for 2 comparisons.

Table 3
Percentage of current invasive meningococcal strains in France that are expected to be covered by either MenBvac[®] or 4CMenB/Bexsero[®] based on their PorA domain (for 4CMenB/Bexsero[®] the coverage is largely enhanced by the three other components of the vaccine).

	2015 French <i>N. meningitidis</i> isolates with complete typing available (n = 344)					
	Matching with the P1.7,16 PorA antigen of MenBvac			Matching with the P1.7–2,4 PorA antigen of 4CMenB/Bexsero		
	Complete	Incomplete	Null	Complete	Incomplete	Null
B strains (n = 170)	8 (4.7%)	45 (26.5%)	117 (68.8%)	28 (16.5%)	21 (12.4%)	121 (71.1%)
Strains of other groups (n = 174)	1 (0.6%)	4 (2.3%)	169 (97.1%)	0 (0%)	1 (0.6%)	173 (99.4%)
Total (n = 344)	9 (2.6%)	49 (14.3%)	286 (83.1%)	28 (8.1%)	22 (6.4%)	294 (85.5%)

to the vaccine and the lack of natural immunity favoured by a very low rate of pharyngeal carriage of the epidemic strain in the population, as reported by a carriage study performed at the height of the outbreak [10].

The broader strain coverage of MenBvac[®] is relevant in meningococcal vaccinology as the 4CMenB/Bexsero[®] vaccine includes an OMV component. OMV-based vaccines elicit an immune response that is mainly directed against the PorA outer membrane protein. Due to the high variability of PorA among isolates, this type of vaccine is classically considered strain-specific [19]. However, several previous studies with MenBvac[®] [8,9,18,20] and other OMV vaccines [7,9,18,20] have reported protection beyond the vaccine strain. Rosenqvist et al. have shown that MenBvac[®] induced in adult volunteers significant SBA response against variants of the vaccine strain lacking some outer membrane proteins [8]. The Norwegian Institute of Public Health team had performed a study in adult volunteers comparing the immunogenicity of MenBvac[®] (P1.7,16 strain) and MeNZB[®] (P1.7-2,4 strain) showing that SBA titres were better against the homologous strain than with the heterologous strain [9,20]. Tappero et al. have reported that both MenBvac (P1.7,16 strain) and the Finlay

Institute OMV vaccine (P1.15 strain) did not induce significant response in infants while children and adults showed SBA titres against a heterologous strain but to a lesser extent than to the vaccine homologous strain [18]. Boutriau et al. have analyzed a bivalent OMV vaccine designed to cover a large proportion of B strains circulating in Europe that induced increased SBA titres against the two vaccine strains as well as against three heterologous strains but this vaccine did not reach the market [7]. Our study provides additional data, suggesting that strain coverage can be larger than initially expected. Completely or partially matching one of the two variable regions of PorA (VR1 and VR2) may lead to coverage by the MenBvac[®] irrespective of the serogroup. However, SBA titres were significantly higher when both VR1 and VR2 matched the vaccine, suggesting synergism of serum bactericidal activity against these variable regions. Further studies may be needed to explore how the alterations of VR regions affect serum bactericidal activity. Moreover, other minor proteins in the OMV can confer protection, as suggested by the SBA titres against the strain LNP27050 that did not match variable regions of PorA P1.7,16. This part of the study had however three limitations. (i) Due to low volumes of residual serum available, it was impossible for a given strain to test all sub-

variants in terms of VRs; all sub-variants of P1.7,16 may not be covered and testing several other strains may be required. (ii) It was also impossible to evaluate the protection at baseline against the tested strains. However, we have previously reported low level of protective SBA titres against the strain with P1.7,16 before the first dose of MenBvac[®] [12]. (iii) The broader of coverage has been studied only for MenBvac[®]; it is not excluded that results may differ for other OMV based vaccines.

The strain coverage by 4CMenB/Bexsero[®] has been extensively studied for the three proteins NadA, fHbp, and NHBA, but much less for its fourth component, corresponding to PorA P1.7-2, 4 from MenZB[®] [21]. Previous reports have suggested that the VR1 region (7-2) of PorA was poorly recognised by a monoclonal antibody against subtype P1.7 due to an internal deletion, leading to masking of this region [22]. However, our study shows that polyclonal anti-PorA antibodies, obtained after vaccination in several subjects, achieved SBA titres against the two strains (LNP27010 and LNP27114) that only had VR1 7-2. The potential protection against non-B strains, as suggested by our data, is of interest, as this is expected to enlarge strain coverage. Such protection was suggested in reports on the use of 4CMenB[®] against serogroups W and X [23,24]. The subjects of our study were not vaccinated against serogroup C meningococci when MenBvac[®] vaccination started. Indeed, the recommendation for vaccination against MenC only started in France in 2010. The uptake of the vaccine remains very low in France and vaccine coverage in 1–4 year olds was only 50% by the end of 2013 [25].

Based on the 2015 database from the NRC, 14.5% of the current serogroup B strains are predicted to be covered by the OMV component of 4CMenB/Bexsero[®] (regardless of the coverage by the three other components of the vaccine). The Meningococcal Antigen Typing system (MATS) predicted 85% coverage of the serogroup B isolates in France. Importantly, among the 15% (n = 30) of uncovered strains, 13% (n = 4) could be covered on the basis of partial matching with PorA [4]. Thus, strain coverage could be higher than that predicted solely by MATS.

In conclusion, the results of the current study show that OMV-containing vaccines induce immunity, although of short duration, far below that of the vaccine strain. This argues for adapting the OMV component from new meningococcal vaccines to improve the coverage of local strains, particularly in the event of outbreaks that may not be covered by the other components of the vaccines.

Conflict of interest

The Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported the Institut Pasteur and Rouen University Hospital. JS receives a fellowship from the Conseil Régional de Haute Normandie. We thank Marie-Noelle Ungeheuer (Institut Pasteur-ICAREB) for supply of human serum samples for complement sources.

References

- [1] Sadarangani M, Pollard AJ. Serogroup B meningococcal vaccines—an unfinished story. *Lancet Infect Dis* 2010;10:112–24.

- [2] Caron F, du Chatelet IP, Leroy JP, Ruckly C, Blanchard M, Bohic N, et al. From tailor-made to ready-to-wear meningococcal B vaccines: longitudinal study of a clonal meningococcal B outbreak. *Lancet Infect Dis* 2011;11:455–63.
- [3] Stephens DS. Outer-membrane-vesicle vaccines: old but not forgotten. *Lancet Infect Dis* 2011;11:421–2.
- [4] Vogel U, Taha MK, Vazquez JA, Findlow J, Claus H, Stefanelli P, et al. Predicted strain coverage of a meningococcal multicomponent vaccine (4CMenB) in Europe: a qualitative and quantitative assessment. *Lancet Infect Dis* 2013;13:416–25.
- [5] Medini D, Stella M, Wassil J. MATS: Global coverage estimates for 4CMenB, a novel multicomponent meningococcal B vaccine. *Vaccine* 2015;33:2629–36.
- [6] Nagaputra JC, Rollier CS, Sadarangani M, Hoe JC, Mehta OH, Norheim G, et al. *Neisseria meningitidis* native outer membrane vesicles containing different lipopolysaccharide glycoforms as adjuvants for meningococcal and nonmeningococcal antigens. *Clin Vaccine Immunol* 2014;21:234–42.
- [7] Boutriaud D, Poolman J, Borrow R, Findlow J, Domingo JD, Puig-Barbera J, et al. Immunogenicity and safety of three doses of a bivalent (B:4:p1.19,15 and B:4:p1.7-2.4) meningococcal outer membrane vesicle vaccine in healthy adolescents. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:65–73.
- [8] Rosenqvist E, Hoiby EA, Wedege E, Bryn K, Kolberg J, Klem A, et al. Human antibody response to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine. *Infect Immun* 1995;63:4642–52.
- [9] Wedege E, Bolstad K, Aase A, Herstad TK, McCallum L, Rosenqvist E, et al. Functional and specific antibody responses in adult volunteers in New Zealand who were given one of two different meningococcal serogroup B outer membrane vesicle vaccines. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:830–8.
- [10] Delbos V, Lemee L, Benichou J, Berthelot G, Taha MK, Caron F. Meningococcal carriage during a clonal meningococcal B outbreak in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:1451–9.
- [11] Delbos V, Lemee L, Benichou J, Berthelot G, Deghmane AE, Leroy JP, et al. Impact of MenBvac, an outer membrane vesicle (OMV) vaccine, on the meningococcal carriage. *Vaccine* 2013;31:4416–20.
- [12] Caron F, Delbos V, Houivet E, Deghmane AE, Leroy JP, Hong E, et al. Evolution of immune response against *Neisseria meningitidis* B:14:P1.7,16 before and after the outer membrane vesicle vaccine MenBvac. *Vaccine* 2012;30:5059–62.
- [13] McIntosh ED, Broker M, Wassil J, Welsch JA, Borrow R. Serum bactericidal antibody assays – the role of complement in infection and immunity. *Vaccine* 2015;33:4414–21.
- [14] Borrow R, Balmer P, Miller E. Meningococcal surrogates of protection—serum bactericidal antibody activity. *Vaccine* 2005;23:2222–7.
- [15] Jolley KA, Chan MS, Maiden MC. mlstdbNet – distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinform* 2004;5:86.
- [16] McQuaid F, Snape MD, John TM, Kelly S, Robinson H, Yu LM, et al. Persistence of specific bactericidal antibodies at 5 years of age after vaccination against serogroup B meningococcus in infancy and at 40 months. *CMAJ* 2015;187:E215–23.
- [17] Bjune G, Hoiby EA, Gronnesby JK, Arnesen O, Fredriksen JH, Halstensen A, et al. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet* 1991;338:1093–6.
- [18] Tappero JW, Lagos R, Ballesteros AM, Plikaytis B, Williams D, Dykes J, et al. Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. *Jama* 1999;281:1520–7.
- [19] Holst J, Feiring B, Naess LM, Norheim G, Kristiansen P, Hoiby EA, et al. The concept of “tailor-made”, protein-based, outer membrane vesicle vaccines against meningococcal disease. *Vaccine* 2005;23:2202–5.
- [20] Thornton V, Lennon D, Rasanathan K, O’Hallahan J, Oster P, Stewart J, et al. Safety and immunogenicity of New Zealand strain meningococcal serogroup B OMV vaccine in healthy adults: beginning of epidemic control. *Vaccine* 2006;24:1395–400.
- [21] Sexton K, Lennon D, Oster P, Crengle S, Martin D, Mulholland K, et al. The New Zealand Meningococcal Vaccine Strategy: a tailor-made vaccine to combat a devastating epidemic. *N Z Med J* 2004;117:U1015.
- [22] Wedege E, Dalseg R, Caugant DA, Poolman JT, Froholm LO. Expression of an inaccessible P1.7 subtype epitope on meningococcal class 1 proteins. *J Med Microbiol* 1993;38:23–8.
- [23] Ladhani SN, Giuliani MM, Biolchi A, Pizzi M, Beebeejaun K, Lucidarme J, et al. Effectiveness of Meningococcal B vaccine against endemic hypervirulent *Neisseria meningitidis* W strain, England. *Emerg Infect Dis* 2016;22:309–11.
- [24] Hong E, Giuliani MM, Deghmane AE, Comanducci M, Brunelli B, Dull P, et al. Could the multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB) control *Neisseria meningitidis* capsular group X outbreaks in Africa? *Vaccine* 2013;31:1113–6.
- [25] Barret A-S, Parent du Châtelet I, Deghmane A-E, Lepoutre A, Fonteneau L, Maine C, et al. Invasive meningococcal disease in France. *Bull Epidemiol Hbd* 2012;2014:25–31.

2.2.2. Discussion des vaccins OMV

Le présent travail a donc été mené grâce aux bibliothèques constituées avec deux cohortes de patients vaccinés par le MenBvac[®], les uns prélevés dans la zone de Dieppe pour la dernière fois 4 ans après la 4^{ème} dose, les autres dans la zone de Neufchâtel-en-Bray pour la dernière fois 1 an après la 4^{ème} dose, tous ces sujets étant âgés de 1 à 5 ans au moment de la primovaccination.

Les deux principaux enseignements furent d'une part, une durabilité en moyenne brève de l'effet vaccinal même après un second rappel et d'autre part, une protection vis-à-vis de bien d'autres souches que le clone vaccinal initialement ciblé. Chacun de ces points va être discuté au regard des données de la littérature OMV, avant une perspective intégrant d'autres caractéristiques de ces vaccins.

2.2.2.1. Durabilité de la protection conférée par les vaccins OMV

Schématiquement, le vaccin MenBvac[®] a apporté en Normandie vis-à-vis de la souche B:14:P1.7,16 épidémique une protection concernant une moitié des enfants 1 an après le second rappel et un tiers 4 ans après cette dernière dose. Après un rappel sur les concepts d'efficacité vaccinale, ces résultats méritent d'être discutés au regard des données de la littérature obtenus avec le même vaccin MenBvac[®] lors de son utilisation princeps en Norvège ainsi qu'avec les autres vaccins à composante OMV principale. En d'autres termes il n'est pas possible d'intégrer là les données du Bexsero[®] qui connaît à côté de la composante OMV « néo-zélandaise » trois autres constituants contribuant aussi à la protection conférée.

Critères d'analyse de l'activité vaccinale : efficacité (« efficacy ») versus immunogénicité (« effectiveness »)

L'efficacité vaccinale recouvre deux notions nettement différentes : l'efficacité (sous-entendue clinique, dénommée « effectiveness » en langue anglaise) et l'immunogénicité (c'est-à-dire l'efficacité immunologique dénommée « efficacy » en langue anglaise).

Le bénéfice vaccinal peut de fait être validé cliniquement, à travers la diminution d'incidence de la pathologie ciblée ; c'est donc le concept de l'« effectiveness ». De telles démonstrations sont les plus robustes, mais aussi les plus difficiles à acquérir, impliquant une vaccination à large échelle et/ou une incidence élevée de la pathologie ciblée.

Dans certains cas, le programme est appliqué comparativement à un bras contrôle (placebo, autre vaccin par ailleurs indiqué ou encore zone limitrophe connaissant la même épidémiologie mais laissée non traitée), ce qui ajoute à la robustesse. Dans d'autres cas, le bénéfice du vaccin est évalué comparativement à des données historiques (habituellement la période précédant immédiatement l'introduction du programme vaccinal) ; dans ce cas l'« effectiveness » peut être plus délicate à apprécier du fait des fluctuations épidémiologiques naturelles, de sorte que la conclusion ne peut parfois qu'être très prudente : « baisse d'incidence en coïncidence avec la vaccination » sans nécessairement pouvoir affirmer la causalité. Pour les IIM, les exemples de démonstration d'une « effectiveness » ne manquent pas : contrôle des IIM C en Angleterre après l'introduction du vaccin C conjugué³⁰⁸; quasi disparition très récente des IIM A au Sahel après l'implémentation de MenAfricVac, avec dans la première expérience au Tchad une forme de cas-contrôle entre les régions traitées (districts de N'Djamena) et celles qui ne purent l'être⁴³³; baisse très récente des IIM B du jeune enfant au Royaume-Uni après l'implémentation du Bexsero® dans le calendrier vaccinal du nourrisson (à 2 mois et 4 mois de vie) faisant conclure à une « effectiveness » de 83% comparativement aux 4 années antérieures (où seule la vaccination C était appliquée)⁴¹⁷.

La durée de l'efficacité clinique imputée directement au vaccin n'est pas toujours aisée à établir du fait des tendances épidémiologiques naturelles ou dans des régions limitrophes pouvant avoir un impact sur la zone concernée. Par exemple, l'incidence des IIM C a nettement baissée en Europe sur la période 2011-2015, avec une incidence désormais à peine inférieure dans les pays de l'ECDC ayant un programme d'immunisation systématique en population générale comparativement à ceux qui s'en abstiennent, pouvant suggérer un « effet troupeau » trans-frontalier.

L'efficacité vaccinale peut aussi être appréciée sérologiquement, à travers la quantification du taux d'anticorps bactéricides sériques (SBA) vis-à-vis des souches ciblées, puisqu'il existe globalement un bon « corrélat de protection » ; c'est le concept de l'immunogénicité (ou « efficacy » en langue anglaise). Les études en ce sens sont bien plus nombreuses, car bien davantage aisées à réaliser et ceci aux différentes phases de mise au point d'un nouveau vaccin puis lors des révisions des schémas vaccinaux (élargissement de la tranche d'âge ciblé, modification du nombre de doses pour la primo-vaccination ou les rappels).

Les essais cliniques en vaccinologie combinent ces deux approches d'efficacité et d'immunogénicité, se déroulant par ailleurs comme pour les autres produits de santé de manière prospective et rétrospective en quatre phases. La phase 1 est réalisée sur un petit effectif (habituellement 10 à 100 personnes) et correspond à une première administration chez l'homme adulte et en bonne santé de la formulation vaccinale à tester (même si le vaccin est destiné à un groupe d'âge différent). Elle permet d'étudier l'innocuité, la tolérance locale et systémique (effets indésirables) et d'obtenir des résultats d'immunogénicité préliminaires selon différents schémas administrés. La phase 2 est réalisée sur un effectif plus conséquent (souvent 50 à 500 personnes) afin d'étudier les mêmes paramètres mais cette fois-ci selon le nombre de doses retenues (schéma vaccinal) et point majeur, au sein de la population ciblée. La phase 3 est réalisée en situation réelle chez plusieurs milliers de personnes afin d'étudier l'efficacité vaccinale et la tolérance à grande échelle. Enfin, la phase 4 correspond aux différentes études réalisées après la mise sur le marché du vaccin. Cette dernière phase permet de vérifier à l'échelle de la population générale que l'innocuité et l'efficacité du vaccin sont assurées mais également de contrôler l'absence d'effets indésirables sur le long terme.

Ainsi la protection vaccinale est considérée selon deux types de données principales, les résultats prédictifs utilisés pour estimer l'immunogénicité des vaccins grâce à différents marqueurs supposés refléter l'efficacité au sein de la population générale (phase 1 et 2) et les résultats rétrospectifs d'efficacité considérés pour évaluer la qualité de la protection sur une large population avant et après la mise sur le marché (phase 3 et 4). Néanmoins, la faible incidence des IIM rend difficile la mise en place des essais cliniques de phase 3, en particulier l'étude de l'efficacité vaccinale (au sens « effectiveness ») car cela nécessite l'observation d'un grand nombre de sujets vaccinés et la survenue d'IIM comme base de comparaison. Par conséquent, en l'absence d'étude de ce type, l'autorisation de mise sur le marché de certains vaccins a été principalement approuvée sur l'immunogénicité (ou « efficacy »). Ce fut notamment le cas lors de l'introduction du vaccin conjugué dirigé contre le sérotype C en Angleterre en 1999, du vaccin OMV néo-zélandais en 2004 et récemment pour les vaccins Bexsero® et Trumenba® en Europe et aux Etats Unis d'Amérique.

Ce corrélat de protection est établi depuis la fin des années 1960 sur la base des travaux de Goldschneider *et al*^{52,59}. Néanmoins, comme souligné par Goldschneider dès son étude princeps, un titre SBA inférieur au seuil considéré comme protecteur ne permet pas d'exclure totalement une réponse immunitaire dirigée contre la ou les souches ciblées.

En effet, l'activité bactéricide du sérum n'est pas le seul mécanisme de défense de l'hôte intervenant au cours de la réponse immunitaire. Ainsi, d'autres marqueurs ont été explorés comme par exemple le rôle de l'opsonisation et de la phagocytose dans la réponse immunitaire^{434,435}. Néanmoins, ces marqueurs sont pour l'instant peu corrélés avec l'efficacité vaccinale et non pas remplacés les tests SBA. Ainsi, malgré certaines limites d'évaluation, le test SBA reste aujourd'hui l'approche de substitution la plus couramment utilisée, y compris en vue des dossiers d'agrément des nouveaux vaccins ou nouveaux schémas vaccinaux.

Méthodologie des tests SBA

Sur le plan technique, les tests SBA permettent de quantifier spécifiquement l'activité bactéricide du sérum médié par les anticorps circulants, aussi bien naturels qu'induits par la vaccination. Les protéines du complément des sérums à tester sont au préalable inactivées pour supprimer toute activité bactéricide du complément propre à chaque individu pouvant biaiser les résultats. Pour l'analyse, les sérums sont supplémentés avec une source de complément externe dépourvue d'activité lytique qui doit être au possible standardisé pour une même série d'échantillon. La présence d'anticorps sériques dirigés contre le méningocoque active les protéines du complément et entraîne la lyse bactérienne. Pour quantifier cette activité lytique, les sérums sont dilués en série et mis en présence de l'inoculum bactérien calibré. Le titre bactéricide du sérum est déterminé par l'inverse de la dilution à laquelle au moins 50% de l'inoculum bactérien de départ est lysé après 1 heure d'incubation. En présence de complément humain (hSBA), le seuil réputé protecteur recherché correspond à un titre $\geq 4^{59}$. En pratique, il peut toutefois être difficile de recueillir une source unique de complément humain en quantité suffisante pour réaliser l'ensemble des tests requis pour une étude donnée, tandis que se posent des questions de standardisation de technique, de comparaison inter-laboratoires et même intra-laboratoire pour des souches différentes⁴³⁶. Au cours de sa vie, chaque personne va rencontrer et héberger différentes souches de méningocoque et se constituer un panel d'anticorps protecteurs. Plusieurs facteurs incluant la souche rencontrée, la durée du portage et le délai entre le portage et le don de sérum vont déterminer la spécificité, la quantité et l'affinité des anticorps présents. Cela implique que les sources externes de complément humain utilisées pour les essais SBA varient d'un individu à un autre d'où la nécessité de vérifier l'absence d'activité bactéricide de ces sérums.

Pour pallier en partie à ces problèmes, la méthode a été adaptée en utilisant du complément de lapin comme substituant (rSBA)⁴³⁷. Dans ce cas, le seuil réputé protecteur est établi pour un titre ≥ 8 ⁴³⁸. Cependant, l'utilisation de complément de lapin n'est pas adaptée à l'étude du séro groupe B car chez l'Homme les polysaccharides B interfèrent avec les protéines du complément, principalement avec le facteur H et protège la bactérie de la lyse cellulaire. Cette interaction n'est pas retrouvée avec les protéines du complément de lapin ce qui entraîne par rSBA des titres bien supérieurs à ceux obtenus par hSBA et la corrélation entre ces 2 méthodes est impossible⁴³⁹. Par ailleurs, l'utilisation du complément de lapin pour les tests SBA vis-à-vis du séro groupe C comporte également ce biais, même si dans ce cas une corrélation semble applicable. En effet, il a par exemple été démontré que la protéine de liaison au facteur H du méningocoque qui joue un rôle majeur dans l'inhibition de la cascade d'activation du complément ne fixe pas le facteur H de lapin, ce qui entraîne potentiellement une surestimation de l'activité bactéricide des sérums testés⁴⁴⁰. A noter que dans certaines études l'immunogénicité est évaluée selon une multiplication du titre SBA pré-vaccinal de 4. Dans ce cas, si le titre SBA pré-vaccinal est ≥ 4 , le seuil réputé protecteur est considéré pour un titre post-vaccinal ≥ 8 .

L'utilisation du titre SBA comme marqueur prédictif de l'efficacité vaccinale a été tout d'abord appliqué aux vaccins polysidiques. Il a été ensuite démontré que cette corrélation s'applique également aux vaccins OMV⁴⁴¹. D'autres technique que le SBA ont pu être utilisées par le passé pour la quantification des anticorps sériques : tests d'agglutination, méthode ELISA. Cependant elles ne seront pas détaillées ici, car mal codifiées, sans corrélation bien établie avec la protection clinique, et donc ne se prêtant pas à une comparaison avec les autres études. De tout cela découle la justification de la méthode ici retenue : étude assimilable à une phase 4 (même si MenBvac[®] n'est pas commercialisé, il disposait d'un dossier scientifique et administratif proche de ceux versés pour une autorisation de mise sur le marché, ceci sur la base de l'utilisation antérieure à large échelle en Norvège) ; cohorte de chacune environ deux cents patients à l'inclusion effective afin de limiter les intervalles de confiance des résultats ; étude d'immunogénicité par quantification du titre SBA vis-à-vis de la souche prototype de l'épidémie normande ainsi que vis-à-vis de souches hétérologues (cf *infra*) ; recours au complément humain pour les souches B (hSBA) puisque seule technique là possible ; recours au complément de lapin (rSBA) pour tester les souches C et épargner d'autant les ressources humaines ; pour chaque point, analyse du pourcentage de sujets dépassant le seuil réputé corrélé à la protection.

Tableau 2 : Résumé des principales campagnes vaccinales OMV de par le monde et études d'efficacité correspondantes

Pays (Année)	Tranche d'âge	Schéma vaccinal	Immunogénicité / efficacité
VA-MENCOG-BC (Finlay Institute), OMV B:4:P1.15, polysaccharides C et protéines d'enveloppes			
Cuba (1987-1989) (268)	10-14 ans	2 (J0-S6/S8)	Sur 106 251 sujets, efficacité estimée à 83% [42-95] de 6 semaines à 16 mois
Brésil (Sao Paulo) (1989-1991) (273)	3-23 mois	2 (J0-S6/M3)	Sur 512 sujets au total, efficacité estimée à : -37% [-100-73] pour les 3-23 mois, période d'observation non renseignée 47% [-72-85] pour les 24-47 mois, période d'observation non renseignée 74% [16-92] pour les 48-83 mois, période d'observation non renseignée
	24-47 mois		
	4-7 ans		
Brésil (Rio de Janeiro) (1990-1991) (442)	6-23 mois	2 (J0-S6)	Sur 554 sujets au total, efficacité estimée à : 41% [-96-82] pour les 6-23 mois, de 2,5 mois à 14,5 mois 14% [-165-73] pour les 24-47 mois, de 2,5 mois à 14,5 mois 71% [34-87] pour les 4-9 ans, de 2,5 mois à 14,5 mois
	24-47 mois		
	4-9 ans		
Vaccin experimental (Walter Reed Army Institute of Research), OMV B:15:P1.3 et polysaccharides C			
Chili (Iquique) (1987-1989) (393)	1-4 ans	2 (J0-S6)	Sur 9 247 sujets, efficacité estimée à -23% [<-100-73] sur 30 mois
	5-21 ans		Sur 31 547 sujets, efficacité estimée à 69% [14-91] sur 30 mois
	1-21 ans		Sur 40 794 sujets, efficacité estimée à 51% [-11-80] sur 30 mois
MenBvac (Norwegian Institute of Public Health), OMV B:15:P1.7,16			
Norvège (1988-1991) (334,441,443)	13-14 ans	2 (J0-S6)	Sur 171 800 sujets, efficacité estimée à : 87% de 6 semaines à 10 mois 59% de 11 mois à 20 mois 30% de 21 mois à 29 mois 57% de 6 semaines à 29 mois
		2 (J0-S6)	Sur 880 sujets, immunogénicité estimée à : 97% 6 semaines après 2 ^{ème} dose (M3) 32% 12 mois après 2 ^{ème} dose (M13,5) 42% 24 mois après 2 ^{ème} dose (M25,5)
		2+1 (J0-S6-M11,5)	Sur 374 sujets, immunogénicité estimée à : 77% 6 semaines après 2 ^{ème} dose (M3) 35% 10 mois après 2 ^{ème} dose (M11,5) 96% 6 semaines après 3 ^{ème} dose (M13) 85% 12 mois après 3 ^{ème} dose (M23,5)
	13-15 ans	3+1 (J0-S6-M3-M13)	Sur 374 sujets, immunogénicité estimée à : 53% [46-59] 6 semaines après 2 ^{ème} dose (M3) 65% [58-71] 6 semaines après 3 ^{ème} dose (M4,5) 28% [22-35] 10 mois après 3 ^{ème} dose (M13) 93% [88-96] 6 semaines après 4 ^{ème} dose (M14,5) 64% [57-71] 12 mois après 4 ^{ème} dose (M25)

Comparaison des données normandes à celles de la littérature OMV

Le tableau 2 présente un synopsis des principales études réalisées de par le Monde depuis l'introduction des vaccins OMV et focalise sur le pourcentage de sujets réputés protégés au dernier prélèvement disponible par rapport à l'ensemble du schéma administré.

En fonction des études, les résultats sont donc exprimés selon l'immunogénicité ou l'efficacité (sous entendue clinique : effectiveness). Ce panorama souligne d'abord la diversité des cohortes, aussi bien sur le plan géographique que de tranches d'âges vaccinées, et de schéma vaccinal à la fois en termes de nombre total de doses (de 2 à 4), de durée totale du schéma (1^{ère} et dernière doses espacées de 23 à 36 mois) avec pour les schémas à quatre doses soit un seul rappel (« 3+1 ») ou deux rappels (« 2+1+1 ») comme ici en Normandie. Tout ceci s'explique par des programmes vaccinaux relativement expérimentaux, même s'ils ont pu beaucoup bénéficier aux populations ciblées comme en Normandie : production vaccinale limitée, pas nécessairement par un industriel du médicament, schémas parfois contraints par la disponibilité en dose, rappels additionnés au fil de la surveillance.

Le vaccin cubain produit par l'institut de Finlay et nommé VA-MENCOG-BC, fut le premier OMV à avoir été utilisé pour une campagne vaccinale de masse. Il s'agissait d'un vaccin dirigé contre une souche de profil B:4:P1.19,15.

Développé en réponse à une épidémie clonale survenue à la fin des années 1970 (tableau 2), il fut introduit en 1987 selon un schéma à deux doses (J0-S6)²⁶⁸. Comme résumé dans le tableau 2 son efficacité a été estimée sur une cohorte de 100 000 sujets âgés de 10 à 14 ans au cours d'une période de 16 mois à 83%. Une diminution drastique de l'incidence a été observée dans le pays quelques années seulement après le début de cette campagne. Il faut cependant noter qu'à l'image d'autres situations épidémiques, l'incidence du séro groupe B dans le pays était en déclin les années précédant cette campagne. Le caractère cyclique des épidémies d'IIM est bien décrit et repose sur plusieurs facteurs. L'émergence et la diffusion d'une souche épidémique au sein d'une population naïve entraîne une augmentation drastique de l'incidence. Bien que l'infection invasive ne participe pas à l'évolution épidémique, le portage asymptomatique de la souche causale entraîne la production d'anticorps protecteurs et une modification de la susceptibilité au sein de la population générale. Ainsi, cette situation présente plusieurs zones d'ombre.

Tableau 2 (suite) : Résumé des principales campagnes vaccinales OMV de par le monde et études d'efficacité correspondantes

Pays (Année)	Tranche d'âge	Schéma vaccinal	Immunogénicité / efficacité
MenBvac (Norwegian Institute of Public Health), OMV B:15:P1.7,16			
France (Dieppe) (2006-2008) (318)	1-5 ans	2+1+1 (J0-S6-M8-M23)	Sur 243 sujets vaccinés, immunogénicité estimée à : 37% [31-43] 6,5 mois après 2 ^{ème} dose (M8) 88% [86-90] 6 semaines après 3 ^{ème} dose (M9,5) 56% [49-63] 15 mois après 3 ^{ème} dose (23) 31% [23-40] 48 mois après 4 ^{ème} dose (M71)
	0-19 ans		Sur 46 970 sujets de 0-19 ans, efficacité estimée au cours de la période de vaccination primaire entre juillet 2006 et juin 2008 à 53% [-11-83] Sur 50 884 sujets de 0-19, efficacité estimée après la période de vaccination primaire entre juillet 2008 et aout 2010 à 81% [39-86]
	≥20 ans		Sur 201 008 sujets ≥20 ans, efficacité estimée après la période de vaccination primaire à 100% [-8-100]
France (Neufchâtel-en-Bray) (2009-2011) (444)	1-5 ans	2+1+1 (J0-S6-M8-M36)	Sur 218 sujets vaccinés, immunogénicité estimée à : 41% [34-49] 6 semaines après 2 ^{ème} dose (M3) 26% [19-33] 6,5 mois après 2 ^{ème} dose (M8) 84% [78-91] 6 semaines après 3 ^{ème} dose (M9,5) 40% [31-48] 12 mois après 3 ^{ème} dose (M20) 21% [14-21] 28 mois après la 3 ^{ème} dose (M36) 87% [80-94] 1,5 mois après la 4 ^{ème} dose (M37,5) 48% [38-58] 14 mois après la 4 ^{ème} dose (M50)
MeNZB (Novartis Vaccines and Norwegian Institute of Public Health), OMV B:4:P1.7-2,4			
Nouvelle Zélande (2004-2008) (296,445-447)	6 mois à 5 ans	3 (J0-S6-M3)	Sur 160 870 sujets vaccinés, efficacité estimée à 80% [52,5-91,6] sur 24 mois après la 3 ^{ème} dose
	6-10 semaines	3+1 (J0-S6-M3-M7/M10)	Sur 239 sujets vaccinés, immunogénicité estimée à : 76% [70-81] 6 semaines après la 3 ^{ème} dose (M4,5) 27% [15-42] 4-5 mois après la 3 ^{ème} dose (M7-8) 82% [68-92] 6 semaines après la 4 ^{ème} dose (M8,5-11,5)
	6-8 mois		Sur 211 sujets vaccinés, immunogénicité estimée à : 88% [81-91] 6 semaines après la 2 ^{ème} dose (M3) 92% [87-95] 6 semaines après la 3 ^{ème} dose (M4,5) 28% [15-44] 7 mois après la 3 ^{ème} dose (M10)
	16-24 mois	Sur 248 sujets vaccinés, immunogénicité estimée à : 84% [78-89] 6 semaines après la 2 ^{ème} dose (M3) 92% [87-95] 6 semaines après la 3 ^{ème} dose (M4,5) 34% [20-51] 16 mois après la 3 ^{ème} dose (M19) 3% [0,1-17] 11 mois après la 3 ^{ème} dose pour les sujets sans titre SBA multiplié par 4 à 6 semaines après la 3 ^{ème} dose (M14) 34% [20-51] 16 mois après la 3 ^{ème} dose pour les sujets avec un titre SBA multiplié par 4 à 6 semaines après la 3 ^{ème} dose (M19) 100% [88-100] 6 semaines après la 4 ^{ème} dose pour les sujets sans titre SBA multiplié par 4 à 6 semaines après la 3 ^{ème} dose (M8,5-11,5) 100% [92-100] 6 semaines après la 4 ^{ème} dose pour les sujets avec un titre SBA multiplié par 4 à 6 semaines après la 3 ^{ème} dose (M8,5-11,5)	
	8-12 ans	Sur 608 sujets, pourcentage de titre SBA augmenté par 4 : 76% [72-80] 4-6 semaines après la 3 ^{ème} dose (M4-4,5)	
	18-50 ans	Sur 75 sujets, pourcentage de titre SBA augmenté par 4 : 96% [79-100] 4-6 semaines après la 3 ^{ème} dose (M4-4,5)	

L'absence de données complémentaires rend difficile une interprétation approfondie de ce résultat d'efficacité. En effet, l'épidémie a perduré plus de 10 ans et la campagne vaccinale a été débutée 6 ans après le dernier pic épidémique.

L'absence de données sur le portage et l'immunogénicité précédant la période de vaccination ne permet pas de situer précisément le contexte d'introduction de ce vaccin alors que le groupe d'âge étudié (10-14 ans) présente généralement une forte incidence, un taux de portage élevé et une immunité naturelle plus importante. Le portage au cours de cette étude n'a été exploré qu'une fois la vaccination appliquée et sur un petit groupe de sujets. Néanmoins, ces résultats préliminaires ont été les premiers à montrer une réduction du portage au sein du groupe vacciné quelques mois après la vaccination (sans donner de valeurs chiffrées). Les données d'immunogénicité ont quant à eux été estimés selon le titre d'anticorps sériques déterminé par ELISA sur une période allant de 1 mois à 1 an. Ces données ont montré l'induction d'anticorps après la première dose et une augmentation de ce titre ainsi qu'une meilleure persistance dans le temps après la deuxième dose.

Enfin, cette étude est également l'une des premières à avoir exploré l'impact d'une dose rappel dans un schéma vaccinal OMV sur un petit groupe de sujets un an après la primo vaccination. Dans les années 1980, les leçons tirées des différentes campagnes vaccinales dirigées contre le méningocoque reposaient principalement sur les vaccins polysidiques non conjugués et une hyporéactivité était observée après l'administration de rappels pour ces vaccins. Contrairement aux vaccins polysidiques, les résultats préliminaires de cette étude ont montré l'impact positif du rappel OMV dans le maintien du taux d'anticorps sériques sur la période de l'étude, soit au total sur 24 mois après la primo vaccination. Ainsi, ces résultats ont été les premiers à démontrer que l'introduction massive d'un vaccin OMV au sein de la population à risque (ici de 3 mois à 20 ans) permettait de réduire significativement l'incidence des IIM au sein du groupe vacciné mais également au sein de la population générale. Cette étude a donc révélé deux informations aujourd'hui majeures, un impact potentiel de la vaccination OMV sur le portage asymptomatique (ce point restant très discuté) et l'utilité du rappel OMV afin de booster l'immunogénicité dans le temps.

Le vaccin OMV cubain a ensuite été utilisé pour contrôler plusieurs situations épidémiques au Brésil selon un schéma vaccinal identique (deux doses, J0-S6). Au cours de ces campagnes l'efficacité du vaccin OMV chez l'enfant a été étudiée dans deux cohortes incluant entre la fin des années 1980 et le début des années 1990 chacune environ 500 sujets âgé de 3 mois à 9 ans, l'une sur Rio de Janeiro (évaluation de 2 à 14 mois après la primovaccination), l'autre sur Sao Paulo (période d'étude ici non renseignée)^{273,442}. Pour ces deux cohortes l'efficacité a été estimée à 70% chez l'enfant âgé de 4 à 9 ans, entre 14 et 47% chez l'enfant âgé de 24 à 47 mois et entre -37 et 41% chez l'enfant âgé de 3 ou 6 mois à 23 mois. Ces cohortes ont donc montré une efficacité chez l'enfant de plus de 4 ans proche de celle observée au cours de l'étude cubaine. Néanmoins, chez l'enfant en dessous de 4 ans l'efficacité s'est avérée bien plus faible voire absente, faisant craindre une faible efficacité des vaccins OMV chez le nourrisson.

Le vaccin OMV chilien développé par le Walter Reed Army Institute of Research fut utilisé pour une campagne vaccinale de masse dirigé contre une souche B:15:P1.3. Des résultats similaires ont été observés selon un schéma à deux doses (J0-S6) avec le vaccin OMV chilien au cours d'une étude réalisée sur 30 mois à la fin des années 1980 et incluant 40 000 sujets âgés de 1 à 21 ans³⁹³. Son efficacité a été estimée à 69% chez les 5-21 ans, un résultat comparable aux études cubaine et brésilienne. Cependant, chez l'enfant de 1 à 4 ans l'efficacité a été estimée à -23%. Ainsi, les données cubaines, brésiliennes et chiliennes semblaient très concordantes, avec une bonne efficacité de l'approche OMV à court terme chez l'enfant et l'adolescent mais une efficacité moindre voire absente chez le nourrisson. Par ailleurs, aucune publication internationale n'a été retrouvée concernant l'immunogénicité de ces schémas, à court comme à plus long terme, interdisant à cet égard toute comparaison avec nos données normandes.

Le vaccin OMV norvégien développé par l'institut norvégien de santé publique sous le nom MenBvac[®] a été utilisé pour une campagne vaccinale de masse dirigé contre une souche B:15:P1.7,16. En Norvège, le vaccin OMV MenBvac[®] a été introduit en 1988 chez l'enfant et l'adolescent entre 13 et 21 ans selon différents schémas. Plusieurs études ont été réalisées au fil du temps pour apprécier l'impact de cette campagne vaccinale, son efficacité et l'immunogénicité de différentes options d'administration. Pour un schéma à deux doses (J0-S6) administré chez l'enfant âgé de 13 à 14 ans, l'efficacité de ce vaccin a été estimé à 57% sur une période d'observation de 6 semaines à 29 mois et en détail de 87% de 6 semaines à 6 mois, 59% de 11 à 20 mois et 30% de 21 à 29 mois³³⁴.

Comparé aux études précédentes, pour ce groupe d'âge, l'efficacité à court terme (moins de 20 mois) s'avère similaire. Cependant, cette étude démontre également une diminution rapide de l'efficacité vaccinale au cours du temps, qui sans rappel passe en dessous de 50% après 20 mois d'observation. L'impact de rappels sur l'efficacité n'a pas été étudié mais les données d'immunogénicité déterminés par SBA sont disponibles pour les schémas à 2, 3 et 4 doses^{441,443}. Les résultats confirment une bonne immunogénicité du vaccin MenBvac[®] 6 semaines après la seconde dose (53-97%) mais une diminution importante de celle-ci respectivement à 32% 1 an après la seconde dose et à 42% 2 ans après cette même seconde dose (pour des succès n'ayant pas eu alors de rappel). Cette immunogénicité paradoxalement plus importante avec 2 ans de recul (comparativement à 1 an de recul) fait discuter l'addition à l'immunité vaccinale d'une immunité naturelle au cours de l'adolescence (sujets âgés de 16 ans au moment du prélèvement) et un aléa statistique (cohorte numériquement faible avec écarts types non précisés de sorte qu'il est impossible de conclure quant à une réelle différence). Quoiqu'il en soit, ces résultats étaient en faveur d'une durabilité faible de l'immunogénicité d'un vaccin OMV, même lorsqu'administrés à des pré-adolescents et adolescents, tranche d'âge présentant pourtant une excellente réponse vaccinale à court terme. Ces données ont contribué à des adaptations du schéma vaccinale norvégien : ajout d'un rappel à 11 mois pour les sujets primo-vaccinés par deux doses (soit un schéma final à 3 doses : J0-S6-M11,5) puis primo-vaccination par 3 doses suivi d'un rappel 1 an plus tard (soit un schéma final à 4 doses : J0-S6-M3-M13). Pour les 2 schémas, l'ajout de la troisième dose a permis de booster significativement l'immunogénicité 6 semaines après son administration (65-96%). Néanmoins, pour le schéma à 4 doses, l'immunogénicité déclinait à 28% 10 mois après la 3^{ème} dose, le rappel induisant un excellent « boost » (96% de sujets avec titre protecteur 6 semaines plus tard) mais encore 64% de répondeurs 1 an plus tard (ce qui est bien mieux qu'après la troisième dose) mais sans donnée publiée au-delà.

Ainsi la campagne vaccinale norvégienne a permis de confirmer les observations des études d'efficacité précédentes mais apporte des données nouvelles à travers la quantification SBA ayant permis de mieux comprendre les liens entre immunogénicité et efficacité vaccinale, et d'analyser de l'impact des rappels. En particulier il a été ici démontré qu'à l'inverse des vaccins polysidiques alors en usage pour les autres sérogroupe, l'utilisation de rappels OMV n'entraînait pas d'hyporéactivité de la réponse immunitaire mais au contraire un boost significatif de celle-ci bien que à court terme.

L'expérience acquise au cours de cette campagne vaccinale a ensuite été mise à profit lors du développement du vaccin néo-zélandais.

Le vaccin OMV néo-zélandais développé grâce à la collaboration entre Novartis et l'institut norvégien de santé publique a été utilisé pour une campagne vaccinale de masse dirigée contre une souche B:4:P1.7-2,4 sous le nom MeNZB[®]. Le vaccin OMV néo-zélandais a été introduit chez l'enfant et l'adolescent âgé de 6 semaines à 19 ans en 2004 suite à l'épidémie survenue dans le pays au début des années 1990. A l'image de la campagne vaccinale norvégienne, un suivi important a été mis en place et plusieurs études sont disponibles. Un schéma à 3 doses sans rappel (J0-S6-M3) a tout d'abord été appliqué avant d'être complété d'un rappel (J0-S6-M3-M7/M10). Sur une cohorte de 160 000 personnes âgées de 6 mois à 5 ans l'efficacité du schéma à 3 doses a été estimée à 80% sur une période de 24 mois après la dernière administration⁴⁴⁵. Les données d'immunogénicité déterminés par SBA ont été agrémentées au fur et à mesure de l'avancement de la campagne. Ainsi, les données ici présentées ont été compilées de différentes études et seront discutées dans leur ensemble, soit sur la base du schéma à 4 doses *in fine* appliqué^{296,446,447}. Chez l'enfant âgé de 6 semaines à 24 mois, l'immunogénicité fut bonne 6 semaines après la troisième dose (76-92%). Au-delà de plusieurs mois après (4-16 mois), une tendance similaire aux autres études fut observée, avec une chute des titres SBA pour atteindre 3-34%.

Une estimation de l'immunogénicité sur deux cohortes supplémentaires incluant des sujets âgés de 8 à 12 ans et de 18 à 50 ans a été réalisée sur la base du pourcentage de sujets présentant un titre SBA multiplié par 4 après l'administration du schéma à 3 doses. Pour ces deux cohortes l'immunogénicité a été estimée à respectivement 76 et 96% à 4-6 semaines après la dernière dose. L'immunogénicité des vaccins OMV chez l'adolescent est bien documenté et les résultats de cette étude sont similaires à ceux des études présentées précédemment. La donnée nouvelle apportée par cette étude est la bonne immunogénicité observée chez l'adulte, ce qui était attendu comparativement à d'autres vaccins. Enfin, les titres SBA après le rappel pour le schéma *in fine* à 4 doses n'ont été publiés que pour les nouveau-nés primo-vaccinés à 6 à 10 semaines de vie et les nourrissons primo-vaccinés à l'âge de 16 à 24 mois ; pour ces deux cohortes, l'immunogénicité 6 semaines après le rappel a été estimée à 82 et 100% respectivement. Il n'a pas été retrouvé dans la littérature de données d'immunogénicité « tardive » (ie, au-delà d'un an après la dernière dose), et ceci pour toutes les tranches d'âges concernées par la campagne MeNZB[®].

Ainsi, les études réalisées sur la campagne vaccinale néo-zélandaise ont permis de mieux appréhender l'impact des rappels chez le tout petit (nouveau-né ou nourrisson). La comparaison des études néo-zélandaises et norvégiennes confirme l'importance des rappels afin de prolonger la durabilité de l'immunogénicité dans le temps. Néanmoins, ces études soulignent également la durée limitée du boost d'immunité dans le temps qui décline rapidement quelques mois ou années après la dernière dose.

L'épidémie normande survenue à partir de 2003 a été contrôlée grâce au vaccin MenBvac[®] qui pour des raisons de disponibilité a connu différents schémas comme explicité plus haut (page 89). Au cours de la campagne dieppoise, l'efficacité vaccinale chez les sujets âgés de 1 à 19 ans a été estimée à 53% pendant la période de vaccination primaire (entre juin 2006 et juin 2008) et à 81% après celle-ci (entre juillet 2008 et août 2010)³¹⁸. Ces résultats sont globalement comparables à ceux obtenus des autres campagnes vaccinales OMV et reflète les différentes étapes de la vaccination appliquées dans le canton de Dieppe. L'efficacité initiale de seulement 53% peut être expliquée par plusieurs facteurs. Tout d'abord, le schéma à 2 doses à progressivement été appliqué, de sorte que la couverture vaccinale a été dans un premier temps faible avant d'être étendu pas-à-pas au fil de la libération de nouveaux lots et de l'élargissement de la campagne. De plus, le schéma à 2 doses est connu pour induire une bonne immunogénicité quelques semaines après la deuxième dose mais également pour le déclin rapide de celle-ci au cours de l'année suivant la dernière dose. Ainsi, les difficultés d'approvisionnement ont entraîné un délai important entre la deuxième dose et la troisième dose, utilisée là comme rappel alors qu'en l'absence de pénurie c'est un schéma de primo-vaccination à 3 doses avant un rappel à 1 an qui eut été administrés à tous (il a pu *in fine* être appliqué en fin de campagne). Enfin, bien que le groupe d'âge ciblé (1 à 5 ans) représente le principal groupe à risque, il n'est pour autant pas le principal réservoir. Aussi, il est vraisemblable que le portage et la transmission au sein de la population générale n'avait été que peu étaient impactée par la primo-vaccination des jeunes enfants.

A l'inverse, la bonne efficacité obtenue une fois la campagne vaccinale « en marche » peut s'expliquer par une couverture vaccinale plus étendue, l'application de schémas à 4 doses (2+1+1 pour les premiers vaccinés de la zone de Dieppe, puis 3+1), et l'extension aux adolescents jusqu'à 19 ans permettant un effet direct et possiblement aussi indirect sur le portage au regard des données cliniques mais aussi d'un modèle murin⁴⁴⁸.

Les résultats des deux études d'immunogénicité menées à Dieppe et Neufchâtel-en-Bray corroborent les résultats d'efficacité^{318,444}. Pour ces deux cohortes, l'immunogénicité estimée 6 mois après la deuxième dose (avant le premier rappel) fut de 26 et 37%. Ces résultats sont comparables à ceux des études présentées précédemment et illustrent la faible durabilité de la protection vaccinale dans le temps conférée par les vaccins OMV selon un schéma à 2 doses. Le premier rappel administré à M8 a permis un regain significatif de l'immunogénicité qui 6 semaines après a été estimé à plus de 80% pour les 2 cohortes. Le délai important entre les 2 rappels a permis d'évaluer la durabilité de la protection conférée par ce premier rappel dans le temps. Ainsi, pour la cohorte de Dieppe, il a été observé un déclin de l'immunogénicité à 56% au bout de 15 mois et pour la cohorte de Neufchâtel-en-Bray un déclin à respectivement 40 et 21% au bout de 12 et 28 mois après le premier rappel. Bien que dépendant de facteurs extérieurs (disponibilité des stocks), ces résultats illustrent une fois encore la difficulté à positionner les rappels dans le schéma vaccinal, notamment le premier qui est intermédiaire entre la primo-vaccination et la fin du schéma complet afin de garantir un continuum de protection. L'impact à court terme du second rappel n'a été estimée que pour la cohorte de Neufchâtel-en-Bray et un regain d'immunogénicité à 87% a été observé un mois et demi après celui-ci⁴⁴⁹. Enfin, point majeur de notre étude, la protection conférée a été estimée pour ces 2 cohortes plus d'un an après le dernier rappel. Ainsi, l'immunogénicité était respectivement pour les cohortes Dieppe et de Neufchâtel-en-Bray de 48% à 14 mois après le dernier rappel et de 31% à 48 mois après. A notre connaissance aucune autre étude relative n'a étudié sur une aussi longue période l'immunogénicité des vaccins à composante OMV (M50 et M70 pour les cohortes normandes là où les données disponibles s'étendent aux maximums à M25 et ce pour une seule cohorte norvégienne), ce qui interdit là toute comparaison. Nos résultats s'avèrent en cohérence avec ce qui pouvait être anticipé d'une simple linéarité dans la baisse d'efficacité. De surcroît comme l'épidémie fut dans l'entrefaite contrôlée, les titres SBA 1 à 4 ans après la fin des schémas ne pouvaient être amplifiée d'une immunité naturelle (d'autant que la circulation du clone épidémique est certainement restée faible d'après les données de l'étude de portage)⁴⁵⁰.

La tonalité générale est que la durée de protection est limitée faisant des vaccins OMV un outil précieux pour contrôler une épidémie et « éteindre un incendie » en évitant l'expansion d'un clone alors que si rien n'y est fait la durée d'une bouffée épidémique IIM B est souvent de deux décennies.

A contrario la protection apportée ne permet pas d'espérer une couverture très à distance, d'où l'importance d'une action ciblée la plus forte possible sur la population concernée pour enrayer le phénomène.

2.2.2.2. Ampleur de la protection conférée par les vaccins OMV

Le second enseignement de l'étude originale présentée là fut la démonstration d'une efficacité vaccinale très au-delà de la souche initialement ciblée, du fait d'une protection générée par les deux régions variables de PorA permettant d'espérer une efficacité clinique sur environ un sixième des clones virulents B actuellement circulant en France et en Europe.

Il n'a été retrouvé que très peu d'études ayant analysé l'immunogénicité éventuellement croisée entre tel vaccin OMV et tel panel de souches. En effet, du fait de leur réputation d'être « souche spécifique », l'immunogénicité des vaccins OMV sur des souches hétérologues (ie, distinctes de la souche épidémique ciblée) ne semble pas avoir initialement été analysée, ou en tout cas n'a pas fait l'objet de publication dans les premières années de développement de ces produits. Les données d'effet croisé des campagnes vaccinales OMV de jadis sont principalement supposées d'observations épidémiologiques et résultent de l'extrapolation des données d'efficacité vaccinale au-delà de la souche épidémique. L'immunogénicité croisée des vaccins OMV a également été explorée dans le cas de réutilisation de vaccins disponibles pour le contrôle de situations épidémiques inquiétantes et nécessitant la mise en place d'action immédiates (développement de nouveaux vaccins coûteux et fastidieux). Ce fut notamment le cas avec l'utilisation du vaccin cubain dans plusieurs pays d'Amérique latine et plus récemment avec l'utilisation du vaccin Norvégien en Normandie. Néanmoins, ces études se sont limitées à une comparaison de l'immunogénicité vaccinale sur des souches proches (même séro-groupe), PorA étant considérée comme principal support de l'immunogénicité, de même séro-sous-type. Ainsi, il faudra attendre les années 1990 et le développement des vaccins OMV à composante multiple pour voir apparaître les premières études analysant plus finement l'immunogénicité induite par différents sous-types de PorA, ses deux régions variables, ainsi que les premières hypothèses suggérant le rôle important des autres protéines de membrane externe composant les OMVs.

A Cuba, l'efficacité du vaccin OMV a été estimée à 83%. Associées aux données épidémiologiques, ce résultat d'efficacité permet d'appréhender en partie l'immunogénicité croisée conférée par ce vaccin²⁶⁸. Une étude rétrospective réalisée sur la période 1982-2002 a démontré que la prévalence du séro-groupe B était de 68% tandis que celle du séro-sous-type ciblé par le vaccin (P1.15) était de 62% pendant la période épidémique (1982-1992)⁴⁵¹. La mise en parallèle de ces deux données pourrait suggérer en première analyse une efficacité du vaccin cubain sur des souches B distinctes de la souche épidémique ciblée. Cependant il faut noter qu'à côté de la souche prévalente (B:4:P1.15) était rapporté une importante part de souches non caractérisées, avec 32% des souches non-sérogrouables et 17% des souches non séro-sous-typable. *A contrario* presque 100% des souches caractérisables présentaient un séro-sous-type ciblé par le vaccin. Aujourd'hui les techniques moléculaires permettraient de préciser ces situations afin d'estimer parmi les profils antigéniques manquants la part réellement non couverte - ou pas - par le vaccin. Par ailleurs, il est aujourd'hui avéré que les vaccins OMV induisent la production d'anticorps au-delà des spécificités de PorA ; il est donc possible que ces souches aux profils antigéniques non renseignés aient été couvertes par des anticorps autres que ceux recherchés spécifiquement *in vitro*.

Une brève étude d'immunogénicité croisée a été réalisée au cours de l'étude cubaine. Six autres souches de séro-groupe B (B:2b, B:15:P1.15, B:4 nt, B:8 nt, B:15 nt, B:nt nt) et deux de sérogroupe différents (A, W) ont été étudiées. Un titre bactéricide du sérum a été observé pour les six souches de séro-groupe B et une absence de titre pour les deux souches de sérogroupe différents. Ces résultats suggèrent une efficacité des vaccins OMV au-delà du sérotype mais l'absence de données sur le séro-sous-type pour 7 des 8 souches utilisées pour cette analyse rend difficile l'interprétation de ces résultats.

Le vaccin cubain a également été utilisé pour contrôler plusieurs épidémies en Amérique latine, comme au Brésil, en Colombie et en Uruguay. A Sao Paulo, l'efficacité vaccinale a été estimée à 74% chez les enfants de plus de 4 ans (sans évidence précise de l'efficacité chez l'enfant de moins de 4 ans), alors que la souche épidémique ne représentait que 40% des cas caractérisés²⁷². Cependant, à l'image de l'étude cubaine, pour une part importante des souches (>40%) le séro-sous-type est indéterminé. De plus, la diversité des autres souches causales apparaît limitée et une majorité de ces souches présentaient au moins une valence de PorA identique à la souche épidémique ciblée par le vaccin.

En Uruguay, les épidémies de Montevideo et Canelones ont également été contrôlées par le vaccin cubain avec respectivement une efficacité vaccinale estimée à 88% et 100% alors que la souche épidémique ne représentait respectivement que 14% et 50% des cas caractérisés, les autres souches étant dans le cas de ces deux épidémies très diverses⁴⁵².

Ainsi, ces observations épidémiologiques suggèrent une efficacité du vaccin OMV cubain au-delà de la souche initialement ciblée, indépendante du sérotype et supposée médiée par des valences de PorA similaires ou d'autres composants des OMVs. L'immunogénicité des vaccins OMV étant réputée limitée à la souche vaccinale, ces observations ont suscité un intérêt auprès de la communauté scientifique.

En 1995, Rosenqvist *et al* ont étudié plus finement l'immunogénicité du MenBvac[®] sur une cohorte d'adulte vaccinés selon un schéma à 2 doses plus 1 rappel (J0-S6-A4-5) vis-à-vis de la souche épidémique norvégienne (H44/76, B:15:P1.7,16)⁴⁵³. Concernant l'immunogénicité, les résultats obtenus sont sensiblement similaires à ceux des études présentées précédemment. Par technique ELISA, ils ont également caractérisé plus précisément les anticorps induit par la vaccination et observé une augmentation importante du titre des IgG concomitante avec l'administration des différentes doses du schéma. Le point majeur de cette étude est l'observation de titres SBA dirigés contre différents variants de la souche H44/76 modifiés pour ne pas arborer l'ensemble des protéines de membrane externe (délétées successivement de PorA, PorB, Opc). Ainsi ces résultats ont démontré l'importance des protéines de membrane externe dans l'immunogénicité des vaccins OMV comme Opc. Néanmoins, les résultats d'immunogénicité observés pour la souche délétée de PorA sont bien inférieurs à ceux obtenus avec les autres souches, ce qui démontre l'importance de l'immunité médiée par PorA dans l'immunité globale conférée par les vaccins OMV.

En 1997, Tappero *et al* ont comparé l'immunogénicité des vaccins cubain et norvégien sur une cohorte de nourrissons (<1 an), d'enfants (2-4 ans) et d'adultes (17-30 ans) d'après un schéma à 3 doses (J0-M2-M4) et sur les souches chilienne (B:15:P1.3), cubaine (B:4:P1.15) et norvégienne (B:15:P1.7,16)⁴⁵⁴. Ils ont observé pour ces 2 vaccins une bonne immunogénicité (multiplication du titre SBA initial par au moins 4) dirigée contre les souches vaccinales (67-98%). Concernant l'immunité croisée, elle a été observée comme bonne chez l'adulte (46-60%), partielle chez l'enfant (24-41%) et faible voire inexistante chez le nourrisson (2-31%) en particulier après seulement 2 doses du schéma (2-16%).

Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Rosenqvist *et al* et démontrant une efficacité des vaccins OMV sur des souches présentant différents séro-sous-types de PorA. Cette étude souligne également l'importance de l'âge dans la réponse immunitaire comme évoqué plus haut. A travers cette étude, il apparaît que l'immunité croisée induite chez l'enfant jeune est très faible.

Des essais uniquement réalisés sur la cohorte des nourrissons chiliens vaccinés par le MenBvac[®] ont démontré une absence totale d'activité bactéricide vis-à-vis de souches arborant des séro-sous-types sans aucune valences identiques à la souche épidémique (isolats P1.5,2, P1.19,15, P1.7h,4, P1.12,13 et P1.5c,10 alors que le vaccin était P1.7,16) ; cette même étude a étudié les titres SBA vis-à-vis de souches génétiquement modifiées à partir de la souche épidémique de référence (H44/76) prouvant l'absence d'activité bactéricide contre le variant dépourvu de PorA (0%) alors que l'activité était conservée contre le variant dépourvu de PorB (98%).

En 2006, Feiring *et al* ont étudié au cours d'une étude rétrospective sur la campagne vaccinale norvégienne l'immunogénicité croisée induite par le MenBvac[®] sur une cohorte d'enfants d'âge moyen de 14 ans⁴⁴³. Sur un panel de 5 souches de séro-groupe B mais de sérotypes et séro-sous-types différents, ils ont démontré une bonne activité bactéricide des sérums dirigée contre une souche de formule antigénique B:14:P1.7,16, la souche responsable de l'épidémie normande et dont la sensibilité vis-à-vis du MenBvac[®] a plus amplement été démontrée par Taha *et al* en 2007, cette étude ayant conduit à l'utilisation « en prêt à porter » du vaccin norvégien antérieurement mis au point sur mesure, et ceci pour faire en Normandie l'économie de tout le temps nécessaire à la qualification d'un vaccin spécifique³³⁵. Ces résultats sont peu surprenants car la souche « B14 » normande présente le même séro-sous-type que la souche H44/76 utilisée dans la formulation du MenBvac[®]. Néanmoins, pour les 4 autres souches, les résultats sont moins marqués. Ces souches sont de séro-sous-type P1.7-2,4 et pour l'une de ces 4 souches les titres SBA mesurés sont sensiblement similaires à ceux observés pour la souche « B14 » normande. A l'inverse, pour les 3 autres souches les titres SBA sont significativement inférieurs. Ces souches arborent un sous-type de VR1 particulier qui pour des raisons d'encombrement stérique avait déjà été démontré comme peu immunogène par Wedege *et al* en 1993⁴⁵⁵.

Ainsi, cette étude montre que la présence d'une seule des deux valences ciblées peut être suffisante pour induire un titre SBA réputé protecteur mais suggère cependant que l'immunogénicité n'est pas systématique et que des variations, même mineures, peuvent entraîner un changement de conformation de la protéine et la rendre peu immunogène.

Le développement du MeNZB[®] pour contrôler l'épidémie néo-zélandaise au début des années 2000 a donné aussi l'opportunité de comparer et d'étudier l'immunité croisée conférée par ce vaccin. En 2006, Thornton *et al* ont comparé l'immunogénicité du MeNZB[®] avec celle du MenBvac[®] contre 3 souches épidémiques néo-zélandaises (B:4:P1.7-2,4), dont la souche vaccinale et contre la souche norvégienne (B:15:P1.7,16), chez l'adulte (18-50 ans)⁴⁵⁶. Contre la souche vaccinale, l'efficacité du MeNZB[®] a été démontrée comme bonne avec selon les formulations de 87 à 100% des sujets ayant après 3 doses un titre SBA multiplié par 4 et donc réputé protecteur. Cependant vis-à-vis des 2 autres souches néo-zélandaises, l'immunogénicité bien que bonne, apparaît légèrement inférieure (78-87%). Ce résultat est intéressant car il démontre que même si ces souches partagent un séro-sous-type identique et qu'elles sont en apparence clonales, leur sensibilité vis-à-vis du MeNZB[®] peut sembler un peu différente. Concernant l'immunité croisée, ils ont démontré pour le MeNZB[®] l'induction d'un titre SBA dirigé contre la souche norvégienne chez 43-48% des sujets et pour le MenBvac[®] l'induction d'un titre SBA dirigé contre les souches néo-zélandaises chez 35-54% des sujets. Les souches néo-zélandaises et la souche norvégienne partagent une valence de PorA (VR1), même si les souches néo-zélandaises présentent un sous-type particulier. Comme suggéré des études précédentes, la présence d'une valence identique peut suffire à conférer une bonne immunogénicité. Dans le cas de cette étude, il est difficile de tirer une conclusion car les résultats ne sont pas aussi marqués et les résultats SBA sont « ni bons ni mauvais », avec 1 sujet sur 2 réputé protégé.

Cette même cohorte a fait l'objet d'une seconde étude réalisée en 2007 par Wedege *et al* afin d'explorer en détail les spécificités des anticorps induits par ces 2 vaccins⁴⁵⁷. Ils ont démontré que les anticorps sériques induits par ces 2 vaccins étaient principalement dirigés contre PorA et PorB, indépendamment de la souche testée (homologue ou hétérologue) mais également pour une fraction non négligeable (proche de 50%) étaient dirigés contre d'autres structures de membrane externe avec en tête les protéines FbpA, RmpM, OpcA et les LOSs. Ainsi, ces 2 études confirment que l'immunogénicité des vaccins OMV est principalement médiée par les spécificités de PorA avec comme conséquence une haute spécificité vis-à-vis de souches homologues.

Néanmoins, les autres structures de membrane externe ne doivent pas être sous considérées car bien que tests d'affinité antigène-anticorps ne reflètent pas l'activité bactéricide du sérum *in vivo*, ces structures induisent cependant une importante production d'anticorps de haute affinité.

Une comparaison similaire mais appliquée chez l'enfant (16-24 mois) a été réalisée par Wong *et al* en 2007⁴⁴⁷. Les résultats de cette étude sont très différents de ceux obtenus par Thornton *et al* chez l'adulte. Tout d'abord, les résultats d'immunogénicité vis-à-vis de la souche vaccinale sont inférieurs avec pour le MeNZB[®] et le MenBvac[®] une protection respectivement estimée à 75 et 55%. La moindre immunogénicité chez l'enfant jeune est un phénomène couramment décrit. Le point majeur de cette étude est cependant l'absence d'immunité croisée conférée par ces 2 vaccins avec pour le MeNZB[®] une immunogénicité dirigée contre la souche norvégienne estimée à 6% et pour le MenBvac[®] une immunogénicité dirigée contre la souche néo-zélandaise estimée à 4%. A l'image des résultats obtenus par Tappero *et al*, cette étude confirme la moindre efficacité des vaccins OMV chez l'enfant jeune comparée à celle observée chez l'adulte et l'absence d'immunité croisée chez ces derniers.

Les vaccins OMV sont donc surs, immunogènes et apportent une bonne protection contre les souches de sérotype B. Cependant, la protection conférée est limitée dans le temps, comprise entre 50 et 80% contre la souche vaccinale et par immunogénicité croisée, rarement supérieur à 50% contre des souches hétérologues. De plus, l'âge importe, avec chez l'enfant une moindre efficacité et une quasi absence d'immunité croisée.

Pour parer à cette spécificité de souche des vaccins OMV multivalents ont été développés (incluant jusqu'à 9 variants de PorA) et plusieurs formulations ont été étudiées, même si elles n'ont pas ensuite connu de développement commercial. Un vaccin bivalent formulé à partir des OMV cubaine (B:4:P1.19,15) et néo-zélandaise (B:4: P1.7-2,4) a été étudié par Boutriau *et al* en 2007 chez l'adolescent (12-18 ans)⁴⁵⁸. Au cours de cette étude, l'immunogénicité vaccinale a été estimée entre 71 et 100% contre des souches homologues à la souche cubaine et entre 95 et 96% contre des souches homologues à la souche néo-zélandaise, démontrant ainsi la possibilité et l'intérêt de la combinaison multi-OMV. Concernant les souches hétérologues, la protection croisée a été estimée entre 35 et 97%, avec pour 4 des 6 souches testées une immunogénicité estimée supérieur à 50%.

Des vaccins multivalents formulés à partir de souches génétiquement modifiées pour exprimer plusieurs variants de PorA ont également été tentés, avec initialement 2 formulations trivalentes^{459,460}, puis ensuite des formulations à 6 ou 9 valences (dénommées HexaMen et NonaMen qui là encore n'ont pas atteint le stade de la mise sur le marché). La sureté et l'immunogénicité du vaccin HexaMen ont été rapportées chez l'enfant et l'adulte après des schémas à 3 ou 4 doses^{395,461,462}.

De Kleijn *et al* ont observés que les titres SBA dirigés contre les séro-sous-types spécifiques variaient de 28 à 98% chez l'enfant âgé de 2 à 3 ans et de 16 à 100% chez l'enfant âgé de 7 à 8 ans, ceci avec des inégalités marquées dans la réponse induite contre les différents variants de PorA³⁹⁵. Par exemple, chez le petit enfant, la protection contre le séro-sous-type P1.19,15 (valence cubaine) a été estimée entre 19 et 24%, là où pour le séro-sous-type P1.5c,10 la protection a été estimée entre 93 et 100%. Ces résultats suscitent donc plusieurs questions car pour ces 2 cohortes les titres SBA sont différents et les séro-sous-types prévalents au niveau épidémiologique n'ont pas été observés comme ayant la meilleure immunogénicité.

De Kleijn *et al* ont aussi observé sur une cohorte de jeunes enfants primo vaccinés par le HexaMen l'effet d'un boost par un vaccin monovalent (de formulation P1.7-2,4), déterminant un regain d'immunité non seulement vis-à-vis des souches de séro-sous-type P1.7-2,4 (contenues dans l'hexavalent initial) mais également contre plusieurs autres séro-sous-types inclus dans la formulation du HexaMen, démontrant ainsi un effet médié par immunité croisée⁴⁶³.

Deux études, l'une réalisée par de Kleijn *et al* et l'autre par Martin *et al* ont démontré que la distribution des isotopes d'IgG induit par le vaccin HexaMen entre les 2 cohortes et entre les différents variants de PorA des souches testées ne pouvaient expliquer à elle seule les variations de titres SBA observées^{464,465}. Ainsi, ces résultats suggèrent que ces variations puissent être directement liées aux propriétés immunologiques propres à chaque variant antigénique de PorA.

Afin d'explorer plus précisément les mécanismes sous-jacents en cause dans ces variations, 2 études réalisées par Vermont *et al* se sont intéressées aux titres d'anticorps sériques, à l'affinité de ces anticorps vis-à-vis des différents sous-types de PorA et à l'immunogénicité des différentes régions variables de PorA^{466,467}.

Il a été ainsi démontré que les différents variants de PorA inclus dans la formulation vaccinale induisaient des réponses très différentes, avec pour certains sous-types des titres d'anticorps sériques presque 100 fois supérieurs et des différences d'affinité pouvant aller jusqu'à un facteur 10. Ils ont également démontré que ces différences étaient étroitement corrélées avec les résultats SBA obtenus des études précédentes.

Plus précisément, chacune des valences de PorA peut-être suffisante pour induire une bonne immunogénicité. Cependant, la présence de variations mêmes mineurs, comme retrouvée pour la VR1 P1.7-2 (sous-type particulier de la valence P1.7) de l'OMV néo-zélandaise entraîne des variations significatives de l'immunogénicité. De plus, certaines combinaisons de valence entraînent un changement de la conformation de la protéine, modifient l'accessibilité des épitopes antigéniques et jouent sur l'immunogénicité, cela même si l'une ou les deux valences sont en théorie ciblées.

Ainsi nos résultats obtenus avec la bibliothèque normande s'avèrent concordant avec les données de la littérature plus ancienne tout en apportant des éléments nouveaux : le message principal est que les vaccins OMV monovalents, bien qu'initialement présentés comme « fabriqués sur mesure » et « souche spécifique », apportent en fait une couverture très au-delà de la seule souche vaccinale, avec une immunité croisée avant tout médiée par PorA (même si d'autres composés antigéniques sont en cause), optimale pour les isolats partageant les mêmes deux valences de cette porine (VR1 et VR2), mais aussi présente pour des souches n'exprimant que VR1 ou VR2. Fait important, nos bons résultats ont été observés dans une cohorte d'enfants très jeunes lors de la primo-vaccination. Notre étude souligne que cette immunité croisée s'étend aux souches d'autres sérogroupes à condition qu'elles partagent la même PorA ; si la démonstration a été apportée pour une souche C, le résultat pourrait avoir une portée davantage pratique pour les sérogroupes ne disposant pas encore de vaccin capsulaire tel le X. Notre étude semble aussi être la première à avoir quantifié la largeur de la couverture vaccinale d'un OMV monovalent au regard de l'épidémiologie en IIM B du pays, en montrant notamment que le MenBvac[®] pourrait « rattraper » 13% des souches non couvertes par le Bexsero[®] (et qui elles-mêmes représentent environ 15% des souches B actuellement circulantes en France).

2.2.3. Perspectives

Dans un éditorial publié en 2011 dans *The Lancet of Infectious Diseases* pour accompagner la publication princeps ayant rapporté l'efficacité du MenBvac[®] en Normandie, David S Stephens, infectiologue à Atlanta et expert en IIM, avait souligné au combien les vaccins OMV étaient anciens mais à ne pas oublier (« Outer membrane-vesicle vaccines : old but not forgotten » *Lancet Infectious Diseases* 2011 ; 11 : 421-22).

Le message était que les vaccins OMV s'étaient montrés efficaces et surs pour contrôler des épidémies clonales dans différents pays, et qu'ils pourraient trouver un renouveau à travers l'intégration dans le 4CMenB (Bexsero[®]), dont la commercialisation à l'époque était toute proche, et dont la composante OMV (issue du MeNZB[®]) était espérée agir à la fois comme adjuvant et comme un élargissement du panel de protection des trois autres composants. L'éditorial soulignait aussi que des vésicules membranaires externes sont portées par différentes bactéries, offrant des possibilités de vaccins candidats vis-à-vis de *Neisseria lactamica*, *Bordetella pertussis*, *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis* et *Vibrio cholerae*.

Huit ans plus tard, il s'avère que les vaccins recombinants anti-B actuellement disponibles n'apportent pas une réponse complète dans la prévention des IIM, le vaccin fHbp bivalent (Trumenba[®]) posant des problèmes de tolérance et étant jusqu'alors non agréé chez l'enfant jeune et non disponible en Europe, tandis que le 4CmenB ne couvre qu'environ 85% des isolats B actuellement circulant en Europe. Aussi les vaccins OMV monovalents pourraient conserver une place pour le contrôle d'épidémies non atteignables par les recombinants.

Surtout, le vaccin OMV néozélandais a fait tout récemment la preuve d'une efficacité partielle dans la protection vis-à-vis des gonococcies. Dans une étude rétrospective de sujets néozélandais vaccinés ou non par MeNZB[®] dans l'enfance ou l'adolescence puis exposés ensuite à des infections sexuellement transmissibles (IST). Il est apparu que le fait d'avoir reçu MeNZB[®] jusqu'à 10 ans auparavant était un facteur protecteur des infections à *Neisseria gonorrhoeae* (et ceci avec un groupe contrôle de patient souffrant de chlamydie). L'homologie génétique (estimée à 80-90%) entre les deux espèces de *Neisseria* expliquerait cet effet inattendu, les vésicules de membrane externe du méningocoque générant une immunité contre le gonocoque.

Même si les infections à gonocoque ne sont qu'exceptionnellement invasives et mortelles, le fardeau de ces IST en termes d'inconfort, de risque de stérilité, de facteur favorisant la dissémination du VIH et l'émergence de souches multi-résistantes font que le développement de vaccins anti-gonococciques pourrait être envisagé, *a fortiori* si le bénéfice survient en marge de la prévention des IIM. Et là encore la composante OMV apparaît déterminante.

Dans ce contexte, il reste une inconnue de taille : l'impact ou non sur le portage de *N. meningitidis* mais aussi pourquoi pas de *N. gonorrhoeae* des vaccins à composante OMV, avec des données dans la littérature pour l'instant peu nombreuses et discordantes, alors même qu'il y a un véritable enjeu de santé publique en termes ou non d'effets indirects de la vaccination.

Aussi peut-il être postulé que les vaccins OMV continueront de faire l'objet de recherche dans les années à venir : le 4CMenB pour sûr, mais possiblement aussi les OMV monovalents qu'il soit dérivé de *N. meningitidis* voire de *N. gonorrhoeae*.

Conclusion

Ainsi ce mémoire pour la soutenance d'un doctorat de sciences présente deux travaux originaux publiés relatifs à l'épidémie d'IIM à souche B:14:P1.7,16 ayant sévi en Normandie de 2003 à 2012.

Financées grâce à une allocation doctorale de trois ans allouée par le Conseil Régional de la Haute-Normandie de jadis et réalisées en partenariat entre l'Université de Rouen - Normandie et l'Institut Pasteur, ces recherches ont consisté à exploiter *a posteriori* deux biothèques constituées lors de l'épidémie.

Ces travaux ont permis d'une part, de caractériser un facteur de virulence apparemment déterminant pour l'adaptation à l'hôte du clone en cause et de son « switch » entre invasion et portage sain et d'autre part, de préciser la durabilité et l'ampleur de la protection apportée par le vaccin MenBvac à base de vésicules de membranes externes alors utilisé pour contrôler l'épidémie.

La mise en perspective avec la revue de la littérature sur le sujet montre que les résultats acquis là s'avèrent en pleine cohérence avec les publications antérieures, tout en apportant pour chacun des deux champs étudiés une contribution nouvelle.

Ces travaux ouvrent aussi d'autres perspectives, de sorte que même si l'épidémie « B14 » normande appartient désormais au passé, les biothèques pourraient faire encore l'objet d'études complémentaires pour bâtir l'avenir. Par exemple : analyse sur un plus grand nombre de souches « B14 » et sur des clones hypervirulents distincts de « B14 » (y compris d'autres sérogroupes) du facteur HmbR comme déterminant majeur de la pathogénicité ; étude d'immunogénicité du MenBvac[®] ainsi que d'autres vaccins OMV vis-à-vis non plus de *N. meningitidis* mais de *N. gonorrhoeae*.

Bibliographie

1. Vieusseux, G. Mémoire sur la maladie qui a régné à Genève au printemps de 1805. *J Med Chir Pharmacol* **11**, 163 (1805).
2. Danielson, L. & Mann, E. A history of a singular and very noted disease, which lately made its appearance in Medfield. *Med Agricultural Reg* **1**, 65–69 (1806).
3. Greenwood, B. Manson Lecture. Meningococcal meningitis in Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **93**, 341–353 (1999).
4. Marchiafava, E. & Celli, A. Sopra i micrococchi della meningite cerebrospinale epidemica. *Gazzetta Osp.* **5**, (1884).
5. Weichselbaum, A. Ueber die Aetiologie der akuten Meningitis cerebro-spinalis. **5**, 573–83– 620–26 (1887).
6. Kiefer, F. Zur differentialdiagnose des erregers der epidemischen cerebrospinal-meningitis und der gonorrhoe. *Berl. Klin. Wochenschr.* **33**, 628–630 (1896).
7. Albrecht, H. & Ghon, A. Uber die aetiologie und pathologische anatomie der meningitis cerebrospinalis epidemica. *Wien Klin Wochenschr* **14**, 984 (1901).
8. Dopter, C. Etude de quelques germes isolés du rhinopharynx, voisins du méningocoque (para méningocoques). *C R Soc Biol (Paris)* **67**: 64 (1909).
9. Flexner, S. The results of the serum treatment in thirteenth hundred cases of epidemic meningitis. *J. Exp. Med.* **17**, 553–576 (1913).
10. Bruns, H. & Hohn, J. Meningokokken im Nasenrachenraum. *Kiln Jahrb Jena* **28**: 285 (1908).
11. Waterhouse, R. A. A case of suprarenal apoplexy. *The Lancet* **1**, 577–578 (1911).
12. Norton, J. & Gordon, J. *Meningococcus meningitis* in Detroit in 1928-1929, I. Epidemiology. *J prev Med* **4**, 207 (1930).
13. French, M. R. Epidemiological Study of 383 Cases of *Meningococcus Meningitis* in the City of Milwaukee, 1927-1928 and 1929. *Am J Public Health Nations Health* **21**, 130–138 (1931).
14. Glover, J. A. The Cerebro-Spinal Fever Epidemic of 1917 at X Depôt. *J Hyg (Lond)* **17**, 350–365 (1918).
15. Schwentker, F. F., Gelman, S. & Long, P. H. Landmark article April 24, 1937. The treatment of meningococcal meningitis with sulfanilamide. Preliminary report. By Francis F. Schwentker, Sidney Gelman, and Perrin H. Long. *JAMA* **251**, 788–790 (1984).
16. Khuns, D., Nelson, C., Feldman, H. & Kuhn, L. The prophylactic value of sulfadiazine in the control of meningococcal meningitis. *JAMA* **123**, 335–339 (1943).
17. Schoenbach, E. B. & Phair, J. J. The sensitivity of meningococci to sulfadiazine. *Am J Hyg* **47**, 177–186 (1948).
18. Bristow, W. M., Vanpeenen, P. F. & Volk, R. Epidemic meningitis in naval recruits. *Am J Public Health Nations Health* **55**, 1039–1045 (1965).
19. Gauld, J. R., Nitz, R. E., Hunter, D. H., Rust, J. H. & Gauld, R. L. Epidemiology of meningococcal meningitis at fort ord. *American Journal of Epidemiology* **82**, 56–72 (1965).
20. Deal, W. B. & Sanders, E. Efficacy of rifampin in treatment of meningococcal carriers. *N. Engl. J. Med.* **281**, 641–645 (1969).
21. Gardner, P. Clinical practice. Prevention of meningococcal disease. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1466–1473 (2006).

22. Guibourdenche, M., Popoff, M. Y. & Riou, J. Y. Deoxyribonucleic acid relatedness among *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. cinerea* and "*Neisseria polysaccharea*". *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **137B**, 177–185 (1986).
23. Snyder, L. A. S. & Saunders, N. J. The majority of genes in the pathogenic *Neisseria* species are present in non-pathogenic *Neisseria lactamica*, including those designated as 'virulence genes'. *BMC Genomics* **7**, 128 (2006).
24. Vandekerkove, M., Bradstreet, P., Faucon, R. & Benech, S. [Transport medium for meningococci]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **113**, 260–263 (1967).
25. Bäckman, A., Lantz, P., Rådström, P. & Olcén, P. Evaluation of an extended diagnostic PCR assay for detection and verification of the common causes of bacterial meningitis in CSF and other biological samples. *Mol. Cell. Probes* **13**, 49–60 (1999).
26. Frosch, M., Müller, D., Bousset, K. & Müller, A. Conserved outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in capsule expression. *Infect. Immun.* **60**, 798–803 (1992).
27. Slaterus, K. W. Serological typing of meningococci by means of micro-precipitation. *Antonie Van Leeuwenhoek* **27**, 305–315 (1961).
28. Taha, M.-K. *et al.* Interlaboratory comparison of PCR-based identification and genogrouping of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 144–149 (2005).
29. Frasch, C. E., Zollinger, W. D. & Poolman, J. T. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev. Infect. Dis.* **7**, 504–510 (1985).
30. Poolman, J. T. & Abdillahi, H. Outer membrane protein serosubtyping of *Neisseria meningitidis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7**, 291–292 (1988).
31. Feavers, I. M., Suker, J., McKenna, A. J., Heath, A. B. & Maiden, M. C. Molecular analysis of the serotyping antigens of *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* **60**, 3620–3629 (1992).
32. Maiden, M. C., Bygraves, J. A., McCarvil, J. & Feavers, I. M. Identification of meningococcal serosubtypes by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2835–2841 (1992).
33. Scholten, R. J. *et al.* Lipo-oligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by a whole-cell ELISA with monoclonal antibodies. *J. Med. Microbiol.* **41**, 236–243 (1994).
34. Maiden, M. C. *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 3140–3145 (1998).
35. Sáez-Nieto, J. A. *et al.* Epidemiology and molecular basis of penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* in Spain: a 5-year history (1985-1989). *Clin. Infect. Dis.* **14**, 394–402 (1992).
36. Bijlsma, M. W. *et al.* Epidemiology of invasive meningococcal disease in the Netherlands, 1960-2012: an analysis of national surveillance data. *Lancet Infect Dis* **14**, 805–812 (2014).
37. Bilal, A. *et al.* Neonatal Meningococcal Meningitis In France From 2001 To 2013. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **35**, 1270–1272 (2016).
38. Di Caprio, G. *et al.* Increased rate of penicillin non-susceptible strains of *N. meningitidis* in Naples, Italy. *J Chemother* **29**, 389–390 (2017).
39. Deghmane, A.-E., Hong, E. & Taha, M.-K. Emergence of meningococci with reduced susceptibility to third-generation cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 95–98 (2017).

40. Griffiss, J., Brandt, B. & Jarvis, G. A. Natural immunity to *Neisseria meningitidis*. In: Vedros NA, editor. Evolution of meningococcal disease, vol. II. Boca Raton. *CRC Press* 99–119 (1987).
41. Cartwright, K. A., Stuart, J. M., Jones, D. M. & Noah, N. D. The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol. Infect.* **99**, 591–601 (1987).
42. Caugant, D. A. *et al.* Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 323–330 (1994).
43. Trotter, C. L. & Greenwood, B. M. Meningococcal carriage in the African meningitis belt. *Lancet Infect Dis* **7**, 797–803 (2007).
44. Gold, R., Goldschneider, I., Lepow, M. L., Draper, T. F. & Randolph, M. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. *J. Infect. Dis.* **137**, 112–121 (1978).
45. Christensen, H., May, M., Bowen, L., Hickman, M. & Trotter, C. L. Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **10**, 853–861 (2010).
46. Rake, G. Studies on meningococcus infection : VI. The carrier problem. *J. Exp. Med.* **59**, 553–576 (1934).
47. Greenfield, S., Sheehe, P. R. & Feldman, H. A. Meningococcal carriage in a population of ‘normal’ families. *J. Infect. Dis.* **123**, 67–73 (1971).
48. Caugant, D. A. *et al.* Pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* in 2-19-year-old individuals in Uganda. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**, 1159–1163 (2006).
49. Glitza, I. C. *et al.* Longitudinal study of meningococcal carrier rates in teenagers. *Int J Hyg Environ Health* **211**, 263–272 (2008).
50. Cartwright, K. A. Meningococcal carriage and disease. In: Cartwright K, editor. Meningococcal disease. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons; 114–146. (1995).
51. Stephens, D. S. Uncloaking the meningococcus: dynamics of carriage and disease. *Lancet* **353**, 941–942 (1999).
52. Goldschneider, I., Gotschlich, E. C. & Artenstein, M. S. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *J. Exp. Med.* **129**, 1327–1348 (1969).
53. Reller, L. B., MacGregor, R. R. & Beaty, H. N. Bactericidal antibody after colonization with *Neisseria meningitidis*. *J. Infect. Dis.* **127**, 56–62 (1973).
54. Rosenstein, N. E., Perkins, B. A., Stephens, D. S., Popovic, T. & Hughes, J. M. Meningococcal disease. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1378–1388 (2001).
55. McIntyre, P. B., O'Brien, K. L., Greenwood, B. & van de Beek, D. Effect of vaccines on bacterial meningitis worldwide. *Lancet* **380**, 1703–1711 (2012).
56. Zarantonelli, M. L. *et al.* Hyperinvasive genotypes of *Neisseria meningitidis* in France. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 467–472 (2008).
57. Trivedi, K., Tang, C. M. & Exley, R. M. Mechanisms of meningococcal colonisation. *Trends Microbiol.* **19**, 456–463 (2011).
58. Coureuil, M., Lécuyer, H., Bourdoulous, S. & Nassif, X. A journey into the brain: insight into how bacterial pathogens cross blood-brain barriers. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 149–159 (2017).
59. Goldschneider, I., Gotschlich, E. C. & Artenstein, M. S. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J. Exp. Med.* **129**, 1307–1326 (1969).

60. Ellison, R. T., Kohler, P. F., Curd, J. G., Judson, F. N. & Reller, L. B. Prevalence of congenital or acquired complement deficiency in patients with sporadic meningococcal disease. *N. Engl. J. Med.* **308**, 913–916 (1983).
61. Emonts, M., Hazelzet, J. A., de Groot, R. & Hermans, P. W. M. Host genetic determinants of *Neisseria meningitidis* infections. *Lancet Infect Dis* **3**, 565–577 (2003).
62. Brouwer, M. C. *et al.* Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **9**, 31–44 (2009).
63. Griffiss, J. M. Bactericidal activity of meningococcal antisera. Blocking by IgA of lytic antibody in human convalescent sera. *J. Immunol.* **114**, 1779–1784 (1975).
64. Stephens, D. S. *et al.* Sporadic meningococcal disease in adults: results of a 5-year population-based study. *Ann. Intern. Med.* **123**, 937–940 (1995).
65. Young, L. S., LaForce, F. M., Head, J. J., Feeley, J. C. & Bennett, J. V. A simultaneous outbreak of meningococcal and influenza infections. *N. Engl. J. Med.* **287**, 5–9 (1972).
66. Moore, P. S. *et al.* Respiratory viruses and mycoplasma as cofactors for epidemic group A meningococcal meningitis. *JAMA* **264**, 1271–1275 (1990).
67. MacLennan, J. *et al.* Social behavior and meningococcal carriage in British teenagers. *Emerging Infect. Dis.* **12**, 950–957 (2006).
68. Blackwell, C. C. *et al.* Secretor status, smoking and carriage of *Neisseria meningitidis*. *Epidemiol. Infect.* **104**, 203–209 (1990).
69. Andersen, J., Berthelsen, L., Bech Jensen, B. & Lind, I. Dynamics of the meningococcal carrier state and characteristics of the carrier strains: a longitudinal study within three cohorts of military recruits. *Epidemiol. Infect.* **121**, 85–94 (1998).
70. Olcén, P., Kjellander, J., Danielsson, D. & Lindquist, B. L. Epidemiology of *Neisseria meningitidis*; prevalence and symptoms from the upper respiratory tract in family members to patients with meningococcal disease. *Scand. J. Infect. Dis.* **13**, 105–109 (1981).
71. Moore, P. S., Reeves, M. W., Schwartz, B., Gellin, B. G. & Broome, C. V. Intercontinental spread of an epidemic group A *Neisseria meningitidis* strain. *Lancet* **2**, 260–263 (1989).
72. Greenwood, B. M., Blakebrough, I. S., Bradley, A. K., Wali, S. & Whittle, H. C. Meningococcal disease and season in sub-Saharan Africa. *Lancet* **1**, 1339–1342 (1984).
73. Greenwood, B. M., Bradley, A. K. & Wall, R. A. Meningococcal disease and season in sub-Saharan Africa. *Lancet* **2**, 829–830 (1985).
74. Artenstein, M. S., Rust, J. H., Hunter, D. H., Lamson, T. H. & Buescher, E. L. Acute respiratory disease and meningococcal infection in army recruits. *JAMA* **201**, 1004–1007 (1967).
75. Cartwright, K. A. *et al.* Influenza A and meningococcal disease. *Lancet* **338**, 554–557 (1991).
76. Thompson, M. J. *et al.* Clinical recognition of meningococcal disease in children and adolescents. *Lancet* **367**, 397–403 (2006).
77. van Deuren, M. & Brandtzaeg, P. Parents' and GPs' key role in diagnosis of meningococcal septicaemia. *Lancet* **356**, 954–955 (2000).
78. Pace, D. & Pollard, A. J. Meningococcal disease: clinical presentation and sequelae. *Vaccine* **30 Suppl 2**, B3–9 (2012).
79. Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P., Espevik, T. & Waage, A. Molecular mechanisms in the compartmentalized inflammatory response presenting as meningococcal meningitis or septic shock. *Microb. Pathog.* **13**, 423–431 (1992).

80. Wong, V. K., Hitchcock, W. & Mason, W. H. Meningococcal infections in children: a review of 100 cases. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **8**, 224–227 (1989).
81. Valmari, P., Peltola, H., Ruuskanen, O. & Korvenranta, H. Childhood bacterial meningitis: initial symptoms and signs related to age, and reasons for consulting a physician. *Eur. J. Pediatr.* **146**, 515–518 (1987).
82. Granier, S., Owen, P. & Stott, N. C. Recognizing meningococcal disease: the case for further research in primary care. *Br J Gen Pract* **48**, 1167–1171 (1998).
83. Pathan, N., Faust, S. N. & Levin, M. Pathophysiology of meningococcal meningitis and septicaemia. *Arch. Dis. Child.* **88**, 601–607 (2003).
84. Adcock, D. M. & Hicks, M. J. Dermatopathology of skin necrosis associated with purpura fulminans. *Semin. Thromb. Hemost.* **16**, 283–292 (1990).
85. Sotto, M. N., Langer, B., Hoshino-Shimizu, S. & de Brito, T. Pathogenesis of cutaneous lesions in acute meningococemia in humans: light, immunofluorescent, and electron microscopic studies of skin biopsy specimens. *J. Infect. Dis.* **133**, 506–514 (1976).
86. Wheeler, J. S., Anderson, B. J. & De Chalain, T. M. B. Surgical interventions in children with meningococcal purpura fulminans--a review of 117 procedures in 21 children. *J. Pediatr. Surg.* **38**, 597–603 (2003).
87. Vienne, P. *et al.* The role of particular strains of *Neisseria meningitidis* in meningococcal arthritis, pericarditis, and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **37**, 1639–1642 (2003).
88. Moreno, G. *et al.* [Clinical characterization of cases with meningococcal disease by W135 group in Chile, 2012]. *Rev Chilena Infectol* **30**, 350–360 (2013).
89. Edmond, K. *et al.* Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **10**, 317–328 (2010).
90. Koomen, I. *et al.* Neuropsychology of academic and behavioural limitations in school-age survivors of bacterial meningitis. *Dev Med Child Neurol* **46**, 724–732 (2004).
91. Douglas, S. A., Sanli, H. & Gibson, W. P. R. Meningitis resulting in hearing loss and labyrinthitis ossificans - does the causative organism matter? *Cochlear Implants Int* **9**, 90–96 (2008).
92. Buysse, C. M. P. *et al.* Long-term skin scarring and orthopaedic sequelae in survivors of meningococcal septic shock. *Arch. Dis. Child.* **94**, 381–386 (2009).
93. Belthur, M. V., Bradish, C. F. & Gibbons, P. J. Late orthopaedic sequelae following meningococcal septicaemia. A multicentre study. *J Bone Joint Surg Br* **87**, 236–240 (2005).
94. Slack, R. *et al.* Long-term outcome of meningococcal sepsis-associated acute renal failure. *Pediatr Crit Care Med* **6**, 477–479 (2005).
95. Schiffel, H. & Fischer, R. Five-year outcomes of severe acute kidney injury requiring renal replacement therapy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **23**, 2235–2241 (2008).
96. Metzker, M. L. Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 31–46 (2010).
97. Pop, M. & Salzberg, S. L. Bioinformatics challenges of new sequencing technology. *Trends Genet.* **24**, 142–149 (2008).
98. Trapnell, C. & Salzberg, S. L. How to map billions of short reads onto genomes. *Nat. Biotechnol.* **27**, 455–457 (2009).
99. Chaisson, M. J., Brinza, D. & Pevzner, P. A. De novo fragment assembly with short mate-paired reads: Does the read length matter? *Genome Res.* **19**, 336–346 (2009).

100. Schoen, C., Tettelin, H., Parkhill, J. & Frosch, M. Genome flexibility in *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* **27 Suppl 2**, B103–11 (2009).
101. Tettelin, H. *et al.* Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* **287**, 1809–1815 (2000).
102. Parkhill, J. *et al.* Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. *Nature* **404**, 502–506 (2000).
103. Schoen, C. *et al.* Whole-genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence evolution in *Neisseria meningitidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 3473–3478 (2008).
104. Peng, J. *et al.* Characterization of ST-4821 complex, a unique *Neisseria meningitidis* clone. *Genomics* **91**, 78–87 (2008).
105. Bentley, S. D. *et al.* Meningococcal genetic variation mechanisms viewed through comparative analysis of serogroup C strain FAM18. *PLoS Genet.* **3**, e23 (2007).
106. Jolley, K. A. & Maiden, M. C. J. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* **11**, 595 (2010).
107. Marri, P. R. *et al.* Genome sequencing reveals widespread virulence gene exchange among human *Neisseria* species. *PLoS ONE* **5**, e11835 (2010).
108. Maiden, M. C., Malorny, B. & Achtman, M. A global gene pool in the *neisseriae*. *Mol. Microbiol.* **21**, 1297–1298 (1996).
109. Saunders, N. J. *et al.* Repeat-associated phase variable genes in the complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* strain MC58. *Mol. Microbiol.* **37**, 207–215 (2000).
110. Richardson, A. R. & Stojiljkovic, I. Mismatch repair and the regulation of phase variation in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **40**, 645–655 (2001).
111. Snyder, L. A., Butcher, S. A. & Saunders, N. J. Comparative whole-genome analyses reveal over 100 putative phase-variable genes in the pathogenic *Neisseria* spp. *Microbiology (Reading, Engl.)* **147**, 2321–2332 (2001).
112. Moxon, R., Bayliss, C. & Hood, D. Bacterial contingency loci: the role of simple sequence DNA repeats in bacterial adaptation. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 307–333 (2006).
113. Hammerschmidt, S. *et al.* Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol. Microbiol.* **20**, 1211–1220 (1996).
114. Jonsson, A. B., Nyberg, G. & Normark, S. Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in *pilC*, a novel gene for pilus assembly. *EMBO J.* **10**, 477–488 (1991).
115. Jennings, M. P. *et al.* The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology (Reading, Engl.)* **145 (Pt 11)**, 3013–3021 (1999).
116. van der Ende, A. *et al.* Variable expression of class 1 outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by variation in the spacing between the -10 and -35 regions of the promoter. *J. Bacteriol.* **177**, 2475–2480 (1995).
117. van der Ende, A., Hopman, C. T. & Dankert, J. Multiple mechanisms of phase variation of PorA in *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* **68**, 6685–6690 (2000).
118. Sarkari, J., Pandit, N., Moxon, E. R. & Achtman, M. Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine. *Mol. Microbiol.* **13**, 207–217 (1994).
119. Belland, R. J., Morrison, S. G., Carlson, J. H. & Hogan, D. M. Promoter strength influences phase variation of neisserial opa genes. *Mol. Microbiol.* **23**, 123–135 (1997).

120. Richardson, A. R. & Stojiljkovic, I. HmbR, a hemoglobin-binding outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*, undergoes phase variation. *J. Bacteriol.* **181**, 2067–2074 (1999).
121. Lewis, L. A. *et al.* Phase variation of HpuAB and HmbR, two distinct haemoglobin receptors of *Neisseria meningitidis* DNM2. *Mol. Microbiol.* **32**, 977–989 (1999).
122. Siena, E. *et al.* In-silico prediction and deep-DNA sequencing validation indicate phase variation in 115 *Neisseria meningitidis* genes. *BMC Genomics* **17**, 843 (2016).
123. Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V. & Rappuoli, R. The microbial pan-genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 589–594 (2005).
124. Skovgaard, M., Jensen, L. J., Brunak, S., Ussery, D. & Krogh, A. On the total number of genes and their length distribution in complete microbial genomes. *Trends Genet.* **17**, 425–428 (2001).
125. Baart, G. J. Towards a *Neisseria meningitidis* B vaccine. 1–290 (2008).
126. Sun, Y. H., Bakshi, S., Chalmers, R. & Tang, C. M. Functional genomics of *Neisseria meningitidis* pathogenesis. *Nat. Med.* **6**, 1269–1273 (2000).
127. Stabler, R. A. *et al.* Identification of pathogen-specific genes through microarray analysis of pathogenic and commensal *Neisseria* species. *Microbiology (Reading, Engl.)* **151**, 2907–2922 (2005).
128. Dunning Hotopp, J. C. *et al.* Comparative genomics of *Neisseria meningitidis*: core genome, islands of horizontal transfer and pathogen-specific genes. *Microbiology (Reading, Engl.)* **152**, 3733–3749 (2006).
129. Joseph, B. *et al.* Comparative genome biology of a serogroup B carriage and disease strain supports a polygenic nature of meningococcal virulence. *J. Bacteriol.* **192**, 5363–5377 (2010).
130. Joseph, B. *et al.* Virulence evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis* by recombination in the core and accessory genome. *PLoS ONE* **6**, e18441 (2011).
131. Echenique-Rivera, H. *et al.* Transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* in human whole blood and mutagenesis studies identify virulence factors involved in blood survival. *PLoS Pathog.* **7**, e1002027 (2011).
132. Ampattu, B. J. *et al.* Transcriptomic buffering of cryptic genetic variation contributes to meningococcal virulence. *BMC Genomics* **18**, 282 (2017).
133. Liu, T. Y., Gotschlich, E. C., Dunne, F. T. & Jonssen, E. K. Studies on the meningococcal polysaccharides. II. Composition and chemical properties of the group B and group C polysaccharide. *J. Biol. Chem.* **246**, 4703–4712 (1971).
134. Bhattacharjee, A. K., Jennings, H. J., Kenny, C. P., Martin, A. & Smith, I. C. Structural determination of the polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups Y, W-135, and BO1. *Can. J. Biochem.* **54**, 1–8 (1976).
135. Liu, T. Y., Gotschlich, E. C., Jonssen, E. K. & Wysocki, J. R. Studies on the meningococcal polysaccharides. I. Composition and chemical properties of the group A polysaccharide. *J. Biol. Chem.* **246**, 2849–2858 (1971).
136. Bundle, D. R., Smith, I. C. & Jennings, H. J. Determination of the structure and conformation of bacterial polysaccharides by carbon 13 nuclear magnetic resonance. Studies on the group-specific antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups A and X. *J. Biol. Chem.* **249**, 2275–2281 (1974).
137. Stephens, D. S., Spellman, P. A. & Swartley, J. S. Effect of the (alpha 2-->8)-linked polysialic acid capsule on adherence of *Neisseria meningitidis* to human mucosal cells. *J. Infect. Dis.* **167**, 475–479 (1993).
138. Spinosa, M. R. *et al.* The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells. *Infect. Immun.* **75**, 3594–3603 (2007).

139. Lewis, L. A. & Ram, S. Meningococcal disease and the complement system. *Virulence* **5**, 98–126 (2014).
140. Harrison, O. B. *et al.* Description and nomenclature of *Neisseria meningitidis* capsule locus. *Emerging Infect. Dis.* **19**, 566–573 (2013).
141. Swartley, J. S. *et al.* Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 271–276 (1997).
142. Stephens, D. S., Whitney, A. M., Rothbard, J. & Schoolnik, G. K. Pili of *Neisseria meningitidis*. Analysis of structure and investigation of structural and antigenic relationships to gonococcal pili. *J. Exp. Med.* **161**, 1539–1553 (1985).
143. Brown, D. R., Helaine, S., Carbonnelle, E. & Pelicic, V. Systematic functional analysis reveals that a set of seven genes is involved in fine-tuning of the multiple functions mediated by type IV pili in *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* **78**, 3053–3063 (2010).
144. Rudel, T., Scheurerpflug, I. & Meyer, T. F. *Neisseria* PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin. *Nature* **373**, 357–359 (1995).
145. Winther-Larsen, H. C. *et al.* A conserved set of pilin-like molecules controls type IV pilus dynamics and organelle-associated functions in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* **56**, 903–917 (2005).
146. Strom, M. S., Nunn, D. N. & Lory, S. A single bifunctional enzyme, PilD, catalyzes cleavage and N-methylation of proteins belonging to the type IV pilin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 2404–2408 (1993).
147. Wolfgang, M., van Putten, J. P., Hayes, S. F., Dorward, D. & Koomey, M. Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili. *EMBO J.* **19**, 6408–6418 (2000).
148. Stephens, D. S. & McGee, Z. A. Attachment of *Neisseria meningitidis* to human mucosal surfaces: influence of pili and type of receptor cell. *J. Infect. Dis.* **143**, 525–532 (1981).
149. Melican, K., Michea Veloso, P., Martin, T., Bruneval, P. & Duménil, G. Adhesion of *Neisseria meningitidis* to dermal vessels leads to local vascular damage and purpura in a humanized mouse model. *PLoS Pathog.* **9**, e1003139 (2013).
150. Seifert, H. S., Ajioka, R. S., Paruchuri, D., Heffron, F. & So, M. Shuttle mutagenesis of *Neisseria gonorrhoeae*: pilin null mutations lower DNA transformation competence. *J. Bacteriol.* **172**, 40–46 (1990).
151. Griffiss, J. M. *et al.* Lipooligosaccharides: the principal glycolipids of the neisserial outer membrane. *Rev. Infect. Dis.* **10 Suppl 2**, S287–95 (1988).
152. Kahler, C. M. & Stephens, D. S. Genetic basis for biosynthesis, structure, and function of meningococcal lipooligosaccharide (endotoxin). *Crit. Rev. Microbiol.* **24**, 281–334 (1998).
153. Massari, P., Ram, S., Macleod, H. & Wetzler, L. M. The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. *Trends Microbiol.* **11**, 87–93 (2003).
154. Lehmann, A. K. *et al.* Human opsonins induced during meningococcal disease recognize outer membrane proteins PorA and PorB. *Infect. Immun.* **67**, 2552–2560 (1999).
155. Haines, K. A. *et al.* Protein I, a translocatable ion channel from *Neisseria gonorrhoeae*, selectively inhibits exocytosis from human neutrophils without inhibiting O₂- generation. *J. Biol. Chem.* **263**, 945–951 (1988).
156. Weel, J. F. & van Putten, J. P. Fate of the major outer membrane protein P.IA in early and late events of gonococcal infection of epithelial cells. *Res. Microbiol.* **142**, 985–993 (1991).

157. Rudel, T. *et al.* Modulation of *Neisseria* porin (PorB) by cytosolic ATP/GTP of target cells: parallels between pathogen accommodation and mitochondrial endosymbiosis. *Cell* **85**, 391–402 (1996).
158. van Putten, J. P., Duensing, T. D. & Carlson, J. Gonococcal invasion of epithelial cells driven by P.IA, a bacterial ion channel with GTP binding properties. *J. Exp. Med.* **188**, 941–952 (1998).
159. Snapper, C. M., Rosas, F. R., Kehry, M. R., Mond, J. J. & Wetzler, L. M. Neisserial porins may provide critical second signals to polysaccharide-activated murine B cells for induction of immunoglobulin secretion. *Infect. Immun.* **65**, 3203–3208 (1997).
160. Wetzler, L. M. Innate immune function of the neisserial porins and the relationship to vaccine adjuvant activity. *Future Microbiol* **5**, 749–758 (2010).
161. Claassen, I. *et al.* Production, characterization and control of a *Neisseria meningitidis* hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine. *Vaccine* **14**, 1001–1008 (1996).
162. Callaghan, M. J., Jolley, K. A. & Maiden, M. C. J. Opacity-associated adhesin repertoire in hyperinvasive *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* **74**, 5085–5094 (2006).
163. Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D. J., Achtman, M. & Moxon, E. R. Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol. Microbiol.* **10**, 499–510 (1993).
164. Virji, M. *et al.* Expression of the Opc protein correlates with invasion of epithelial and endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **6**, 2785–2795 (1992).
165. Virji, M., Watt, S. M., Barker, S., Makepeace, K. & Doyonnas, R. The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* **22**, 929–939 (1996).
166. Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. & Meyer, T. F. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**, 458–462 (1987).
167. Klauser, T., Krämer, J., Otzelberger, K., Pohlner, J. & Meyer, T. F. Characterization of the *Neisseria* Iga beta-core. The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion. *J. Mol. Biol.* **234**, 579–593 (1993).
168. Loveless, B. J. & Saier, M. H. A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Mol. Membr. Biol.* **14**, 113–123 (1997).
169. Besbes, A. *et al.* Hyperinvasive Meningococci Induce Intra-nuclear Cleavage of the NF- κ B Protein p65/RelA by Meningococcal IgA Protease. *PLoS Pathog.* **11**, e1005078 (2015).
170. Finkelstein, R. A., Sciortino, C. V. & McIntosh, M. A. Role of iron in microbe-host interactions. *Rev. Infect. Dis.* **5 Suppl 4**, S759–77 (1983).
171. Weinberg, E. D. Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. *Physiol. Rev.* **64**, 65–102 (1984).
172. Otto, B. R., Verweij-van Vught, A. M. & MacLaren, D. M. Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**, 217–233 (1992).
173. Mickelsen, P. A. & Sparling, P. F. Ability of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and commensal *Neisseria* species to obtain iron from transferrin and iron compounds. *Infect. Immun.* **33**, 555–564 (1981).
174. Mickelsen, P. A., Blackman, E. & Sparling, P. F. Ability of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and commensal *Neisseria* species to obtain iron from lactoferrin. *Infect. Immun.* **35**, 915–920 (1982).

175. Dyer, D. W., West, E. P. & Sparling, P. F. Effects of serum carrier proteins on the growth of pathogenic *neisseriae* with heme-bound iron. *Infect. Immun.* **55**, 2171–2175 (1987).
176. Stojiljkovic, I. *et al.* The *Neisseria meningitidis* haemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol. Microbiol.* **15**, 531–541 (1995).
177. Lewis, L. A. & Dyer, D. W. Identification of an iron-regulated outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in the utilization of hemoglobin complexed to haptoglobin. *J. Bacteriol.* **177**, 1299–1306 (1995).
178. Perkins-Balding, D., Ratliff-Griffin, M. & Stojiljkovic, I. Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 154–171 (2004).
179. Legrain, M. *et al.* Cloning and characterization of *Neisseria meningitidis* genes encoding the transferrin-binding proteins Tbp1 and Tbp2. *Gene* **130**, 73–80 (1993).
180. Pettersson, A., Klarenbeek, V., van Deurzen, J., Poolman, J. T. & Tommassen, J. Molecular characterization of the structural gene for the lactoferrin receptor of the meningococcal strain H44/76. *Microb. Pathog.* **17**, 395–408 (1994).
181. Pettersson, A., Prinz, T., Umar, A., van der Biezen, J. & Tommassen, J. Molecular characterization of LbpB, the second lactoferrin-binding protein of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **27**, 599–610 (1998).
182. Retzer, M. D., Yu, R. H., Zhang, Y., Gonzalez, G. C. & Schryvers, A. B. Discrimination between apo and iron-loaded forms of transferrin by transferrin binding protein B and its N-terminal subfragment. *Microb. Pathog.* **25**, 175–180 (1998).
183. Lewis, L. A., Gray, E., Wang, Y. P., Roe, B. A. & Dyer, D. W. Molecular characterization of hpuAB, the haemoglobin-haptoglobin-utilization operon of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **23**, 737–749 (1997).
184. Tauseef, I. *et al.* Influence of the combination and phase variation status of the haemoglobin receptors HmbR and HpuAB on meningococcal virulence. *Microbiology (Reading, Engl.)* **157**, 1446–1456 (2011).
185. Chen, C.-J., Mclean, D., Thomas, C. E., Anderson, J. E. & Sparling, P. F. Point mutations in HpuB enable gonococcal HpuA deletion mutants to grow on hemoglobin. *J. Bacteriol.* **184**, 420–426 (2002).
186. Stojiljkovic, I., Larson, J., Hwa, V., Anic, S. & So, M. HmbR outer membrane receptors of pathogenic *Neisseria* spp.: iron-regulated, hemoglobin-binding proteins with a high level of primary structure conservation. *J. Bacteriol.* **178**, 4670–4678 (1996).
187. Maiden, M. C. & Feavers, I. M. Meningococcal typing. *J. Med. Microbiol.* **40**, 157–158 (1994).
188. Holmes, E. C., Urwin, R. & Maiden, M. C. The influence of recombination on the population structure and evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 741–749 (1999).
189. Caugant, D. A. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS* **106**, 505–525 (1998).
190. Feil, E., Carpenter, G. & Spratt, B. G. Electrophoretic variation in adenylate kinase of *Neisseria meningitidis* is due to inter- and intraspecies recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 10535–10539 (1995).
191. Jolley, K. A. *et al.* Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 4492–4498 (2000).
192. Caugant, D. A. *et al.* Multilocus genotypes determined by enzyme electrophoresis of *Neisseria meningitidis* isolated from patients with systemic disease and from healthy carriers. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 641–652 (1986).

193. Caugant, D. A. *et al.* Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 4927–4931 (1986).
194. Caugant, D. A. *et al.* Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J. Bacteriol.* **169**, 2781–2792 (1987).
195. Caugant, D. A., Kristiansen, B. E., Frøholm, L. O., Bøvre, K. & Selander, R. K. Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. *Infect. Immun.* **56**, 2060–2068 (1988).
196. Yazdankhah, S. P. *et al.* Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5146–5153 (2004).
197. Gupta, S. *et al.* The maintenance of strain structure in populations of recombining infectious agents. *Nat. Med.* **2**, 437–442 (1996).
198. Urwin, R. *et al.* Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococci: implications for vaccine design. *Infect. Immun.* **72**, 5955–5962 (2004).
199. Buckee, C. O., Gupta, S., Kriz, P., Maiden, M. C. J. & Jolley, K. A. Long-term evolution of antigen repertoires among carried meningococci. *Proc. Biol. Sci.* **277**, 1635–1641 (2010).
200. Buckee, C. O., Recker, M., Watkins, E. R. & Gupta, S. Role of stochastic processes in maintaining discrete strain structure in antigenically diverse pathogen populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 15504–15509 (2011).
201. Pizza, M. *et al.* Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* **287**, 1816–1820 (2000).
202. Craven, D. E. *et al.* Adherence of isolates of *Neisseria meningitidis* from patients and carriers to human buccal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **142**, 556–568 (1980).
203. Merz, A. J., Enns, C. A. & So, M. Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque formation in epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **32**, 1316–1332 (1999).
204. Morand, P. C., Drab, M., Rajalingam, K., Nassif, X. & Meyer, T. F. *Neisseria meningitidis* differentially controls host cell motility through PilC1 and PilC2 components of type IV Pili. *PLoS ONE* **4**, e6834 (2009).
205. Bartley, S. N. *et al.* Attachment and invasion of *Neisseria meningitidis* to host cells is related to surface hydrophobicity, bacterial cell size and capsule. *PLoS ONE* **8**, e55798 (2013).
206. Hammerschmidt, S. *et al.* Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *EMBO J.* **15**, 192–198 (1996).
207. Caugant, D. A., Tzanakaki, G. & Kriz, P. Lessons from meningococcal carriage studies. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 52–63 (2007).
208. Claus, H., Maiden, M. C. J., Maag, R., Frosch, M. & Vogel, U. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology (Reading, Engl.)* **148**, 1813–1819 (2002).
209. Vogel, U. *et al.* Bacteremia in an immunocompromised patient caused by a commensal *Neisseria meningitidis* strain harboring the capsule null locus (cni). *J. Clin. Microbiol.* **42**, 2898–2901 (2004).
210. Hoang, L. M. N. *et al.* Rapid and fatal meningococcal disease due to a strain of *Neisseria meningitidis* containing the capsule null locus. *Clin. Infect. Dis.* **40**, e38–42 (2005).

211. Findlow, H. *et al.* Three cases of invasive meningococcal disease caused by a capsule null locus strain circulating among healthy carriers in Burkina Faso. *J. Infect. Dis.* **195**, 1071–1077 (2007).
212. Hubert, K. *et al.* Opc expression, LPS immunotype switch and pilin conversion contribute to serum resistance of unencapsulated meningococci. *PLoS ONE* **7**, e45132 (2012).
213. Tsai, C.-M., Kao, G. & Zhu, P. Influence of the length of the lipooligosaccharide alpha chain on its sialylation in *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* **70**, 407–411 (2002).
214. Veyrier, F. J., Boneca, I. G., Cellier, M. F. & Taha, M.-K. A novel metal transporter mediating manganese export (MntX) regulates the Mn to Fe intracellular ratio and *Neisseria meningitidis* virulence. *PLoS Pathog.* **7**, e1002261 (2011).
215. Guilhen, C., Taha, M.-K. & Veyrier, F. J. Role of transition metal exporters in virulence: the example of *Neisseria meningitidis*. *Front Cell Infect Microbiol* **3**, 102 (2013).
216. Bidmos, F. A. *et al.* Investigation into the Antigenic Properties and Contributions to Growth in Blood of the Meningococcal Haemoglobin Receptors, HpuAB and HmbR. *PLoS ONE* **10**, e0133855 (2015).
217. Mebius, R. E. & Kraal, G. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 606–616 (2005).
218. Thompson, S. A., Wang, L. L., West, A. & Sparling, P. F. *Neisseria meningitidis* produces iron-regulated proteins related to the RTX family of exoproteins. *J. Bacteriol.* **175**, 811–818 (1993).
219. Osicka, R., Kalmusova, J., Krizová, P. & Sebo, P. *Neisseria meningitidis* RTX protein FrpC induces high levels of serum antibodies during invasive disease: polymorphism of frpC alleles and purification of recombinant FrpC. *Infect. Immun.* **69**, 5509–5519 (2001).
220. Welch, R. A. RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **257**, 85–111 (2001).
221. Paruchuri, D. K., Seifert, H. S., Ajioka, R. S., Karlsson, K. A. & So, M. Identification and characterization of a *Neisseria gonorrhoeae* gene encoding a glycolipid-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 333–337 (1990).
222. Jamet, A. *et al.* A new family of secreted toxins in pathogenic *Neisseria* species. *PLoS Pathog.* **11**, e1004592 (2015).
223. Arenas, J. *et al.* Fratricide activity of MafB protein of *N. meningitidis* strain B16B6. *BMC Microbiol.* **15**, 156 (2015).
224. Jackson, A. P., Thomas, G. H., Parkhill, J. & Thomson, N. R. Evolutionary diversification of an ancient gene family (rhs) through C-terminal displacement. *BMC Genomics* **10**, 584 (2009).
225. Poole, S. J. *et al.* Identification of functional toxin/immunity genes linked to contact-dependent growth inhibition (CDI) and rearrangement hotspot (Rhs) systems. *PLoS Genet.* **7**, e1002217 (2011).
226. Koskiniemi, S. *et al.* Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 7032–7037 (2013).
227. Koskiniemi, S. *et al.* Selection of orphan Rhs toxin expression in evolved *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS Genet.* **10**, e1004255 (2014).
228. Roupheal, N. G. & Stephens, D. S. *Neisseria meningitidis*: biology, microbiology, and epidemiology. *Methods Mol. Biol.* **799**, 1–20 (2012).
229. Flexner, S. & Jobling, J. W. An analysis of four hundred cases of epidemic meningitis treated with the anti-meningitis serum. *J. Exp. Med.* **10**, 690–733 (1908).

230. Harrison, L. H., Trotter, C. L. & Ramsay, M. E. Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine* **27 Suppl 2**, B51–63 (2009).
231. Halperin, S. A. *et al.* The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine* **30 Suppl 2**, B26–36 (2012).
232. Borrow, R. *et al.* The Global Meningococcal Initiative: global epidemiology, the impact of vaccines on meningococcal disease and the importance of herd protection. *Expert Rev Vaccines* **16**, 313–328 (2017).
233. Maiden, M. C. J. *et al.* MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 728–736 (2013).
234. Molesworth, A. M., Cuevas, L. E., Connor, S. J., Morse, A. P. & Thomson, M. C. Environmental risk and meningitis epidemics in Africa. *Emerging Infect. Dis.* **9**, 1287–1293 (2003).
235. Lapeyssonnie, L. [Cerebrospinal meningitis in Africa]. *Bull. World Health Organ.* **28 Suppl**, 1–114 (1963).
236. Caugant, D. A. & Nicolas, P. Molecular surveillance of meningococcal meningitis in Africa. *Vaccine* **25 Suppl 1**, A8–11 (2007).
237. Achtman, M. Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*. *Trends Microbiol.* **3**, 186–192 (1995).
238. Zhu, P. *et al.* Fit genotypes and escape variants of subgroup III *Neisseria meningitidis* during three pandemics of epidemic meningitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 5234–5239 (2001).
239. Tikhomirov, E., Santamaria, M. & Esteves, K. Meningococcal disease: public health burden and control. *World Health Stat Q* **50**, 170–177 (1997).
240. Decosas, J. & Koama, J.-B. T. Chronicle of an outbreak foretold: meningococcal meningitis W135 in Burkina Faso. *Lancet Infect Dis* **2**, 763–765 (2002).
241. Mayer, L. W. *et al.* Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. *J. Infect. Dis.* **185**, 1596–1605 (2002).
242. Traoré, Y. *et al.* The rise and fall of epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup W135 meningitis in Burkina Faso, 2002–2005. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 817–822 (2006).
243. Marc LaForce, F., Ravenscroft, N., Djingarey, M. & Viviani, S. Epidemic meningitis due to Group A *Neisseria meningitidis* in the African meningitis belt: a persistent problem with an imminent solution. *Vaccine* **27 Suppl 2**, B13–9 (2009).
244. Caugant, D. A. *et al.* Molecular characterization of invasive meningococcal isolates from countries in the African meningitis belt before introduction of a serogroup A conjugate vaccine. *PLoS ONE* **7**, e46019 (2012).
245. Djingarey, M. H. *et al.* Introduction and Rollout of a New Group A Meningococcal Conjugate Vaccine (PsA-TT) in African Meningitis Belt Countries, 2010–2014. *Clin. Infect. Dis.* **61 Suppl 5**, S434–41 (2015).
246. LaForce, F. M., Djingarey, M., Viviani, S. & Preziosi, M.-P. Successful African introduction of a new Group A meningococcal conjugate vaccine: Future challenges and next steps. *Hum Vaccin Immunother* **50**, 1–5 (2017).
247. Whittle, H. C. & Greenwood, B. M. Meningococcal meningitis in the northern savanna of Africa. *Trop Doct* **6**, 99–104 (1976).
248. Broome, C. V. *et al.* Epidemic group C meningococcal meningitis in Upper Volta, 1979. *Bull. World Health Organ.* **61**, 325–330 (1983).
249. Funk, A. *et al.* Sequential outbreaks due to a new strain of *Neisseria meningitidis* serogroup C in northern Nigeria, 2013–14. *PLoS Curr* **6**, (2014).

250. Sidikou, F. *et al.* Emergence of epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup C in Niger, 2015: an analysis of national surveillance data. *Lancet Infect Dis* **16**, 1288–1294 (2016).
251. Agnememel, A. *et al.* *Neisseria meningitidis* Serogroup X in Sub-Saharan Africa. *Emerging Infect. Dis.* **22**, 698–702 (2016).
252. Boisier, P. *et al.* Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X-related cases in 2006 in Niger. *Clin. Infect. Dis.* **44**, 657–663 (2007).
253. Delrieu, I. *et al.* Emergence of epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup X meningitis in Togo and Burkina Faso. *PLoS ONE* **6**, e19513 (2011).
254. Lewis, R. Meningococcal meningitis serogroup X: a new player in Ugandan epidemiology. *WHO Health Action in Crisis* **1:6**, (2006).
255. Materu, S. *et al.* Serogroup X in meningococcal disease, Western Kenya. *Emerging Infect. Dis.* **13**, 944–945 (2007).
256. 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).
257. Zhang, X. *et al.* Genetic characteristics of serogroup A meningococci circulating in China, 1956-2005. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 555–561 (2008).
258. Shao, Z. *et al.* Identification of a new *Neisseria meningitidis* serogroup C clone from Anhui province, China. *Lancet* **367**, 419–423 (2006).
259. Zhou, H. *et al.* Spread of *Neisseria meningitidis* serogroup W clone, China. *Emerging Infect. Dis.* **19**, 1496–1499 (2013).
260. Nair, D. *et al.* Outbreak of meningococcal disease in and around New Delhi, India, 2005-2006: a report from a tertiary care hospital. *Epidemiol. Infect.* **137**, 570–576 (2009).
261. Meningococcal disease in the Philippines - update 19 January 2005. World Health Organisation, 2005. [en ligne]. <http://www.who.int/csr/don/2005_01_19a/en/>, consulté le 10 Janvier 2018.
262. Fukusumi, M. *et al.* National surveillance for meningococcal disease in Japan, 1999-2014. *Vaccine* **34**, 4068–4071 (2016).
263. Pancharoen, C. *et al.* Epidemiology of invasive meningococcal disease in 13 government hospitals in Thailand, 1994-1999. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **31**, 708–711 (2000).
264. Raja, N. S., Parasakthi, N., Puthuchery, S. D. & Kamarulzaman, A. Invasive meningococcal disease in the University of Malaya Medical Centre, Kuala Lumpur, Malaysia. *J Postgrad Med* **52**, 23–9– discussion 29 (2006).
265. Chiou, C.-S. *et al.* Molecular epidemiology and emergence of worldwide epidemic clones of *Neisseria meningitidis* in Taiwan. *BMC Infect. Dis.* **6**, 25 (2006).
266. Sáfadi, M. A. P. & Cintra, O. A. L. Epidemiology of meningococcal disease in Latin America: current situation and opportunities for prevention. *Neurol. Res.* **32**, 263–271 (2010).
267. Sáfadi, M. A. P. *et al.* The current situation of meningococcal disease in Latin America and recommendations for a new case definition from the Global Meningococcal Initiative. *Expert Rev Vaccines* **12**, 903–915 (2013).
268. Sierra, G. V. *et al.* Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann* **14**, 195–207– discussion 208–10 (1991).
269. Rodriguez, A. P., Dickinson, F., Baly, A. & Martinez, R. The epidemiological impact of antimeningococcal B vaccination in Cuba. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94**, 433–440 (1999).

270. Climent, Y. *et al.* Clonal distribution of disease-associated and healthy carrier isolates of *Neisseria meningitidis* between 1983 and 2005 in Cuba. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 802–810 (2010).
271. McCormick, J. B. *et al.* Antibody response to serogroup A and C meningococcal polysaccharide vaccines in infants born of mothers vaccinated during pregnancy. *J. Clin. Invest.* **65**, 1141–1144 (1980).
272. de Moraes, J. C. & Barata, R. B. [Meningococcal disease in São Paulo, Brazil, in the 20th century: epidemiological characteristics]. *Cad Saude Publica* **21**, 1458–1471 (2005).
273. de Moraes, J. C. *et al.* Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. *Lancet* **340**, 1074–1078 (1992).
274. Sáfadi, M. A. P. *et al.* The epidemiology of meningococcal disease in Latin America 1945-2010: an unpredictable and changing landscape. *Epidemiol. Infect.* **141**, 447–458 (2013).
275. Lemos, A. P. S., Harrison, L. H., Lenser, M. & Sacchi, C. T. Phenotypic and molecular characterization of invasive serogroup W135 *Neisseria meningitidis* strains from 1990 to 2005 in Brazil. *J. Infect.* **60**, 209–217 (2010).
276. Pírez, M. *et al.* Control de un brote epidémico de enfermedad meningocócica por *N. meningitidis* serogrupo B. *Rev Med Uruguay* **20**, 92–101 (2004).
277. MacNeil, J. R., Blain, A. E., Wang, X. & Cohn, A. C. Current Epidemiology and Trends in Meningococcal Disease-United States, 1996-2015. *Clin. Infect. Dis.* **62**, 1 (2017).
278. Meningococcal disease. Centers for Disease Control and Prevention, 2017. [en ligne]. <<https://www.cdc.gov/meningococcal/surveillance/index.html>>, consulté le 10 janvier 2018.
279. Varughese, P. V. & Carter, A. O. Meningococcal disease in Canada. Surveillance summary to 1987. *Can Dis Wkly Rep* **15**, 89–96 (1989).
280. Enhanced surveillance of invasive meningococcal disease in Canada: 1 January, 2002, through 31 December, 2003. *Can. Commun. Dis. Rep.* **32**, 97–107 (2006).
281. Ashton, F. E. & Caugant, D. A. The panmictic nature of *Neisseria meningitidis* serogroup B during a period of endemic disease in Canada. *Can. J. Microbiol.* **47**, 283–289 (2001).
282. Law, D. K. S., Stoltz, J., Henderson, A. M. & Tsang, R. S. W. Antigenic and genetic characterization of serogroup C meningococci isolated from invasive meningococcal disease cases in Canada from 1999 to 2003. *Can. J. Microbiol.* **51**, 523–530 (2005).
283. Ashton, F. E. *et al.* Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis* serotype 2a that is associated with meningococcal group C disease in Canada. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2489–2493 (1991).
284. Tsang, R. S. W., Squires, S. G. & Tam, T. W. S. Characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive meningococcal disease cases in Canada in 2001. *Can. J. Microbiol.* **49**, 633–638 (2003).
285. An Advisory Committee Statement (ACS). Statement on recommended use of meningococcal vaccines. *Can Commun Dis Rep.* 2001;27:2–36.
286. Le Saux, N. *et al.* Profile of serogroup Y meningococcal infections in Canada: Implications for vaccine selection. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **20**, e130–4 (2009).
287. Zhou, J. *et al.* Invasive serogroup B *Neisseria meningitidis* in Quebec, Canada, 2003 to 2010: persistence of the ST-269 clone since it first emerged in 2003. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1545–1551 (2012).

288. Law, D. K. S. *et al.* Invasive meningococcal disease in Quebec, Canada, due to an emerging clone of ST-269 serogroup B meningococci with serotype antigen 17 and serosubtype antigen P1.19 (B:17:P1.19). *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2743–2749 (2006).
289. Lopez, L. & Sherwood, J. The Epidemiology of Meningococcal Disease in New Zealand in 2013-2014, Institute of Environmental Science and Research Ltd (ESR) Wellington, New Zealand. 1–50 (2014).
290. Jelfs, J. & Munro, R. Epidemiology of meningococcal disease in Australia. *J Paediatr Child Health* **37**, S3–6 (2001).
291. Lahra, M. M., Enriquez, R. P. National Neisseria Network. Australian Meningococcal Surveillance Programme annual report, 2015. *Commun Dis Intell Q Rep* **40**, E503–E511 (2016).
292. Chiu, C. *et al.* Vaccine preventable diseases in Australia, 2005 to 2007. *Commun Dis Intell Q Rep* **34 Suppl**, S1–167 (2010).
293. Slaon-Gardner, T. *et al.* Australia's notifiable disease status, 2009: annual report of the National Notifiable Diseases Surveillance System. *Commun Dis Intell Q Rep* **35**, 61–131 (2011).
294. Carville, K. S. *et al.* Increase in Meningococcal Serogroup W Disease, Victoria, Australia, 2013-2015. *Emerging Infect. Dis.* **22**, 1785–1787 (2016).
295. Baker, M. G., Martin, D. R., Kieft, C. E. & Lennon, D. A 10-year serogroup B meningococcal disease epidemic in New Zealand: descriptive epidemiology, 1991-2000. *J Paediatr Child Health* **37**, S13–9 (2001).
296. Oster, P. *et al.* MeNZB: a safe and highly immunogenic tailor-made vaccine against the New Zealand *Neisseria meningitidis* serogroup B disease epidemic strain. *Vaccine* **23**, 2191–2196 (2005).
297. The Institute of Environmental Science and Research Ltd. *Notifiable Diseases in New Zealand: Annual Report 2015* Porirua, New Zealand. 1–86 (2016).
298. The Surveillance Atlas of Infectious Disease. European Centre of Disease Prevention and Control, 2017. [en ligne]. <<http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>>, consulté le 10 Janvier 2018.
299. Kriz, P. *et al.* Changing epidemiology of meningococcal disease in Europe from the mid-20th to the early 21st Century. *Expert Rev Vaccines* **10**, 1477–1486 (2011).
300. Whittaker, R. *et al.* The epidemiology of invasive meningococcal disease in EU/EEA countries, 2004-2014. *Vaccine* **35**, 2034–2041 (2017).
301. European Centre for Disease Prevention and Control. Invasive meningococcal disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2015. Stockholm: ECDC; 2017. [en ligne]. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2015-meningococcal-disease.pdf>, consulté le 10 Janvier 2018.
302. Gray, S. J. *et al.* Epidemiology of meningococcal disease in England and Wales 1993/94 to 2003/04: contribution and experiences of the Meningococcal Reference Unit. *J. Med. Microbiol.* **55**, 887–896 (2006).
303. Berrón, S., La Fuente, De, L., Martín, E. & Vazquez, J. A. Increasing incidence of meningococcal disease in Spain associated with a new variant of serogroup C. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**, 85–89 (1998).
304. Mattheus, W., Hanquet, G., Collard, J. M., Vanhoof, R. & Bertrand, S. Changes in Meningococcal Strains in the Era of a Serogroup C Vaccination Campaign: Trends and Evolution in Belgium during the Period 1997-2012. *PLoS ONE* **10**, e0139615 (2015).
305. Miller, E., Salisbury, D. & Ramsay, M. Planning, registration, and implementation of an immunisation campaign against meningococcal serogroup C disease in the UK: a success story. *Vaccine* **20 Suppl 1**, S58–67 (2001).

306. Salisbury, D. Introduction of a conjugate meningococcal type C vaccine programme in the UK. *J Paediatr Child Health* **37**, S34–6– discussion 37 (2001).
307. Trotter, C. L. & Ramsay, M. E. Vaccination against meningococcal disease in Europe: review and recommendations for the use of conjugate vaccines. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 101–107 (2007).
308. Trotter, C. L., Andrews, N. J., Kaczmarski, E. B., Miller, E. & Ramsay, M. E. Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction. *Lancet* **364**, 365–367 (2004).
309. Larrauri, A., Cano, R., García, M. & Mateo, S. de. Impact and effectiveness of meningococcal C conjugate vaccine following its introduction in Spain. *Vaccine* **23**, 4097–4100 (2005).
310. Hellenbrand, W. *et al.* Epidemiology of invasive meningococcal disease in Germany, 2002–2010, and impact of vaccination with meningococcal C conjugate vaccine. *J. Infect.* **66**, 48–56 (2013).
311. Garrido-Esteba, M., León-Gómez, I., Herruzo, R. & Cano, R. Changes in meningococcal C epidemiology and vaccine effectiveness after vaccine introduction and schedule modification. *Vaccine* **32**, 2604–2609 (2014).
312. de Greeff, S. C., de Melker, H. E., Spanjaard, L., van den Hof, S. & Dankert, J. [The first effect of the national vaccination campaign against meningococcal-C disease: a rapid and sharp decrease in the number of patients]. *Ned Tijdschr Geneeskd* **147**, 1132–1135 (2003).
313. Cano, R. *et al.* Impact of the meningococcal C conjugate vaccine in Spain: an epidemiological and microbiological decision. *Euro Surveill.* **9**, 11–15 (2004).
314. Campbell, H., Andrews, N., Borrow, R., Trotter, C. & Miller, E. Updated postlicensure surveillance of the meningococcal C conjugate vaccine in England and Wales: effectiveness, validation of serological correlates of protection, and modeling predictions of the duration of herd immunity. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 840–847 (2010).
315. Bøvre, K. *et al.* *Neisseria meningitidis* infections in Northern Norway: an epidemic in 1974–1975 due mainly to group B organisms. *J. Infect. Dis.* **135**, 669–672 (1977).
316. Bøvre, K., Frøholm, L. O., Gaustad, P., Holten, E. & Høyby, E. A. Some agent characteristics and their coexistence related to occurrence and severity of systemic meningococcal disease in Norway, Winter 1981–1982. *NIPH Ann* **6**, 75–84 (1983).
317. Cartwright, K. A., Stuart, J. M. & Noah, N. D. An outbreak of meningococcal disease in Gloucestershire. *Lancet* **2**, 558–561 (1986).
318. Caron, F. *et al.* From tailor-made to ready-to-wear meningococcal B vaccines: longitudinal study of a clonal meningococcal B outbreak. *Lancet Infect Dis* **11**, 455–463 (2011).
319. Ladhani, S. N. *et al.* Enter B and W: two new meningococcal vaccine programmes launched. *Arch. Dis. Child.* **101**, 91–95 (2016).
320. Bröker, M. *et al.* Meningococcal serogroup Y emergence in Europe: update 2011. *Hum Vaccin Immunother* **8**, 1907–1911 (2012).
321. Bröker, M., Jacobsson, S., DeTora, L., Pace, D. & Taha, M.-K. Increase of meningococcal serogroup Y cases in Europe: a reason for concern? *Hum Vaccin Immunother* **8**, 685–688 (2012).
322. Törös, B. *et al.* Surveillance of invasive *Neisseria meningitidis* with a serogroup Y update, Sweden 2010 to 2012. *Euro Surveill.* **19**, (2014).
323. Hedberg, S. T., Törös, B., Fredlund, H., Olcén, P. & Mölling, P. Genetic characterisation of the emerging invasive *Neisseria meningitidis* serogroup Y in Sweden, 2000 to 2010. *Euro Surveill.* **16**, (2011).

324. Taha, M.-K. *et al.* Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims. *Lancet* **356**, 2159 (2000).
325. Les infections invasives à méningocoque en France en 2016. Agence nationale de santé publique, 2017. [en ligne]. <<http://invs.santepubliquefrance.fr/fr./Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-prevention-vaccinale/Infections-invasives-a-meningocoques/Donnees-epidemiologiques>>, consulté le 10 Janvier 2018.
326. Parent du Chatelet, I. *et al.* Characteristics and changes in invasive meningococcal disease epidemiology in France, 2006-2015. *J. Infect.* **74**, 564–574 (2017).
327. Haut Conseil de la santé publique. Le calendrier des vaccinations et les recommandations vaccinales 2012. Selon l'avis du Haut Conseil de la santé publique. *Bull Epidemiol Hebd* (**14-15**), 161–186
328. Haut Conseil de la santé publique. Avis du 19 octobre 2012 relatif à la vaccination contre le méningocoque du sérotype C au vu de la situation épidémiologique du Finistère. 2012. [en ligne]. <<https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=293>>, consulté le 20 Mars 2018.
329. Haut Conseil de la santé publique. Avis du 22 février 2013 relatif à la vaccination ciblée contre les infections invasives à méningocoque liées au clone B:14:P1.7,16 du complexe clonal ST-32 avec les vaccins MenBvac® et Bexsero® dans le département des Pyrénées-Atlantiques. 2013. [en ligne]. <<https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=324>>, consulté le 10 Janvier 2018.
330. Haut Conseil de la santé publique. Avis du 7 novembre 2014 relatif à la vaccination ciblée contre les infections invasives à méningocoque C au-delà de 24 ans, notamment chez les hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes (HSH). Paris: HCSP; 2014. [en ligne]. <<https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=474>>, consulté le 10 Janvier 2018.
331. Haut Conseil de la santé publique. Avis du 29 janvier 2016 relatif à la vaccination ciblée contre les infections invasives à méningocoque C au-delà de 24 ans, notamment chez les hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes (HSH) [Actualisation]. Paris: HCSP; 2016. [en ligne]. <<https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=542>>, consulté le 10 Janvier 2018.
332. Cire de Normandie. Situation épidémiologique des infections invasives à méningocoque (IIM) en Haute-Normandie en 2012, 2014. [en ligne]. <<http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Points-epidemiologiques/Tous-les-numeros/Normandie/2014/Situation-epidemiologique-des-infections-invasives-a-meningocoques-Haute-Normandie-2012>>, consulté le 27 Février 2018.
333. Perrocheau, A. *et al.* Infections à méningocoque en Seine Maritime : étude de l'augmentation des cas déclarés en 1997. *Bull Epidemiol Hebd* **20**, 77–82 (1999).
334. Bjune, G. *et al.* Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet* **338**, 1093–1096 (1991).
335. Taha, M.-K. *et al.* Use of available outer membrane vesicle vaccines to control serogroup B meningococcal outbreaks. *Vaccine* **25**, 2537–2538 (2007).

336. Ministère de la santé et des solidarités. Arrêté du 7 juin 2006 relatif à la recommandation d'une vaccination en Seine-Maritime contre les infections invasives à méningocoque B:14:P1-7,16 en application de l'article L. 3110-1 du Code de la santé publique. JORF n°132 du 9 juin 2006 page 8749, 2006. [en ligne]. <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=8BB4DF0062A50D558E090D3A23FF1311.tpdjo03v_2?cidTexte=JORFTEXT000000264156&dateTexte=20120501>, consulté le 27 Janvier 2018.
337. Avis du Comité technique des vaccinations relatif à la mise en place d'une vaccination contre les infections invasives à méningocoques B:14:P1-7,16 avec le vaccin norvégien anti méningococcique B: 15: P1-7,16 (MenBvac®) .Séance du 9 mars 2006.
338. Haut Conseil de la santé publique. Avis du 24 mars 2006 relatif à la mise en place d'une vaccination contre les infections invasives à méningocoques B:14:P1.7,16 avec le vaccin norvégien anti-méningococcique B:15:P1.7,16 (MenBvac®).
339. Retour d'expérience Hyper-endémie d'infections invasives à méningocoque B en Seine-Maritime. Ministère des Solidarités et de la Santé, 4 avril 2007 [en ligne]. <http://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/retour_experience76.pdf>, consulté 4 mai 2018.
340. Blanchard, M., Erouart, S., Parent du Châtelet, I. & Mathieu, A. Evaluation de la couverture vaccinale par le vaccin MenBvac® chez les personnes ciblées par la campagne de vaccination à Dieppe et ses environs, juin 2006-mai 2009. *Bull Epidemiol Hebd* **31-32**, 370–373 (2012).
341. Haut Conseil de la santé publique. Avis du 19 mars 2008 relatif à la vaccination contre les infections invasives à méningocoque B:14:P1.7,16 avec le vaccin MenBvac® en Seine-Maritime, dans la zone de Dieppe. 2008. [en ligne]. <<https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=35>>, consulté le 27 Janvier 2018.
342. Haut Conseil de la santé publique. Avis du 5 septembre 2008 relatif à la vaccination contre les IIM B avec le MenBvac® dans la zone de Dieppe (76). 2008. [en ligne]. <<https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=35>>, consulté le 10 Janvier 2018.
343. Haut Conseil de la santé publique. Avis du 17 octobre 2008 relatif à la vaccination en Seine-Maritime contre les infections invasives à méningocoque B et C avec le vaccin MenBvac®. 2008. [en ligne]. <<https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=52>>, consulté le 10 Janvier 2018.
344. Haut Conseil de la santé publique. Avis du 13 février 2009 relatif à la vaccination contre les IIMB en Seine-Maritime et élargissement dans la Somme. 2009. [en ligne]. <<https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=57>>, consulté le 10 Janvier 2018.
345. Haut Conseil de la santé publique. Avis du 09 septembre 2011 relatif au schéma vaccinal recommandé pour l'administration du vaccin MenBvac®. 2011. [en ligne]. <<https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=218>>, consulté le 10 Janvier 2018.
346. Vermont, C. L., van Dijken, H. H., de Groot, R., van Alphen, L. & van den Dobbelen, G. P. J. M. PorA-specific differences in antibody avidity after vaccination with a hexavalent Men B outer membrane vesicle vaccine in toddlers and school children. *Vaccine* **22**, 3008–3013 (2004).

347. 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).
348. Bilan de la surveillance des infections invasives à méningocoques (IIM) en région Normandie, 2016. Point du 6 mars 2017. [en ligne]. <<http://invs.santepubliquefrance.fr/fr/Publications-et-outils/Points-epidemiologiques/Tous-les-numeros/Normandie/2017/Surveillance-sanitaire-des-infections-invasives-a-meningocoque-en-Normandie.-Point-du-6-mars-2017>>, consulté le 27 Janvier 2018.
349. Scherp, H. W. & Rake, G. Studies on meningococcus infection : VIII. The type I specific substance. *J. Exp. Med.* **61**, 753–769 (1935).
350. Pollard, A. J. & Frasch, C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* **19**, 1327–1346 (2001).
351. Gotschlich, E. C., Liu, T. Y. & Artenstein, M. S. Human immunity to the meningococcus. 3. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides. *J. Exp. Med.* **129**, 1349–1365 (1969).
352. Gotschlich, E. C., Goldschneider, I. & Artenstein, M. S. Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *J. Exp. Med.* **129**, 1367–1384 (1969).
353. Artenstein, M. S. *et al.* Prevention of meningococcal disease by group C polysaccharide vaccine. *N. Engl. J. Med.* **282**, 417–420 (1970).
354. Gold, R., Lepow, M. L., Goldschneider, I., Draper, T. L. & Gotschlich, E. C. Clinical evaluation of group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines in infants. *J. Clin. Invest.* **56**, 1536–1547 (1975).
355. Broderick, M. P., Faix, D. J., Hansen, C. J. & Blair, P. J. Trends in meningococcal disease in the United States military, 1971–2010. *Emerging Infect. Dis.* **18**, 1430–1437 (2012).
356. Finne, J., Leinonen, M. & Mäkelä, P. H. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* **2**, 355–357 (1983).
357. Poolman, J. T. Development of a meningococcal vaccine. *Infect Agents Dis* **4**, 13–28 (1995).
358. MacLennan, J. *et al.* Immune response to revaccination with meningococcal A and C polysaccharides in Gambian children following repeated immunisation during early childhood. *Vaccine* **17**, 3086–3093 (1999).
359. Borrow, R. *et al.* Reduced antibody response to revaccination with meningococcal serogroup A polysaccharide vaccine in adults. *Vaccine* **19**, 1129–1132 (2000).
360. Richmond, P. *et al.* Meningococcal C polysaccharide vaccine induces immunologic hyporesponsiveness in adults that is overcome by meningococcal C conjugate vaccine. *J. Infect. Dis.* **181**, 761–764 (2000).
361. Granoff, D. M., Gupta, R. K., Belshe, R. B. & Anderson, E. L. Induction of immunologic refractoriness in adults by meningococcal C polysaccharide vaccination. *J. Infect. Dis.* **178**, 870–874 (1998).
362. Gotschlich, E. C., Goldschneider, I. & Artenstein, M. S. Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state. *J. Exp. Med.* **129**, 1385–1395 (1969).
363. Sivonen, A. Effect of *Neisseria meningitidis* group A polysaccharide vaccine on nasopharyngeal carrier rates. *J. Infect.* **3**, 266–272 (1981).

364. Hassan-King, M. K., Wall, R. A. & Greenwood, B. M. Meningococcal carriage, meningococcal disease and vaccination. *J. Infect.* **16**, 55–59 (1988).
365. Dellicour, S. & Greenwood, B. Systematic review: Impact of meningococcal vaccination on pharyngeal carriage of meningococci. *Trop. Med. Int. Health* **12**, 1409–1421 (2007).
366. Jennings, H. Further approaches for optimizing polysaccharide-protein conjugate vaccines for prevention of invasive bacterial disease. *J. Infect. Dis.* **165 Suppl 1**, S156–9 (1992).
367. Avery, O. T. & Goebel, W. F. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins : II. Immunological specificity of synthetic sugar-protein antigens. *J. Exp. Med.* **50**, 533–550 (1929).
368. Richmond, P. *et al.* Safety and immunogenicity of a new *Neisseria meningitidis* serogroup C-tetanus toxoid conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine* **18**, 641–646 (1999).
369. MacDonald, N. E. *et al.* Induction of immunologic memory by conjugated vs plain meningococcal C polysaccharide vaccine in toddlers: a randomized controlled trial. *JAMA* **280**, 1685–1689 (1998).
370. Richmond, P. *et al.* Meningococcal serogroup C conjugate vaccine is immunogenic in infancy and primes for memory. *J. Infect. Dis.* **179**, 1569–1572 (1999).
371. Ramsay, M. E., Andrews, N., Kaczmarski, E. B. & Miller, E. Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. *Lancet* **357**, 195–196 (2001).
372. Madore, D. V. *et al.* Safety and immunologic response to *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide-CRM197 conjugate vaccine in 1- to 6-month-old infants. *Pediatrics* **85**, 331–337 (1990).
373. Madore, D. V. *et al.* Safety and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide-CRM197 conjugate vaccine in infants aged 15 to 23 months. *Pediatrics* **86**, 527–534 (1990).
374. Balmer, P., Borrow, R. & Miller, E. Impact of meningococcal C conjugate vaccine in the UK. *J. Med. Microbiol.* **51**, 717–722 (2002).
375. Trotter, C. L., Ramsay, M. E. & Kaczmarski, E. B. Meningococcal serogroup C conjugate vaccination in England and Wales: coverage and initial impact of the campaign. *Commun Dis Public Health* **5**, 220–225 (2002).
376. Ramsay, M. E., Andrews, N. J., Trotter, C. L., Kaczmarski, E. B. & Miller, E. Herd immunity from meningococcal serogroup C conjugate vaccination in England: database analysis. *BMJ* **326**, 365–366 (2003).
377. Maiden, M. C. J. *et al.* Impact of meningococcal serogroup C conjugate vaccines on carriage and herd immunity. *J. Infect. Dis.* **197**, 737–743 (2008).
378. European Centre of Disease Prevention and Control. Meningococcal Disease: Recommended vaccinations, 2018. [en ligne]. <<https://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/Scheduler/ByDisease?SelectedDiseaseId=48&SelectedCountryIdByDisease=-1>>, consulté le 23 Janvier 2018.
379. Bilukha, O. O., Rosenstein, N. National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention and control of meningococcal disease. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* **54**, 1–21 (2005).
380. Baxter, R. *et al.* Five-year Antibody Persistence and Booster Response to a Single Dose of Meningococcal A, C, W and Y Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine in Adolescents and Young Adults: An Open, Randomized Trial. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **34**, 1236–1243 (2015).

381. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated recommendations for use of meningococcal conjugate vaccines --- Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **60**, 72–76 (2011).
382. LaForce, F. M., Konde, K., Viviani, S. & Preziosi, M.-P. The Meningitis Vaccine Project. *Vaccine* **25 Suppl 1**, A97–100 (2007).
383. Jódar, L., LaForce, F. M., Ceccarini, C., Aguado, T. & Granoff, D. M. Meningococcal conjugate vaccine for Africa: a model for development of new vaccines for the poorest countries. *Lancet* **361**, 1902–1904 (2003).
384. Sow, S. O. *et al.* Immunogenicity and safety of a meningococcal A conjugate vaccine in Africans. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2293–2304 (2011).
385. Djingarey, M. H. *et al.* Effectively introducing a new meningococcal A conjugate vaccine in Africa: the Burkina Faso experience. *Vaccine* **30 Suppl 2**, B40–5 (2012).
386. Novak, R. T. *et al.* Serogroup A meningococcal conjugate vaccination in Burkina Faso: analysis of national surveillance data. *Lancet Infect Dis* **12**, 757–764 (2012).
387. Kristiansen, P. A. *et al.* Baseline meningococcal carriage in Burkina Faso before the introduction of a meningococcal serogroup A conjugate vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 435–443 (2011).
388. Kristiansen, P. A. *et al.* Impact of the serogroup A meningococcal conjugate vaccine, MenAfriVac, on carriage and herd immunity. *Clin. Infect. Dis.* **56**, 354–363 (2013).
389. Frasch, C. E., van Alphen, L., Holst, J., Poolman, J. T. & Rosenqvist, E. Outer membrane protein vesicle vaccines for meningococcal disease. *Methods Mol. Med.* **66**, 81–107 (2001).
390. Wedege, E. *et al.* Antibody specificities and effect of meningococcal carriage in icelandic teenagers receiving the Norwegian serogroup B outer membrane vesicle vaccine. *Infect. Immun.* **71**, 3775–3781 (2003).
391. Tondella, M. L. *et al.* Distribution of *Neisseria meningitidis* serogroup B serosubtypes and serotypes circulating in the United States. The Active Bacterial Core Surveillance Team. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3323–3328 (2000).
392. Holst, J. *et al.* Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* **27 Suppl 2**, B3–12 (2009).
393. Boslego, J. *et al.* Efficacy, safety, and immunogenicity of a meningococcal group B (15:P1.3) outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile. Chilean National Committee for Meningococcal Disease. *Vaccine* **13**, 821–829 (1995).
394. Stephens, D. S. Outer-membrane-vesicle vaccines: old but not forgotten. *Lancet Infect Dis* **11**, 421–422 (2011).
395. de Kleijn, E. D. *et al.* Immunogenicity and safety of a hexavalent meningococcal outer-membrane-vesicle vaccine in children of 2-3 and 7-8 years of age. *Vaccine* **18**, 1456–1466 (2000).
396. Kaaijk, P. *et al.* Preclinical safety and immunogenicity evaluation of a nonavalent PorA native outer membrane vesicle vaccine against serogroup B meningococcal disease. *Vaccine* **31**, 1065–1071 (2013).
397. Brehony, C., Hill, D. M., Lucidarme, J., Borrow, R. & Maiden, M. C. Meningococcal vaccine antigen diversity in global databases. *Euro Surveill.* **20**, 355 (2015).
398. Buckee, C. O. *et al.* Role of selection in the emergence of lineages and the evolution of virulence in *Neisseria meningitidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 15082–15087 (2008).
399. Marsay, L. *et al.* A novel meningococcal outer membrane vesicle vaccine with constitutive expression of FetA: A phase I clinical trial. *J. Infect.* **71**, 326–337 (2015).

400. van der Ley, P. *et al.* Modification of lipid A biosynthesis in *Neisseria meningitidis* lpxL mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity, and adjuvant activity. *Infect. Immun.* **69**, 5981–5990 (2001).
401. Koeberling, O., Welsch, J. A. & Granoff, D. M. Improved immunogenicity of a H44/76 group B outer membrane vesicle vaccine with over-expressed genome-derived Neisserial antigen 1870. *Vaccine* **25**, 1912–1920 (2007).
402. van de Waterbeemd, B. *et al.* Improved OMV vaccine against *Neisseria meningitidis* using genetically engineered strains and a detergent-free purification process. *Vaccine* **28**, 4810–4816 (2010).
403. Tan, L. K. K., Carlone, G. M. & Borrow, R. Advances in the development of vaccines against *Neisseria meningitidis*. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1511–1520 (2010).
404. Koeberling, O. *et al.* Immunogenicity of a meningococcal native outer membrane vesicle vaccine with attenuated endotoxin and over-expressed factor H binding protein in infant rhesus monkeys. *Vaccine* **29**, 4728–4734 (2011).
405. Keiser, P. B. *et al.* A phase 1 study of a meningococcal native outer membrane vesicle vaccine made from a group B strain with deleted lpxL1 and synX, over-expressed factor H binding protein, two PorAs and stabilized OpcA expression. *Vaccine* **29**, 1413–1420 (2011).
406. Schmiel, D. H., Moran, E. E., Keiser, P. B., Brandt, B. L. & Zollinger, W. D. Importance of antibodies to lipopolysaccharide in natural and vaccine-induced serum bactericidal activity against *Neisseria meningitidis* group B. *Infect. Immun.* **79**, 4146–4156 (2011).
407. Steeghs, L. *et al.* Differential activation of human and mouse Toll-like receptor 4 by the adjuvant candidate LpxL1 of *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* **76**, 3801–3807 (2008).
408. Zollinger, W. D. *et al.* Phase I study of a *Neisseria meningitidis* liposomal vaccine containing purified outer membrane proteins and detoxified lipooligosaccharide. *Vaccine* **30**, 712–721 (2012).
409. Petousis-Harris, H. *et al.* Effectiveness of a group B outer membrane vesicle meningococcal vaccine against gonorrhoea in New Zealand: a retrospective case-control study. *Lancet* **390**, 1603–1610 (2017).
410. Rappuoli, R. Reverse vaccinology. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 445–450 (2000).
411. Giuliani, M. M. *et al.* A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 10834–10839 (2006).
412. Gossger, N. *et al.* Immunogenicity and tolerability of recombinant serogroup B meningococcal vaccine administered with or without routine infant vaccinations according to different immunization schedules: a randomized controlled trial. *JAMA* **307**, 573–582 (2012).
413. Vesikari, T. *et al.* Immunogenicity and safety of an investigational multicomponent, recombinant, meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB) administered concomitantly with routine infant and child vaccinations: results of two randomised trials. *Lancet* **381**, 825–835 (2013).
414. Donnelly, J. *et al.* Qualitative and quantitative assessment of meningococcal antigens to evaluate the potential strain coverage of protein-based vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 19490–19495 (2010).
415. Ladhani, S. N. *et al.* The introduction of the meningococcal B (MenB) vaccine (Bexsero®) into the national infant immunisation programme--New challenges for public health. *J. Infect.* **71**, 611–614 (2015).

416. Introduction of MenB vaccination for infants. GOV.UK, 22 juin 2015. [en ligne]. <https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/437906/150622_MenB_bipartite_letter.pdf>, consulté le 15 mars 2018.
417. Parikh, S. R. *et al.* Effectiveness and impact of a reduced infant schedule of 4CMenB vaccine against group B meningococcal disease in England: a national observational cohort study. *Lancet* **388**, 2775–2782 (2016).
418. First vaccine approved by FDA to prevent serogroup B Meningococcal disease. U.S. Food & Drug Administration, 29 octobre 2014. [en ligne]. <<https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm420998.htm>>, consulté le 25 février 2018.
419. 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).
420. Fletcher, L. D. *et al.* Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 lipoprotein. *Infect. Immun.* **72**, 2088–2100 (2004).
421. Masignani, V. *et al.* Vaccination against *Neisseria meningitidis* using three variants of the lipoprotein GNA1870. *J. Exp. Med.* **197**, 789–799 (2003).
422. Jiang, H.-Q. *et al.* Broad vaccine coverage predicted for a bivalent recombinant factor H binding protein based vaccine to prevent serogroup B meningococcal disease. *Vaccine* **28**, 6086–6093 (2010).
423. Brendish, N. J. & Read, R. C. *Neisseria meningitidis* serogroup B bivalent factor H binding protein vaccine. *Expert Rev Vaccines* **14**, 493–503 (2015).
424. Richmond, P. C. *et al.* A bivalent *Neisseria meningitidis* recombinant lipidated factor H binding protein vaccine in young adults: results of a randomised, controlled, dose-escalation phase 1 trial. *Vaccine* **30**, 6163–6174 (2012).
425. Sheldon, E. A., Schwartz, H., Jiang, Q., Giardina, P. C. & Perez, J. L. A phase 1, randomized, open-label, active-controlled trial to assess the safety of a meningococcal serogroup B bivalent rLP2086 vaccine in healthy adults. *Hum Vaccin Immunother* **8**, 888–895 (2012).
426. Richmond, P. C. *et al.* Safety, immunogenicity, and tolerability of meningococcal serogroup B bivalent recombinant lipoprotein 2086 vaccine in healthy adolescents: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis* **12**, 597–607 (2012).
427. Marshall, H. S. *et al.* A phase 2 open-label safety and immunogenicity study of a meningococcal B bivalent rLP2086 vaccine in healthy adults. *Vaccine* **31**, 1569–1575 (2013).
428. Reiner, D. M. *et al.* Immunogenicity, safety, and tolerability of the meningococcal serogroup B bivalent rLP2086 vaccine in adult laboratory workers. *Vaccine* **34**, 809–813 (2016).
429. Martinon-Torres, F. *et al.* A randomized, phase 1/2 trial of the safety, tolerability, and immunogenicity of bivalent rLP2086 meningococcal B vaccine in healthy infants. *Vaccine* **32**, 5206–5211 (2014).
430. Marshall, H. S. *et al.* Safety and immunogenicity of a meningococcal B bivalent rLP2086 vaccine in healthy toddlers aged 18–36 months: a phase 1 randomized-controlled clinical trial. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **31**, 1061–1068 (2012).
431. Nissen, M. D. *et al.* A randomized, controlled, phase 1/2 trial of a *Neisseria meningitidis* serogroup B bivalent rLP2086 vaccine in healthy children and adolescents. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **32**, 364–371 (2013).

432. Ostergaard, L. *et al.* A Bivalent Meningococcal B Vaccine in Adolescents and Young Adults. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2349–2362 (2017).
433. Daugla, D. M. *et al.* Effect of a serogroup A meningococcal conjugate vaccine (PsA-TT) on serogroup A meningococcal meningitis and carriage in Chad: a community study [corrected]. *Lancet* **383**, 40–47 (2014).
434. Welsch, J. A. & Granoff, D. Immunity to *Neisseria meningitidis* group B in adults despite lack of serum bactericidal antibody. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 1596–1602 (2007).
435. Plested, J. S. & Granoff, D. M. Vaccine-induced opsonophagocytic immunity to *Neisseria meningitidis* group B. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 799–804 (2008).
436. McIntosh, E. D. G., Bröker, M., Wassil, J., Welsch, J. A. & Borrow, R. Serum bactericidal antibody assays - The role of complement in infection and immunity. *Vaccine* **33**, 4414–4421 (2015).
437. Borrow, R., Andrews, N., Goldblatt, D. & Miller, E. Serological basis for use of meningococcal serogroup C conjugate vaccines in the United Kingdom: reevaluation of correlates of protection. *Infect. Immun.* **69**, 1568–1573 (2001).
438. Borrow, R., Balmer, P. & Miller, E. Meningococcal surrogates of protection--serum bactericidal antibody activity. *Vaccine* **23**, 2222–2227 (2005).
439. Santos, G. F., Deck, R. R., Donnelly, J., Blackwelder, W. & Granoff, D. M. Importance of complement source in measuring meningococcal bactericidal titers. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**, 616–623 (2001).
440. Granoff, D. M., Welsch, J. A. & Ram, S. Binding of complement factor H (fH) to *Neisseria meningitidis* is specific for human fH and inhibits complement activation by rat and rabbit sera. *Infect. Immun.* **77**, 764–769 (2009).
441. Holst, J. *et al.* Serum bactericidal activity correlates with the vaccine efficacy of outer membrane vesicle vaccines against *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. *Vaccine* **21**, 734–737 (2003).
442. Noronha, C. P., Struchiner, C. J. & Halloran, M. E. Assessment of the direct effectiveness of BC meningococcal vaccine in Rio de Janeiro, Brazil: a case-control study. *Int J Epidemiol* **24**, 1050–1057 (1995).
443. Feiring, B. *et al.* Persisting immune responses indicating long-term protection after booster dose with meningococcal group B outer membrane vesicle vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**, 790–796 (2006).
444. Caron, F. *et al.* Evolution of immune response against *Neisseria meningitidis* B:14:P1.7,16 before and after the outer membrane vesicle vaccine MenBvac. *Vaccine* **30**, 5059–5062 (2012).
445. Galloway, Y., Stehr-Green, P., McNicholas, A. & O'Hallahan, J. Use of an observational cohort study to estimate the effectiveness of the New Zealand group B meningococcal vaccine in children aged under 5 years. *Int J Epidemiol* **38**, 413–418 (2009).
446. Oster, P. *et al.* Immunogenicity and safety of a strain-specific MenB OMV vaccine delivered to under 5-year olds in New Zealand. *Vaccine* **25**, 3075–3079 (2007).
447. Wong, S. *et al.* New zealand epidemic strain meningococcal B outer membrane vesicle vaccine in children aged 16-24 months. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **26**, 345–350 (2007).
448. Delbos, V. *et al.* Impact of MenBvac, an outer membrane vesicle (OMV) vaccine, on the meningococcal carriage. *Vaccine* **31**, 4416–4420 (2013).
449. SEVESTRE, J. *et al.* Durability of immunogenicity and strain coverage of MenBvac, a meningococcal vaccine based on outer membrane vesicles: Lessons of the Normandy campaign. *Vaccine* **35**, 4029–4033 (2017).

450. Delbos, V. *et al.* Meningococcal carriage during a clonal meningococcal B outbreak in France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **32**, 1451–1459 (2013).
451. Martínez Motas, I. *et al.* [Characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from carriers in Cuba during 20 years]. *Rev Cubana Med Trop* **58**, 124–133 (2006).
452. Pérez MC, Picón T, Galazka J, Rubio I, Montano A, Ferrari AM. Control de un brote epidémico de enfermedad meningocócica por *Neisseria meningitidis* serogrupo B. *Rev Méd Urug.* 2004;20(2):92-101.
453. Rosenqvist, E. *et al.* Human antibody responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine. *Infect. Immun.* **63**, 4642–4652 (1995).
454. Tappero, J. W. *et al.* Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. *JAMA* **281**, 1520–1527 (1999).
455. Wedege, E., Dalseg, R., Caugant, D. A., Poolman, J. T. & Frøholm, L. O. Expression of an inaccessible P1.7 subtype epitope on meningococcal class 1 proteins. *J. Med. Microbiol.* **38**, 23–28 (1993).
456. Thornton, V. *et al.* Safety and immunogenicity of New Zealand strain meningococcal serogroup B OMV vaccine in healthy adults: beginning of epidemic control. *Vaccine* **24**, 1395–1400 (2006).
457. Wedege, E. *et al.* Functional and specific antibody responses in adult volunteers in new zealand who were given one of two different meningococcal serogroup B outer membrane vesicle vaccines. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 830–838 (2007).
458. Boutriau, D. *et al.* Immunogenicity and safety of three doses of a bivalent (B:4:p1.19,15 and B:4:p1.7-2,4) meningococcal outer membrane vesicle vaccine in healthy adolescents. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 65–73 (2007).
459. van der Ley, P. & Poolman, J. T. Construction of a multivalent meningococcal vaccine strain based on the class 1 outer membrane protein. *Infect. Immun.* **60**, 3156–3161 (1992).
460. van der Ley, P., van der Biezen, J. & Poolman, J. T. Construction of *Neisseria meningitidis* strains carrying multiple chromosomal copies of the *porA* gene for use in the production of a multivalent outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine* **13**, 401–407 (1995).
461. Peeters, C. C. *et al.* Phase I clinical trial with a hexavalent PorA containing meningococcal outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine* **14**, 1009–1015 (1996).
462. Cartwright, K. *et al.* Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (PorA) outer membrane proteins. *Vaccine* **17**, 2612–2619 (1999).
463. de Kleijn, E. D. *et al.* Immunogenicity and safety of monovalent p1.7(h),4 meningococcal outer membrane vesicle vaccine in toddlers: comparison of two vaccination schedules and two vaccine formulations. *Vaccine* **19**, 1141–1148 (2000).
464. Martin, S. *et al.* IgG antibody subclass responses determined by immunoblot in infants' sera following vaccination with a meningococcal recombinant hexavalent PorA OMV vaccine. *Vaccine* **19**, 4404–4408 (2001).
465. de Kleijn, E. *et al.* Serum bactericidal activity and isotype distribution of antibodies in toddlers and schoolchildren after vaccination with RIVM hexavalent PorA vesicle vaccine. *Vaccine* **20**, 352–358 (2001).
466. Vermont, C. L. *et al.* Cross-reactivity of antibodies against PorA after vaccination with a meningococcal B outer membrane vesicle vaccine. *Infect. Immun.* **71**, 1650–1655 (2003).

467. Vermont, C. L., van Dijken, H. H., de Groot, R., van Alphen, L. & van den Dobbelen, G. P. J. M. PorA-specific differences in antibody avidity after vaccination with a hexavalent Men B outer membrane vesicle vaccine in toddlers and school children. *Vaccine* **22**, 3008–3013 (2004).

Résumé

Ce travail de thèse comporte deux volets ayant pour trait commun l'analyse *a posteriori* d'une épidémie d'infection invasive à méningocoque (IIM) survenue en Normandie entre 2003 et 2012 et liée à l'expansion d'un clone hypervirulent particulier (B:14:P1.7,16/ST-32).

Le premier travail (publié dans *Virulence* : Sevestre *et al* 2018 ;9 :923-929) s'est focalisé sur les déterminants de la virulence de « B14 » en comparant 6 isolats identifiés les uns d'IIM, les autres de portage pharyngé sain (ces derniers exprimant ou non la capsule). Apparemment identiques selon le typage classique (immunotypage et génotypage par MLST), ces 3 groupes bactériens se sont révélés distincts après analyse génomique et comparaison gène par gène (plus de 600 gènes au profil génétique variable entre les groupes) conduisant à identifier le rôle majeur de l'acquisition du fer dans la virulence et en particulier celui du système HmbR, un récepteur de l'hémoglobine. Dans un modèle murin (souris transgéniques rendues sensibles à l'infection humaine) les 3 groupes de souches sont aussi apparus distincts, avec une hiérarchie des marqueurs d'infectiosité (titres bactériens, taux de cytokines). La restauration du système HmbR (souches de portage capsulées « Off » dérivées en « On ») a restauré le pouvoir invasif *in vitro* et chez l'animal. Si le fer était déjà connu comme facteur de virulence pour différentes espèces bactériennes, l'originalité ici est d'avoir identifié le rôle de la variation de phase du gène *hmbR* au sein d'un même clone épidémique, permettant l'adaptation au portage, condition *sine qua non* de la transmission d'individu en individu.

Le second travail (publié dans *Vaccine* : Sevestre *et al* 2017 ;35 :4029-4033) s'est intéressé à la durabilité et à l'ampleur de la protection vaccinale du MenBvac[®], vaccin à base de vésicules de membranes externes (Outer Membrane Vesicles, OMV) utilisé jadis pour contrôler l'épidémie. Ceci a pu être réalisé grâce à deux cohortes d'enfants vaccinés par un schéma à 4 doses et prélevés pour les uns 1 an après la dernière dose et pour les autres 4 an après. L'immunogénicité (étude de l'activité bactéricide du sérum vis-à-vis du clone ciblé) s'est avérée de durabilité moyenne avec 48% des enfants protégés à 1 an et 31% à 4 ans, un résultat en phase avec les données de la littérature sur les vaccins OMV. Un effet bactéricide fut observé très au-delà de « B14 », du fait d'une immunité croisée aux souches avec une homologie au moins partielle de la porine PorA (principal déterminant antigénique des vaccins OMV) soit pour le MenBvac[®] 15% des clones virulents B actuellement circulants en France, un résultat davantage original car ayant jusqu'alors que peu été investigué.

Mots clés : *Neisseria meningitidis*, Virulence, Séquençage génomique, Modèle *in vivo*, Acquisition du fer, Vaccin OMV, Efficacité vaccinale, Protection vaccinale croisée.

Abstract

This thesis work includes two studies which both contribute to analyze *a posteriori* an outbreak of invasive meningococcal diseases (IMD) that had occurred in Normandy from 2003 to 2012 due to the expansion of a single hypervirulent clone (B:14:P1.7,16/ST-32).

The first work (published in *Virulence*: Sevestre *et al* 2018 ;9 :923-929) focused on the virulence determinants of “B14” by comparing 6 isolates, either from IMD or from asymptomatic carriage (these latter expressing or not the capsule). Apparently identical on the basis of classical typing methods (immunotyping and MLST genotyping), these 3 groups of isolates were markedly different by whole genome analysis and on gene by gene comparison (more than 600 genes presenting a variable genetic profile). This analysis led to identify the crucial implication of iron acquisition in virulence and in particular the place of the HmbR system, an hemoglobin receptor. In a murine model (transgenic mice made susceptible to infection), these 3 groups also appeared separated, with a distinct infectivity hierarchy (bacterial counts, levels of cytokines). The restoration of the HmbR system in the capsulated carriage isolates (switch from Off phase to On phase) also restored their invasiveness *in vitro* and *in vivo*. Even if iron is already known to be a determining factor in the virulence of many bacterial species, our results clearly indicate the importance of the *hmbR* phase variation among clonal epidemic isolates, allowing adaptation to carriage, *sine qua non* condition for people to people transmission.

The second work (published in *Vaccine*: Sevestre *et al* 2017 ;35 :4029-4033) concerned the durability and the cross-protection of the MenBvac[®], an OMV vaccine (Outer Membrane Vesicles), used in the past to control the outbreak. This work has been done thanks to 2 cohorts of children vaccinated with 4 doses and sampled either 1 year or 4 years after the last dose. The efficacy (serum bactericidal activity against the epidemic strain) was short lasting, with 48% of children protected after 1 year and 31% after 4 years, a result in accordance with OMV literature. A bactericidal effect was observed far beyond “B14”, by cross-immunity with strains harboring homologies, even partials of the porin PorA (main antigenic determinant in OMV vaccine), indicating a coverage for 15% of virulent isolates B circulating in France, an original result as until then not so far investigated.

Keys-word : *Neisseria meningitidis*, Virulence, Whole genome sequencing, *In vivo* model, Iron acquisition, OMV vaccine, Vaccine efficacy, Vaccine cross protection.

Résumé

Ce travail de thèse comporte deux volets ayant pour trait commun l'analyse *a posteriori* d'une épidémie d'infection invasive à méningocoque (IIM) survenue en Normandie entre 2003 et 2012 et liée à l'expansion d'un clone hypervirulent particulier (B:14:P1.7,16/ST-32).

Le premier travail (publié dans *Virulence* : Sevestre *et al* 2018 ;9 :923-929) s'est focalisé sur les déterminants de la virulence de « B14 » en comparant 6 isolats identifiés les uns d'IIM, les autres de portage pharyngé sain (ces derniers exprimant ou non la capsule). Apparemment identiques selon le typage classique (immunotypage et génotypage par MLST), ces 3 groupes bactériens se sont révélés distincts après analyse génomique et comparaison gène par gène (plus de 600 gènes au profil génétique variable entre les groupes) conduisant à identifier le rôle majeur de l'acquisition du fer dans la virulence et en particulier celui du système HmbR, un récepteur de l'hémoglobine. Dans un modèle murin (souris transgéniques rendues sensibles à l'infection humaine) les 3 groupes de souches sont aussi apparus distincts, avec une hiérarchie des marqueurs d'infectiosité (titres bactériens, taux de cytokines). La restauration du système HmbR (souches de portage capsulées « OFF » dérivées en « On ») a restauré le pouvoir invasif *in vitro* et chez l'animal. Si le fer était déjà connu comme facteur de virulence pour différentes espèces bactériennes, l'originalité ici est d'avoir identifié le rôle de la variation de phase du gène *hmbR* au sein d'un même clone épidémique, permettant l'adaptation au portage, condition *sine qua non* de la transmission d'individu en individu.

Le second travail (publié dans *Vaccine* : Sevestre *et al* 2017 ;35 :4029-4033) s'est intéressé à la durabilité et à l'ampleur de la protection vaccinale du MenBvac[®], vaccin à base de vésicules de membranes externes (Outer Membrane Vesicles, OMV) utilisé jadis pour contrôler l'épidémie. Ceci a pu être réalisé grâce à deux cohortes d'enfants vaccinés par un schéma à 4 doses et prélevés pour les uns 1 an après la dernière dose et pour les autres 4 an après. L'immunogénicité (étude de l'activité bactéricide du sérum vis-à-vis du clone ciblé) s'est avérée de durabilité moyenne avec 48 % des enfants protégés à 1 an et 31 % à 4 ans, un résultat en phase avec les données de la littérature sur les vaccins OMV. Un effet bactéricide fut observé très au-delà de « B14 », du fait d'une immunité croisée aux souches avec une homologie au moins partielle de la porine PorA (principal déterminant antigénique des vaccins OMV) soit pour le MenBvac[®] 15 % des clones virulents B actuellement circulants en France, un résultat davantage original car ayant jusqu'alors que peu investigué.

Mots clés : *Neisseria meningitidis*, Virulence, Séquençage génomique, Modèle *in vivo*, Acquisition du fer, Vaccin OMV, Efficacité vaccinale, Protection vaccinale croisée.