

UTILISATION DES OUTILS DE DETECTION POUR LA PALEOMICROLOGIE ET LA DESCRIPTION DES MALADIES INFECTIEUSES ANCIENNES

Michel DRANCOURT

*Unité des Rickettsies – CNRS UMR 6020 – IFR 48 –
Université de la Méditerranée - MARSEILLE - FRANCE*

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Histoire des Maladies Infectieuses

- **Données historiques :**
 - **Données anthropologiques :**
 - **Données microbiologies :**
Démonstratives
- } Présomptives

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Limits of historic descriptions

- **Availability of historic sources**
- **Translation of ancient texts**
- **Ancient nosology**
- **Analogic approach**

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Limits of anthropological descriptions

- **Individual corpses**
- **Mass grave**
 - **Injury**
 - **Famine**
 - **Epidemics**

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Paleomicrobiologie : diagnostic des infections anciennes et approche expérimentale de l'évolution microbiologique.

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Microbiological tools

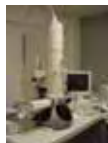
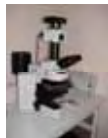
- **Microscopic observation**
- **Isolation and culture**
- **Immunologic detection**
- **Molecular detection: PCR and sequencing**

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Techniques used for the detection of ancient pathogen

- Microscopic observation



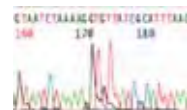
- Isolation and culture



- Immunodetection and late serology



- PCR-based detection and sequencing of DNA



6ème JNI – NICE 9 Juin 2005

Diagnostic en Paléomicrobiologie : Microscopie

- **Bactéries :**

Bartonella bacilliformis Verruga peruviana
[Allison MJ. Am J Phys Antrop 1970, 41, 295]

Xe Siècle

- **Virus :**

Smallpox virus Variole
[Fornaciari G. et al. Lancet 1986, ii, 625]

XVIe Siècle

- **Parasites :**

Pediculus capitis Pédiculose
[Capasso L. et al. Lancet 1998, 351,992]

Ier Siècle

Capilaria Capillariose
[Bouchet F. Lancet 1997, 349, 256]

- 3000 ans

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Diagnostic en Paléomicrobiologie : Immunomarquage

- **Bactéries :**

Rickettsia rickettsii Rocky Mountain spotted fever 1901

[Dumler JS JAMA 1991, 265, 718]

Treponema pallidum Syphilis XVle siècle

[Fornaciari G. et al. Lancet 1989, ii,614]

- **Bactéries :**

Trypanosoma cruzi Maladie de Chagas XVle siècle

[Dumler JS JAMA 1992, 339, 128]

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Diagnostic en Paléomicrobiologie : Isolement et Culture

- **Bactéries :**

Bacillus spp. 25-40 millions

[Cano RJ et al. Science 1995, 268,1060]

Bacillus anthracis Charbon 1917

[Redmond C. 1998, 393, 747]

Halotolerant bacterium 250 millions

[Vreeland RH et al. Nature 2000, 407, 897]

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



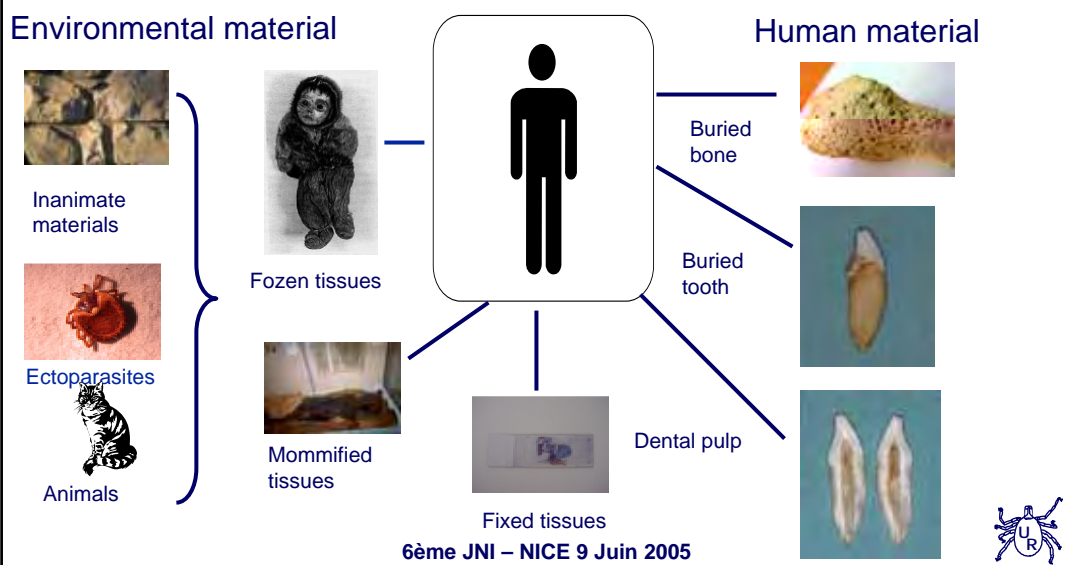
Diagnostic en Paléomicrobiologie : Méthodes moléculaires

- Clonage
- Amplification enzymatique : P.C.R.
- Séquençage

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Ancient microorganisms Human materials



Sampling for PCR detection

- Frozen tissues
- Fixed tissues
- Mummified tissues
- Bone tissues
- Teeth

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Limits of bone tissues for PCR detection

- Telluric flora contamination
- Washing out of targeted DNA
- Decalcification step
- Bone involvement

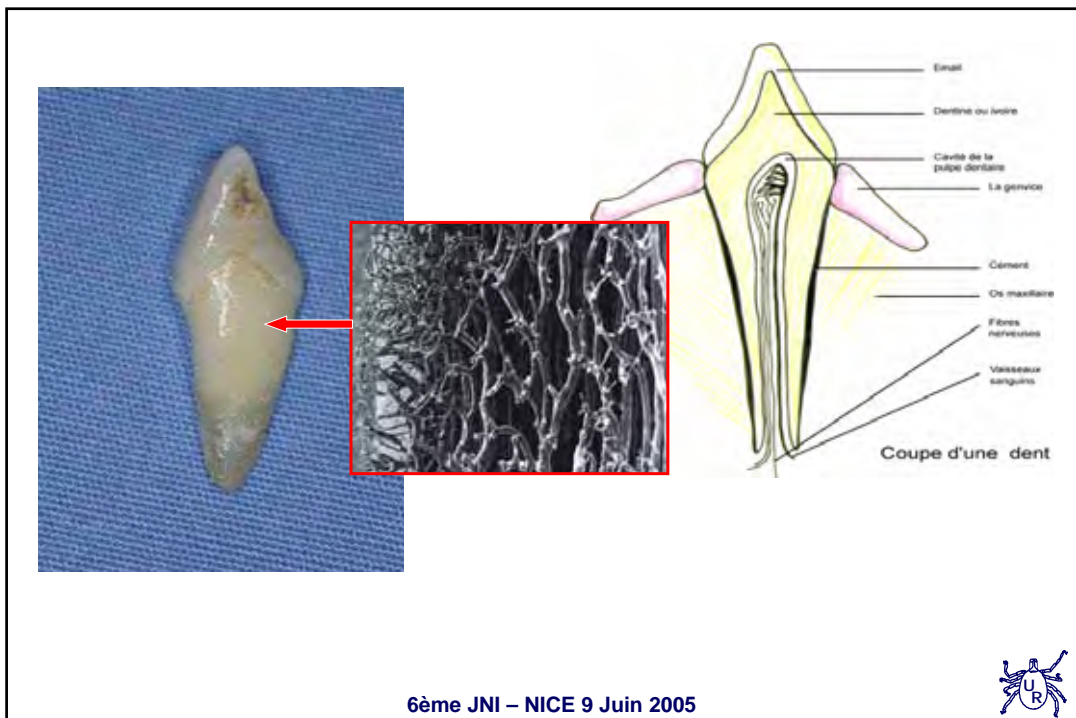
6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



The dental pulp : an answer to the material question

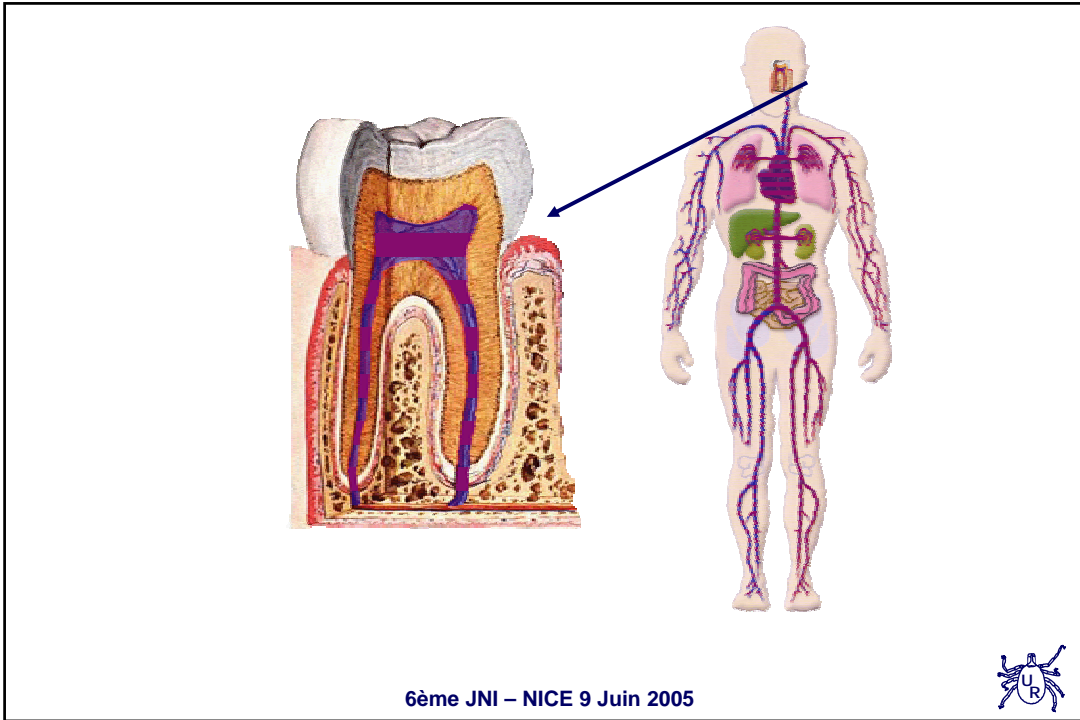
- Preserved from external wash-out and contamination
- Long-term preserved
- Highly vascularized: bacteremic pathogens
- DNA easy to extract

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



6ème JNI – NICE 9 Juin 2005





Limits of PCR with ancient DNA

- Contaminated DNA
- Chemically altered DNA
- Broken DNA
- PCR Inhibitors

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



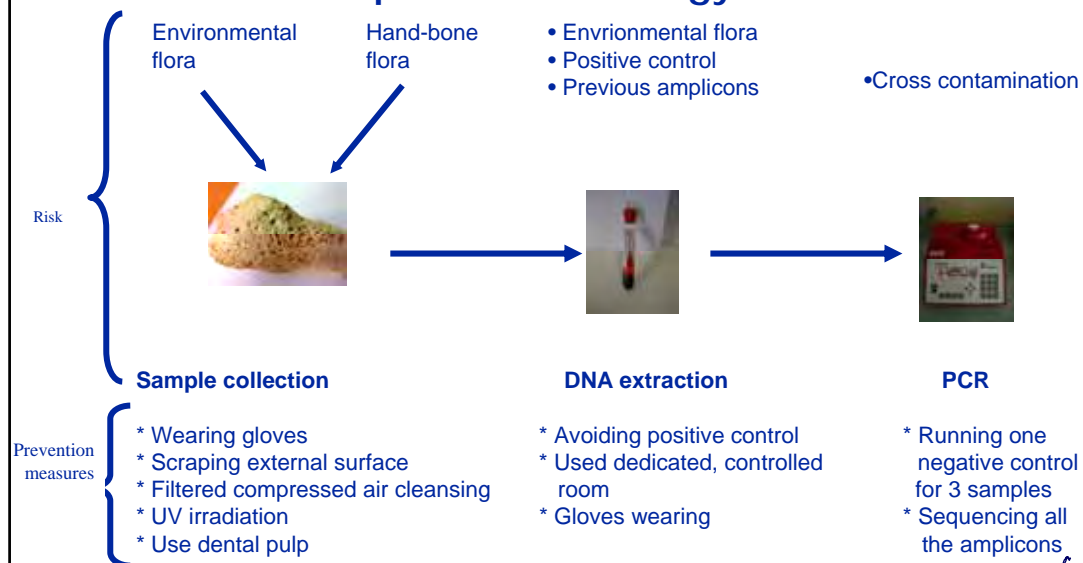
Suicide PCR: an answer to the question of contamination

- No positive control
- Targeted sequence only once in the same laboratory
- A new primer set for every new run
- Facilitated by availability of bacterial genome complete sequence

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Prevention and contamination in paleomicrobiology



6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



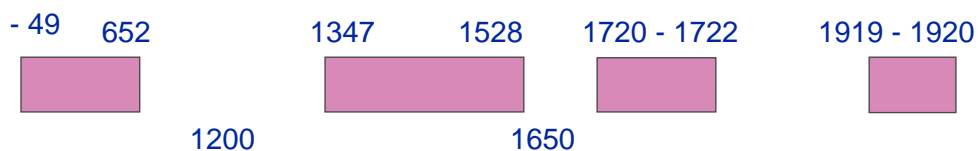
Marseilles, Vieux-Port



6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



2,000 years of plague history in Marseilles



6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Plague's history in Marseilles

- **Roman times: - 49 : Cesar**
- **Merovingian times: «First pandemia» 503, 588, 591, 599, 643, 659 Grégoire de Tours**
- **Middle age: «Second pandemia» Black Death: Novembre 1347 Guy de Chauliac**

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Plague's history in Marseilles

- **Modern times**
 - **16 epidemics from 1476 to 1598**
 - **May 1720 : about 50.000 deaths**
 - **November 1722**
- **Current times**
 - **1903 : 19 cases : 4 deaths**
 - **1919 : 28 cases : 5 deaths**
 - **1920 : 51 cases : 15 deaths**

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



M. Serre (1658-1733) Vue du Cours pendant la peste de 1720. Marseilles, Arts museum



6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Plague, Marseilles, May 1722



6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



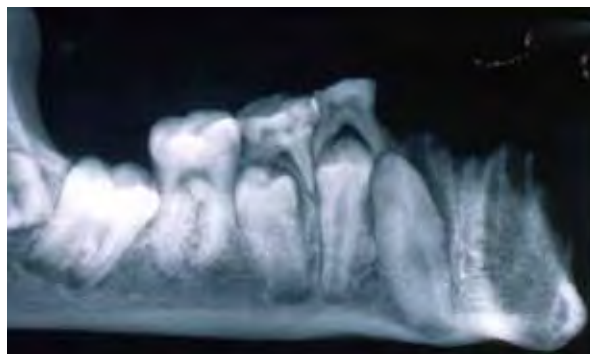
Plague, Marseilles, May 1722



6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Plague, Marseilles, May 1722



6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Plague, Marseilles, May 1722



6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Plague, Marseilles, May 1722



6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



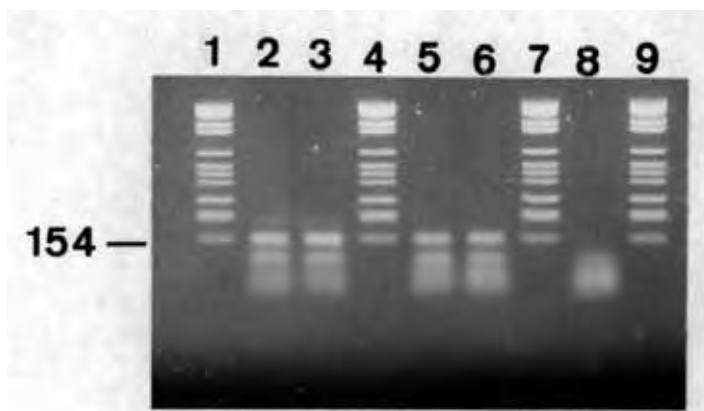
Black Death 1348, Montpellier



6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



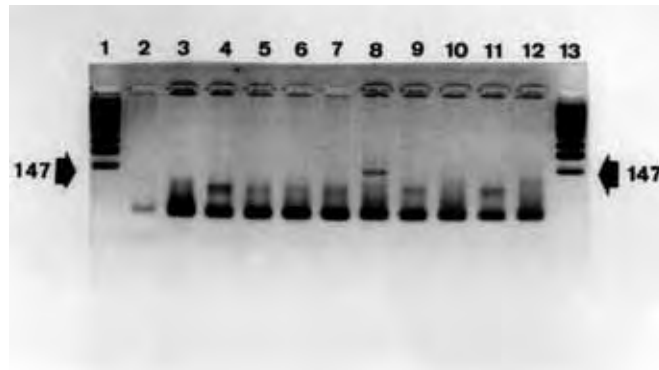
Suicide PCR, *Yersinia pestis* *pla*, Black Death, Montpellier 1348 (adults)



6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Suicide PCR, *Yersinia pestis* pla, Black Death, Montpellier 1348



6ème JNl – NICE 9 Juin 2005



Perspectives: Molecular diagnosis of Justinian plague

- Etiology of Justinian plague (541-544) is controversial
- Burials attributed to Justinian plague are scarce
- Testing teeth remains collected from these burials would allow to test the hypothesis of *Y. pestis* as the etiologic agent of Justinian plague

6ème JNl – NICE 9 Juin 2005



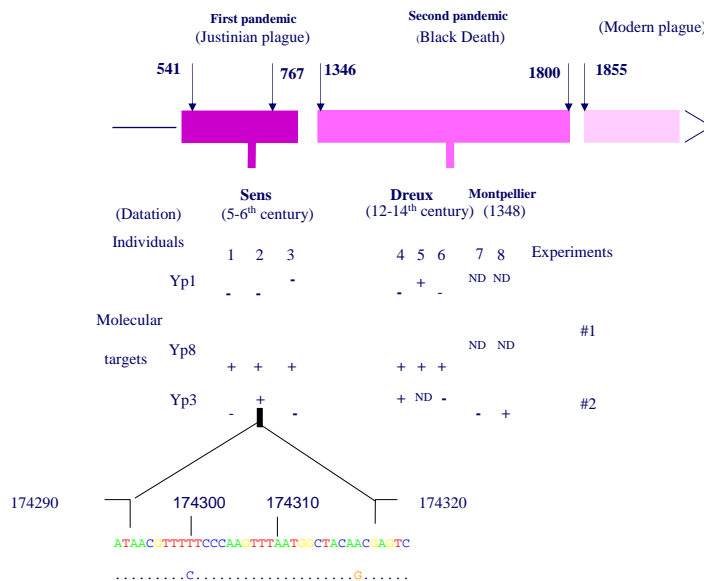
Perspectives : Genotyping ancient *Y. pestis* strains

- *Y. pestis* comprises three biotypes/genotypes: Antiqua, Medievalis, Orientalis
- Are biotypes each responsible for one pandemic ?
- Two *Y. pestis* genomes are available

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Molecular detection of *Y. pestis* in Justinian and Black Death French individual



6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



***Bartonella* spp. responsables de bactériémies chez les mammifères**

- Bacilles Gram-négatif
- Intracellulaires facultatifs
- Chaque espèce est inféodée à un hôte mammifère
- Transmission par ectoparasite
- Transmission à l'homme :
 - directe
 - indirecte par ectoparasite

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



***Bartonella* spp. responsables de bactériémies chez les mammifères**

- ***B. henselae*** :
 - Bactériémie chronique asymptomatique chez le chat, prévalence 4 – 89 %, répartition mondiale
- ***B. quintana*** :
 - Transmission : puce du chat *Ctenocephalides felis*
 - Bactériémie chronique asymptomatique chez l'homme, prévalence 14 % chez les SDF, répartition mondiale
 - transmission pour de corps *Pediculus humanus*

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



B. quintana in a 4000-year-old human tooth



B. quintana, reference
 (GeneBank
B. quintana
 (GeneBank AY 380779)

1077 1112
 | |
 TATTGTTTCGTGCTGCACTACAGGCACCAGCAGCCCA
A.....

B. quintana, reference
B. quintana, ancient

1113 1142
 | |
 AATTGCAACTAATGCAGGTGAAGAAGCAGC
C.....

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Echantillons anciens



Identification des chats	Datation	Lieu d'exhumation	Nombre de chats
1-4	XIII ^{ème} siècle	Paris (Cour Carrée - Louvre Médiéval)	4
5	XIV ^{ème} siècle	Lille Nord (Château de Courtrai)	1
6	–	Montbéliard (Bourg Saint-Martin)	1
7	XV ^{ème} siècle	Bourg La Reine (Margottin)	1
8-14	XVI ^{ème} siècle	Compiègne (Rue des Cordeliers)	7
15	–	Amiens (RX 94)	1
16-19	–	Rennes (Place Sainte - Anne)	4

Répartition des échantillons anciens fournis par le Dr Benoît Clavel ESA 8045 CNRS

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



**BARTONELLOSES ANCIENNES :
MISE EN PLACE D'UN MODELE FELIN ET APPLICATION AUX
ECHANTILLONS DE CHATS ANCIENS**



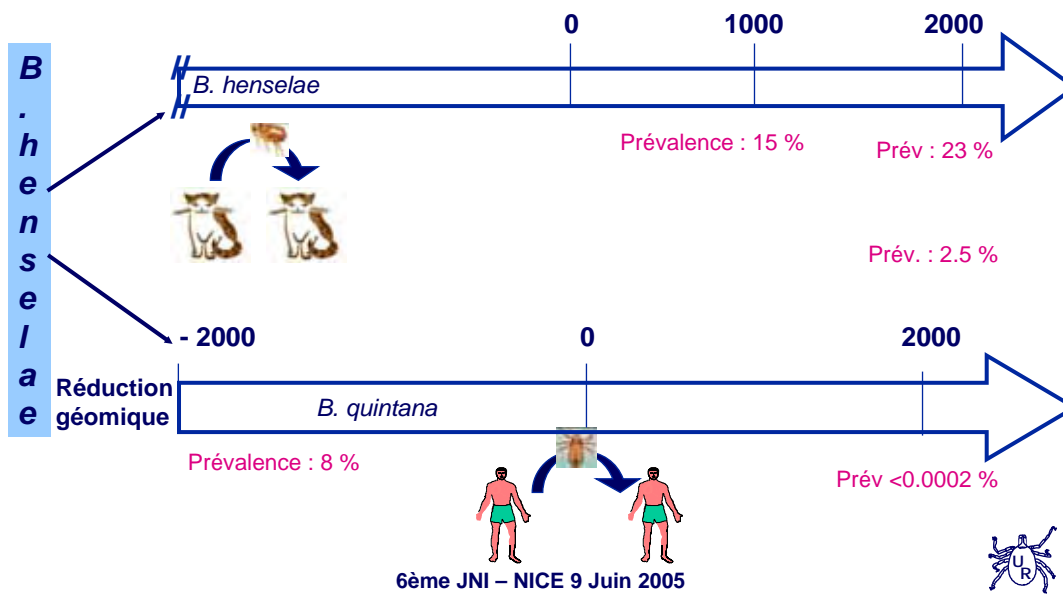
Amplification du fragment 1117-1385 du gène *groEl*

Aboudharam G., La Vu Dang, Davoust B., Drancourt M. and Raoult D.; Molecular detection of *Bartonella* spp in buried stray cat dental pulp. Microbial Pathogenesis, in press

6ème JNl – NICE 9 Juin 2005



**Co-évolution *B. henselae*, *B. quintana* et leurs
hotes**



Apport de la Paléomicrobiologie

- **Anthropologie :**
 - Etablir un diagnostic de certitude
- **Histoire de la connaissance :**
 - Histoire de la nosologie
- **Microbiologie :**
 - Evolution microbienne
 - Co-évolution microbe / vecteur / réservoir et épidémiologie
 - Emergence / ré-émergence

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005



Diagnostic en Paléomicrobiologie : Identification moléculaire : Bactéries

Bactéries non identifiées		11 - 425 millions
[Fish SA et al. Nautre 2002, 417, 132]		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose	Xe siècle
[Baron H. et al. J. Archelo. Sci. 1996, 23]		
[Salo WL. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91,2091]		
<i>Mycobacterium leprae</i>	Lèpre	Xe siècle
[Rafin A. et al. Lancet 1994, 343, 1360]		
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Maladie de Lyme	VIIe siècle - 1884
[Matuschka FR. et al. J. Infect. Dis. 1996, 174,424]		
Enterobactéries		- 12 000 ans
[Rhodes AN. et al. Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64, 651]		
<i>Escherichia coli</i>		- 300 ans
[Frickere EJ et al. Lett. Appli. Microbiol. 1997, 24, 351]		
<i>Treponema pallidum</i>		XVIIIe siècle
[Kolman CK. Et al. J. Infect. Dis 1999, 180, 2060]		
<i>Yersinia pestis</i>	Peste	1590 / 1720
[Drancourt M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95, 12637]		
[Raoult D. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 23, 12800]		1348

6ème JNI – NICE 9 Juin 2005

