

LA MÉNINGITE DUE AU MÉNINGOCOQUE

Modérateur : Pierre NICOLAS

L'épidémiologie moléculaire des méningocoques.

D. A. Caugant

WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Meningococci, Norwegian Institute of Public Health, P.O. Box 4404 Nydalen, N-0403 Oslo, Norvège.
Tel.:(47) 22 04 23 11; Fax:(47) 22 04 25 18.E-mail:dominique.caugant@fhi.no

Journée en hommage au MG LAPEYSSONNIE, Le Pharo, Marseille, 20 mars 2002

Summary: Molecular epidemiology of meningococci.

By using the techniques of molecular biology, such as multilocus enzyme electrophoresis and multilocus sequence typing, it has been possible to identify the clones of meningococci that have been responsible for major epidemics in the world and to elucidate the routes of spread of these bacteria. Although meningococci can rearrange very rapidly their genome through the process of transformation, some clones or some groups of closely related clones have been stable and have been associated with increases of incidence of disease during decades. A clone with an epidemic potential can be disseminated globally within a few years, but the reasons for the development of an epidemic in a particular population are still not fully understood.

Résumé :

Par l'application de techniques de biologie moléculaire, comme l'électrophorèse des iso-enzymes (MLEE : multilocus enzyme electrophoresis) et le typage par séquençage multiple de gènes, il a été possible d'identifier des clones de méningocoques responsables d'épidémies majeures dans le monde et d'élucider leurs modes de transmission. Bien que les méningocoques puissent remanier très rapidement leur génome par le processus de transformation et recombinaison, certains clones ou groupes de clones génétiquement très proches ont été associés à des élévations de l'incidence de la maladie pendant plusieurs décennies. Un clone avec un potentiel épidémique peut aboutir à une dissémination mondiale en quelques années, mais les raisons qui déterminent le développement ou non d'une épidémie dans une population ne sont pas encore bien comprises.

Neisseria meningitidis
epidemiology
clonal analysis
multilocus sequence typing

Neisseria meningitidis
épidémiologie
analyse des clones
typage
séquençage
de gènes multiples

Introduction

Neisseria meningitidis reste une importante cause de morbidité et de mortalité dans le monde en dépit de l'existence de traitements efficaces et de vaccins à base de polysaccharides contre les sérogroupes A, C, W135 et Y. Même en l'absence d'épidémies, le nombre de cas de maladie méningococcique rapporté annuellement dans le monde dépasse les 500000, et le taux global de décès est proche de 10% (21). La moitié de ces cas se produit dans la zone au sud du Sahara, identifiée comme la "ceinture de la méningite cérébrospinale", par le Docteur LAPEYSSONNIE (12). En cas d'épidémie, ces chiffres peuvent être doublés.

Le méningocoque colonise le tractus respiratoire de l'homme, il est normalement éliminé après un certain temps sans aucun signe clinique décelable. Chez une faible proportion de sujets, peu de temps après la colonisation du rhinopharynx, le méningocoque va envahir le courant circulatoire sanguin et éventuellement franchir la barrière hémato-méningée. Dans les pays industrialisés, les cas de maladie méningococcique surviennent en général de façon sporadique et le taux d'incidence annuel est approximativement de 1 à 3 pour 100 000 habitants, ce qui représente le niveau endémique de la maladie. Quelquefois, ce niveau augmente jusqu'à 5 à 10 cas pour 100 000, et cette augmentation peut persister pendant de nombreuses années. Ce phénomène, appelé vague hyperendémique, a été

observé pendant ces dernières décennies dans plusieurs pays d'Europe; il est causé principalement par des souches du séro-groupe B (5). Les grandes épidémies ont cessé de se produire dans les pays industrialisés, mais surviennent régulièrement encore en Chine et dans la ceinture de la méningite en Afrique. Jusqu'à maintenant, ces épidémies sont essentiellement dues à des souches de séro-groupe A. Elles sont caractérisées par un taux de morbidité élevé, pouvant dépasser 500 cas pour 100 000; mais elles sont normalement de courte durée (2).

En plus du séro-groupe déterminé par les antigènes polysaccharidiques de la capsule, des structures de la membrane externe ont été utilisées pour classer les souches de *N. meningitidis*. Les spécificités antigéniques des porines PorB et PorA définissent le sérotype et le sous-type des souches, les variations au niveau des lipopolysaccharides de membrane (LPS) définissent les immunotypes (9). Ce système de typage est fondé sur l'utilisation de nombreux anticorps monoclonaux préparés à partir de souches de malades. La détermination de la fréquence de ces structures antigéniques présente un intérêt épidémiologique; ces protéines qui induisent la formation d'anticorps bactéricides ont aussi un grand intérêt dans la protection et la recherche de nouveaux vaccins. Cependant ces caractères antigéniques peuvent changer rapidement car ils sont soumis à la pression de sélection par l'immunité de l'hôte et les relations génétiques et épidémiologiques entre les souches ne concordent pas nécessairement avec les résultats de ces méthodes de typage.

L'analyse des clones

L'analyse des clones a été développée pour les méningocoques au début des années 1980. Deux méthodes ont été utilisées, l'électrophorèse des iso-enzymes (MLEE: multilocus enzyme electrophoresis) et le typage par séquençage multiple de gènes (MLST: multilocus sequence typing). La technique MLEE a été appliquée à des dizaines de milliers de souches, d'origines géographiques variées, incluant à la fois des souches de portage et des souches de malades (1, 3, 6-8, 17, 18, 23-25). Cette méthode a permis d'établir la diversité génétique des populations de méningocoques et d'identifier les clones responsables des épidémies de par le monde. La technique MLST, développée en 1998 pour *N. meningitidis* (13), est maintenant la méthode de base pour la caractérisation moléculaire des souches de méningocoques, ainsi que de nombreuses autres espèces bactériennes.

La MLEE identifie les variations alléliques des gènes de manière indirecte, en indexant la migration électrophorétique différentielle des produits de ces gènes, les enzymes, qui peuvent être mises en évidence par des colorations histo-chimiques (19). La méthode détecte un niveau de variabilité qui est optimal pour l'étude épidémiologique globale des infections dues aux méningocoques. Cependant, la technique demande un travail important et nécessite un grand nombre de souches de référence, tout en étant relativement difficile à standardiser entre laboratoires.

La technique MLST est une adaptation de la MLEE où la variation allélique des gènes est détectée par la séquence des nucléotides qui les compose. Les avantages de la MLST sont essentiellement que le degré de variation au niveau de l'ADN est bien plus élevé qu'au niveau des protéines qu'ils codent et que les séquences de nucléotides peuvent être déterminées sans ambiguïté. Par conséquent, les données peuvent facilement être comparées entre laboratoires et être mises à disposition dans le monde entier au moyen d'Internet (13).

La MLST est basée sur l'amplification de 7 fragments d'ADN d'une longueur approximative de 450 bases. Les gènes codent des protéines de structure interne, la plupart étant des enzymes cytoplasmiques. En utilisant la base de données sur Internet, les séquences des 7 fragments peuvent être comparées à celles déjà identifiées. Pour chaque gène, l'allèle peut être déterminé et, pour chaque souche, le profil allélique, représentant le génotype ou séquence type, est défini. Après 4 ans d'application de cette technique, plus de 100 allèles pour chacun de ces 7 gènes et plus de 1600 combinaisons de ces allèles ont été enregistrés dans la base de données <http://neisseria.mlst.net/>.

Ces deux méthodes d'analyse des clones fournissent des résultats très comparables, ce qui a permis d'intégrer les informations obtenues pour chacune d'elles. L'espèce est extrêmement polymorphe en raison de son aptitude naturelle à la transformation génétique (14, 16). Ce haut potentiel des méningocoques à acquérir du matériel génétique de micro-organismes apparentés conduit à la formation de clones qui divergent les uns des autres par une faible fraction de leur génome. Les clones proches les uns des autres sont regroupés dans des complexes clonaux. Parmi les milliers de clones identifiés, la majorité des infections méningococciques dans le monde est due actuellement à 5 complexes clonaux: le complexe ET-5, le complexe ET-37, la lignée III, le groupe A4 et le sous-groupe III (pour ce qui concerne les méningocoques du séro-groupe A) (5).

Le complexe ET-5

Le clone ET-5 est en grande partie à l'origine du développement de l'épidémiologie moléculaire chez *N. meningitidis*. En 1975, le taux d'incidence de la maladie méningococcique atteignit 24 pour 100 000 dans le nord de la Norvège. Cette augmentation du nombre de cas s'est ensuite propagée dans tout le pays et l'analyse des clones montra que le clone ET-5 était responsable de cette épidémie due à des méningocoques du séro-groupe B. Dans les années qui suivirent, le clone ET-5 a été à l'origine d'épidémies et de flambées dans pratiquement toute l'Europe, ainsi qu'en Amérique Latine, où des épidémies sévères ont atteint Cuba, le Brésil et le Chili (6). Ces épidémies dues au séro-groupe B ont stimulé la recherche et le développement de différents vaccins à partir d'antigènes de la membrane externe car, bien que due au même clone, une variation importante des protéines de membrane externe de la souche épidémique a été observée durant son extension géographique.

L'origine asiatique du complexe clonal ET-5 est suggérée par le fait que le clone était représenté parmi les rares souches de séro-groupe B isolées, pendant les années 1970, en Chine et au Japon. Un élément supplémentaire pour une origine asiatique est le fait que le gène codant la résistance aux sulfamides chez le clone ET-5 est similaire à ceux identifiés chez de nombreux autres clones de méningocoque circulant dans des pays d'Asie.

Le clone ET-5 a été une importante cause de méningococcies en Afrique du Sud en fin des années 70 (6); heureusement, il ne s'est pas propagé de façon significative dans le continent africain, en particulier dans la ceinture de la méningite. Des flambées locales dues à des clones ET-5 continuent de se produire, ces dernières années, principalement aux États-Unis (8). Cependant, l'importance mondiale de ce clone dans la maladie méningococcique semble être sur le déclin.

Les caractéristiques des épidémies ou vague hyperendémique causées par le complexe clonal ET-5 sont, d'une part, leur longue durée due au fait que la transmission du clone dans les populations est lente et, d'autre part, la génération de nombreux variants génotypiques et phénotypiques, souvent propres

à une localité donnée (4). Cette accumulation de variants alléliques résulte de la compétence du méningocoque à la transformation génétique et joue certainement un rôle dans le mécanisme d'échappement à la pression immunitaire de l'hôte.

Le complexe ET-37

La souche de méningocoque la plus ancienne ayant été conservée jusqu'à nos jours a été isolée aux États-Unis, à l'époque de la première guerre mondiale. Cette souche s'est révélée être un membre du complexe clonal ET-37 (5). Ce groupe de clones a été à l'origine d'épidémies dans l'armée des États-Unis dans les années 1960, ainsi qu'au Brésil et en Afrique du Sud dans les années 1970.

Une large proportion des souches de sérotype C circulant aux États-Unis, en Europe et en Afrique dans les années 1980 appartenait aussi au complexe ET-37. Les souches du complexe ET-37 en Afrique, en plus du sérotype C, peuvent appartenir aux sérotypes Y ou W135.

Contrairement aux souches du complexe ET-5 qui sont associées à un nombre considérable de variants antigéniques des protéines de membrane externe, les souches du complexe ET-37 isolées à travers le monde sont relativement homogènes en ce qui concerne leur sérotype et sous-type.

En 1986, un nouveau variant du clone ET-37, désigné ET-15, est apparu au Canada, associé à une augmentation de l'incidence de la maladie (3). Les souches ET-15 étaient du sérotype C et des campagnes de vaccination de masse ont été entreprises pour enrayer la propagation de la maladie. Les années suivantes, des flambées dues à des souches ET-15 se produisirent aux États-Unis, en Islande en 1991, en Finlande en 1992, en République Tchèque et en Israël en 1993, puis en Angleterre et en Australie (5, 10, 11).

Avec le complexe clonal ET-15, nous avons assisté à la propagation rapide d'un nouveau variant d'un complexe clonal ancien qui a réussi à atteindre une distribution mondiale en quelques années. Une origine commune des souches ET-15 a été confirmée par le fait que tous les isolats testés, quelle que soit leur origine géographique, possèdent la même mutation d'une seule base dans le gène codant l'enzyme fumarase (22); tous ont un génotype caractéristique par électrophorèse en champ pulsé, distinct de ceux obtenus pour les autres isolats du complexe clonal ET-37 (10).

En mars 2000, juste après le pèlerinage du Hajj, de nombreux cas de méningococcies de sérotype W135 ont été déclarés par plusieurs pays européens, principalement la France et le Royaume-Uni. L'application de différentes techniques moléculaires a permis de démontrer que ces cas étaient épidémiologiquement liés à ceux rapportés en Arabie Saoudite au moment du Hajj 2000 (20). Ces cas étaient dus à une souche du complexe ET-37, génétiquement très proche de celles isolées en Afrique dans les années 1990 (15). Cette flambée, provoquée par un clone du complexe ET-37, représente le premier problème épidémique associé au sérotype W135. Les cas rapportés au Burkina Faso, au Niger et en République Centrafricaine après le Hajj 2001 sont une source d'inquiétude. En effet, l'émergence d'une épidémie de W135 compliquerait la lutte dans les pays de la ceinture africaine de la méningite car il faudrait recourir à des vaccins tétravalents qui sont très chers et dont les stocks sont très limités.

Le sous-groupe III de sérotype A

Depuis la seconde guerre mondiale, les grandes épidémies de sérotype A ont été restreintes essentiellement à

l'Afrique et la Chine (1). Les souches de méningocoques appartenant au sérotype A sont beaucoup plus homogènes que celles des autres sérotypes (7). Des huit complexes clonaux reconnus parmi les souches de sérotype A (23), deux ont joué un rôle important en Afrique. Depuis le début des années 1960 jusqu'en 1987, les souches du sous-groupe I ont dominé le continent africain, des pays d'Afrique du Nord jusqu'en Afrique du Sud (5, 18). En août 1987, 7000 cas de méningococcies survinrent pendant le pèlerinage annuel de La Mecque. Le clone responsable de cette épidémie appartenait au sous-groupe III et avait été apporté à La Mecque par des pèlerins en provenance d'Asie (17). Le clone fut alors disséminé à travers le monde par les pèlerins retournant dans leur pays. Alors que, dans les pays industrialisés, ces bactéries ne se sont pas propagées au-delà du cercle des pèlerins et de leurs contacts, l'introduction de ce clone dans les pays de la ceinture africaine de la méningite entraîna des vagues d'épidémies successives particulièrement sévères, atteignant progressivement tout le continent (2, 5). Les premières épidémies se produisirent en Éthiopie, au Soudan, au Tchad et au Kenya en 1988-1989. Puis, d'autres pays de la ceinture africaine de la méningite furent atteints, ainsi que des pays situés bien en dehors de la zone traditionnelle. En 1996, la zone sub-saharienne de l'Afrique fut atteinte par une épidémie d'un niveau sans précédent, avec plus de 150 000 cas et plus de 16 000 décès rapportés à l'Organisation mondiale de la santé (21). En dépit des efforts internationaux mis en place afin de prévenir de nouvelles épidémies et de nombreuses campagnes de vaccination de masse des populations, le sous-groupe III est toujours la principale cause des méningococcies en Afrique sub-saharienne. Cependant, une surveillance accrue est maintenant en place dans plusieurs pays afin de détecter rapidement un éventuel remplacement du sous-groupe III par le sérotype W135 du complexe clonal ET-37.

Conclusions

Les méningocoques peuvent remanier leur génome très rapidement grâce au processus de transformation, ce qui leur permet d'échapper à la pression immunitaire de leur hôte. Cependant, certains clones ou groupes de clones génétiquement très proches sont suffisamment stables pour que les méthodes d'analyse basées sur l'étude multiple de gènes puissent permettre la surveillance épidémiologique de ces bactéries. L'analyse des clones contribue à améliorer notre compréhension des mécanismes, provoquant des élévations de l'incidence de la maladie méningococcique dans certaines régions du monde.

Références bibliographiques

1. ACHTMAN M - Molecular epidemiology of epidemic bacterial meningitis. *Rev Med Microbiol*, 1990, 1, 29-38.
2. ACHTMAN M - Global epidemiology of meningococcal disease. In: CARTWRIGHT K (Ed) - *Meningococcal Disease*. John Wiley & Sons Ltd, London, 1995, pp. 159-175.
3. ASHTON FE, RYAN JA, BORCZYK A, CAUGANT DA, MANCINO L & HUANG D - Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis* serotype 2a that is associated with meningococcal group C disease in Canada. *J Clin Microbiol*, 1991, 29, 2489-2493.
4. BYGRAVES JA, URWIN R, FOX AJ, GRAY SJ, RUSSELL JE et al. - Population genetic and evolutionary approaches to analysis of *Neisseria meningitidis* isolates belonging to the ET-5 complex. *J Bacteriol*, 1999, 181, 5551-5556.

5. CAUGANT DA - Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS*, 1998, **106**, 505-525.
6. CAUGANT DA, FRØHOLM LO, BØVRE K, HOLTEN E, FRASCH CE *et al.*- Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**, 4927-4931.
7. CAUGANT DA, MOCCA LF, FRASCH CE, FRØHOLM LO, ZOLLINGER WD & SELANDER RK - Genetic structure of *Neisseriameningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J Bacteriol*, 1987, **169**, 2781-2792.
8. DIERMAYER M, HEDBERG K, HOESLY F, FISCHER M, PERKINS B *et al.*- Epidemic serogroup B meningococcal disease in Oregon: the evolving epidemiology of the ET-5 strain. *JAMA*, 1999, **281**, 1493-1497.
9. FRASCH CE, ZOLLINGER WD & POOLMAN JT - Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infect Dis*, 1985, **7**, 504-510.
10. JELFS J, MUNRO R, ASHTON FE & CAUGANT DA - Genetic characterization of a new variant within the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis* associated with outbreaks in various parts of the world. *Epidemiol Infect*, 2000, **125**, 285-298.
11. KRIZ P, GIORGINI D, MUSILEK M, LARRIBE M & TAHA MK - Microevolution through DNA exchange among strains of *Neisseria meningitidis* isolated during an outbreak in the Czech Republic. *Res Microbiol*, 1999, **150**, 273-280.
12. LAPEYSSONNIE L - La méningite cérébrospinale en Afrique. *Bull Org Mond Santé*, 1963, **28** (Suppl.), 53-114.
13. MAIDEN MC, BYGRAVES JA, FEIL E, MORELLI G, RUSSELL JE *et al.*- Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**, 3140-3145.
14. MAIDEN MCJ, MALORNY B & ACHTMAN M - A global gene pool in the *Neisseriae*. *Mol Microbiol*, 1996, **21**, 1297-1298.
15. MAYER LW, REEVES MW, AL-HAMDAN N, SACCHI CT, TAHA MK *et al.*- The 2000 outbreak of W135 meningococcal disease: not emergence of a new W135 strain, but clonal expansion within the ET-37 complex. *J Infect Dis*, 2002, **185**, 1596-1605.
16. MAYNARD SMITH J, SMITH NH, O'ROURKE M & SPRATT BG - How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**, 4384-4388.
17. MOORE PS, REEVES MW, SCHWARTZ B, GELLIN BG & BROOME CV - Intercontinental spread of an epidemic group A *Neisseria meningitidis* strain. *Lancet*, 1989, **ii**, 260-263.
18. OLYHOEK T, CROWE BA & ACHTMAN M - Clonal population structure of *Neisseria meningitidis* serogroup A isolated from epidemics and pandemics between 1915 and 1983. *Rev Infect Dis*, 1987, **9**, 665-692.
19. SELANDER RK, CAUGANT DA, OCHMAN H, MUSSER JM, GILMOUR MN & WHITTAM TS - Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol*, 1986, **51**, 873-884.
20. TAHA MK, ACHTMAN M, ALONSO JM, GREENWOOD B, RAMSAY M *et al.*- Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims. *Lancet*, 2000, **356**, 2159.
21. TIKHOMIROV E, SANTAMARIA M & ESTEVES K- Meningococcal disease: public health burden and control. *Rapp Trimest Statist Sanit Mond*, 1997, **50**, 170-177.
22. VOGEL U, CLAUS H, FROSCH M & CAUGANT DA - Molecular basis for the distinction of the ET-15 clone within the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**, 941-942.
23. WANG J-F, CAUGANT DA, LI X, HU X, POOLMAN JT *et al.* - Clonal and antigenic analysis of serogroup A *Neisseria meningitidis* with particular reference to epidemiological features of epidemic meningitis in China. *Infect Immun*, 1992, **60**, 5267-5282.
24. WANG J-F, CAUGANT DA, MORELLI G, KOUMARÉ B & ACHTMAN M - Antigenic and epidemiological properties of the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis*, 1993, **167**, 1320-1329.
25. WENGER JD & PERKINS BA - Patterns in the emergence of epidemic meningococcal disease. In: SCHEEL WM, ARMSTRONG D & HUGHES JM (Eds) - *Emerging Infections*. American Society for Microbiology Press, Washington DC, 1998, pp. 125-136.

Intervention en séance de C. C HASTEL :

Vous avez montré que le méningocoque A, clone III, avait envahi progressivement toute l'Afrique, sortant de la ceinture méningitique de LAPEYSSONNIE. Est-ce que les variations climatiques, par exemple la progression de la sécheresse vers le sud du Sahel n'ont pas pu contribuer à l'extension de la "ceinture" au-delà de ses limites sud ? Après tout, le concept de la ceinture date maintenant de près de 40 ans (1963) et il devrait être réévalué.

Réponse de D. CAUGANT :

Au cours de la dernière décennie, plusieurs auteurs ont proposé des extensions successives de la ceinture à méningite de LAPEYSSONNIE. Bien que les pays inclus dans la ceinture traditionnelle supportent toujours la charge principale des épidémies, la zone à risque comprend maintenant des pays comme le Malawi, le Mozambique, l'Angola et la Zambie. Un changement climatique aboutissant à une désertification de la région en bordure du Sahel est certainement un des facteurs qui a pu contribuer à modifier la ceinture méningitique. Cependant, ces zones à risque en dehors de la ceinture traditionnelle sont aussi localisées dans une zone recevant entre 300 et 1 100 mm de pluies annuelles. Il est possible que des insuffisances dans le système de surveillance dans ces régions soient aussi en partie responsable de leur absence dans la ceinture comme définie en 1963.