

9^{es} JNI

4 Juin 2008

“Nouveaux pathogènes : une histoire qui ne finit jamais”

Didier Raoult

Marseille - France

didier.raoult@gmail.com



Hotez PJ., et al. Control of Neglected Tropical Diseases.

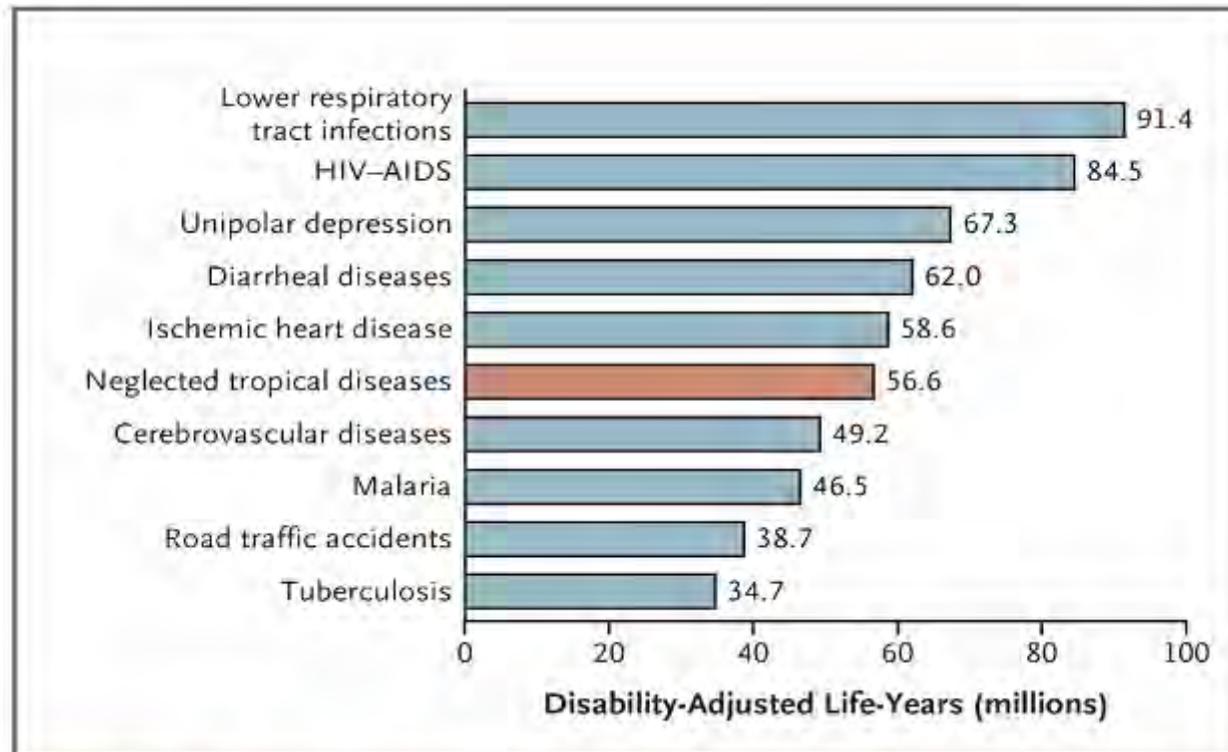


Figure 1. The 10 Leading Causes of Life-Years Lost to Disability and Premature Death.

The number of years lost to disability and premature death (disability-adjusted life-years) for the 13 major neglected tropical diseases were calculated according to a method we described previously.⁴ The disability-adjusted life-years for the other conditions are based on data from the World Health Organization.²³ The ranking of disease burdens is based on data in Hotez.⁵



Infections au XXI^{ème} siècle

Infections dans le monde :

17 millions de morts - 30%

- Les 3 grands : HIV - TB - Paludisme
- Infections respiratoires
- Infections digestives
- Infections prévenues par vaccinations
- Infections nosocomiales
- Infections émergentes
- Cancer



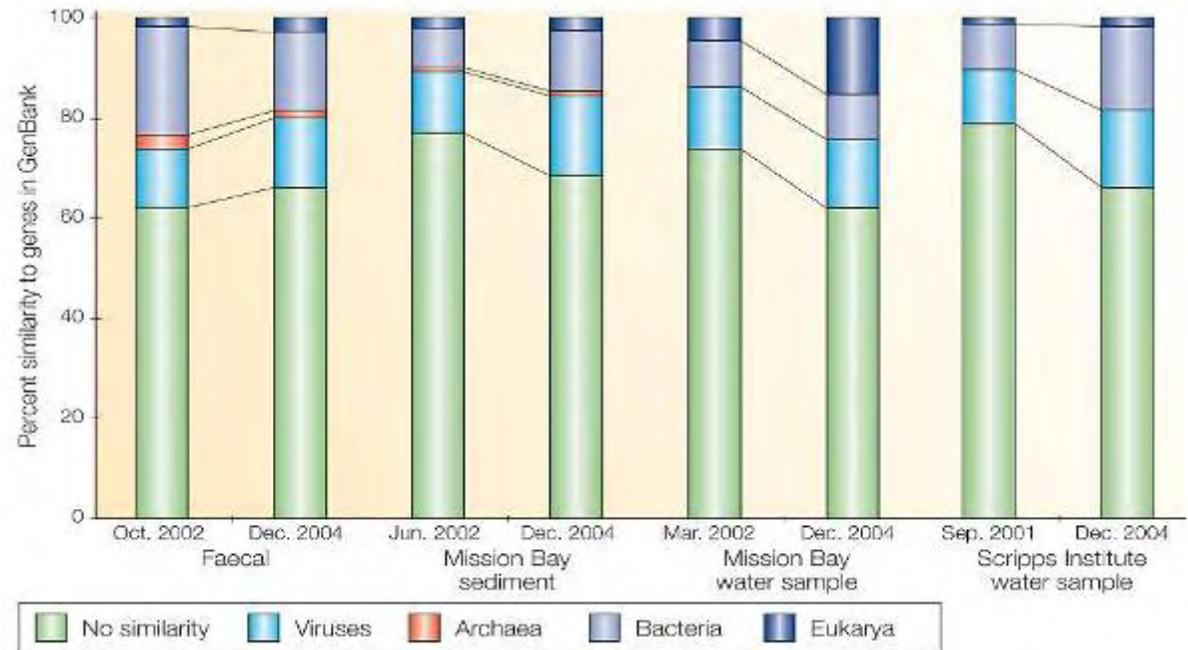
Pourquoi trouvons-nous de nouvelles maladies infectieuses?

- ① Nouveaux outils pour améliorer la découverte et palier au manque de connaissances
- ② Changements de notre environnement et mondialisation (voyage – technologie – zoonoses)
- ③ Nouveaux organismes : virus à ARN, organismes résistants



La métagénomique

- 10-15% des organismes ont des ribosomes
- 15-30% des virus sont connus
- 55-70% ???



Séquences ADN du vivant au XXI^{ème} siècle

Raoult D, Forterre P. Redefining viruses: lessons from Mimivirus. Nat Rev Microbiol.

2008 ;6(4):315-9.



Les outils de la découverte

La Biologie

- XIX^{ème} siècle : culture axénique et microscope optique
- XX^{ème} siècle :
 - Culture spécifique
 - Identification moléculaire
- XXI^{ème} siècle :
 - Métagénomique

Les postulats de base

- Infections aiguës – postulat de Koch
- Infections chroniques ?



Nouveaux outils

- **Biologie Moléculaire**
 - Amplification
 - Séquence
 - GenBank
- **Méthodes de culture**
 - Culture cellulaire
 - Incubation prolongée
 - Amibes
- **Nouveau concept**
 - Infections chroniques
- **Métagénomique**



Séquences de gène rARN 16S - identification basée sur les isolats bactériens cliniques

- Étude prospective de 4 ans (1998-2001)
- Un total de 844 bactéries isolées
- Un total de 89 espèces inhabituelles (10,5%) :
 - 3 nouvelles espèces en hémocultures : *Prevotella* spp., *Acidovorax* spp., *Veillonella* spp.
 - 44 espèces jamais trouvées chez des patients
 - 35 espèces trouvées < 10 fois
 - 7 espèces trouvées 11 - 50 fois

***i.e.* 47 nouveaux pathogènes !**



MINIREVIEW

16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls[▽]

J. Michael Janda* and Sharon L. Abbott

Microbial Diseases Laboratory, Division of Communicable Disease Control, California Department of Public Health, Richmond, California 94804

1980 in the *Approved Lists*, 1,791 valid names were recognized at the rank of species. Today, this number has ballooned to 8,168 species, a 456% increase (<http://www.bacterio.cict.fr/number.html#total>). The explosion in the number of recognized taxa is directly attributable to the ease in performance of 16S rRNA gene sequencing studies



Nouveaux outils

- **Biologie moléculaire**
 - Amplification
 - Séquences
 - GenBank
- **Méthodes de culture**
 - Cultures cellulaires
 - Incubation prolongée
 - Amibes
- **Nouveau concept**
 - Infections chroniques
- **Métagénomique**



Nouvelles identifications

Helicobacter pylori

- Ulcère Gastro-duodénal
- Cancer de l'estomac

Découvert depuis le XIX^{ème} siècle



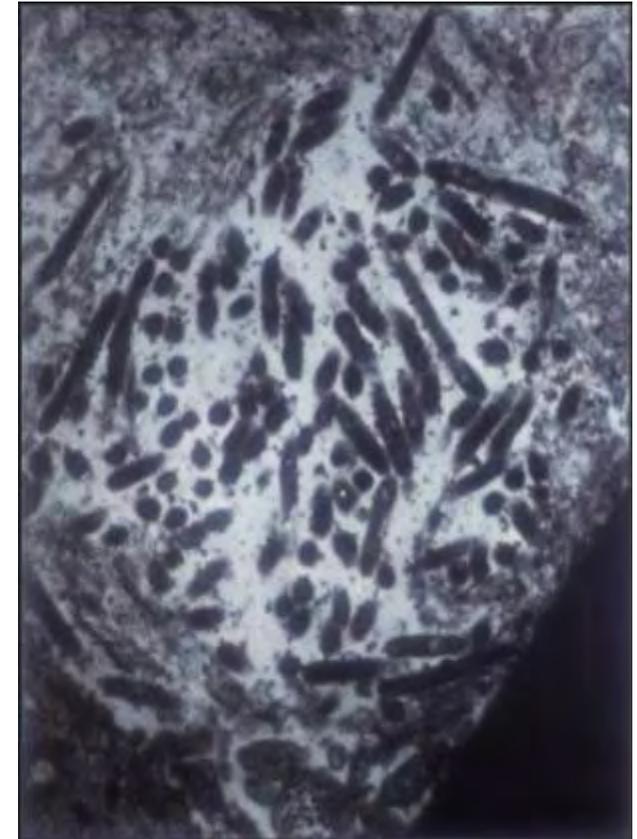
Growing the bacteria

- **Je Ne Sais Pas** protocol
(I don't know what I am growing)
- **Inoculate** - 1 ml/blood
 - crushed biopsy sample
- **3 shells vials seeded with human cell lines**
 - fibroblasts (HEL)
 - endothelial cells (ECV)
- **Every week observation of cytopathic effect, and different staining** (Gimenez, Gram, Giemsa), for 6 months
- **Generated in 1992 for blood culture negative, IE**



Maladies de Whipple: les principales dates

Année	Contribution
1907	Première description
1947	Premier rapport avant la mort
1950	Inclusions positives aux PAS dans les macrophages
1952	Premier traitement avec les antibiotiques
1952	Première description de changements cardiaques
1958	Biopsies pour établir le diagnostic
1961	La bactérie est vue en microscopie électronique
1981	Bactérie intracellulaire intacte
1991	Séquence partielle d'ARN 16S ribosomal
1992	Confirmation de l'ARN 16S ribosomal Un nom est proposé " <i>Tropheryma whippelii</i> "
2000	Découverte et culture d'une souche de la bactérie de la maladie de Whipple
2001	Nom officiel <i>T. whippelii</i>
2003	Séquence du génome
2003	Culture axénique
2007	Porteur sain – infection aiguë ?



Raoult D. et al. N Engl J Med. 2000; 342:620-5

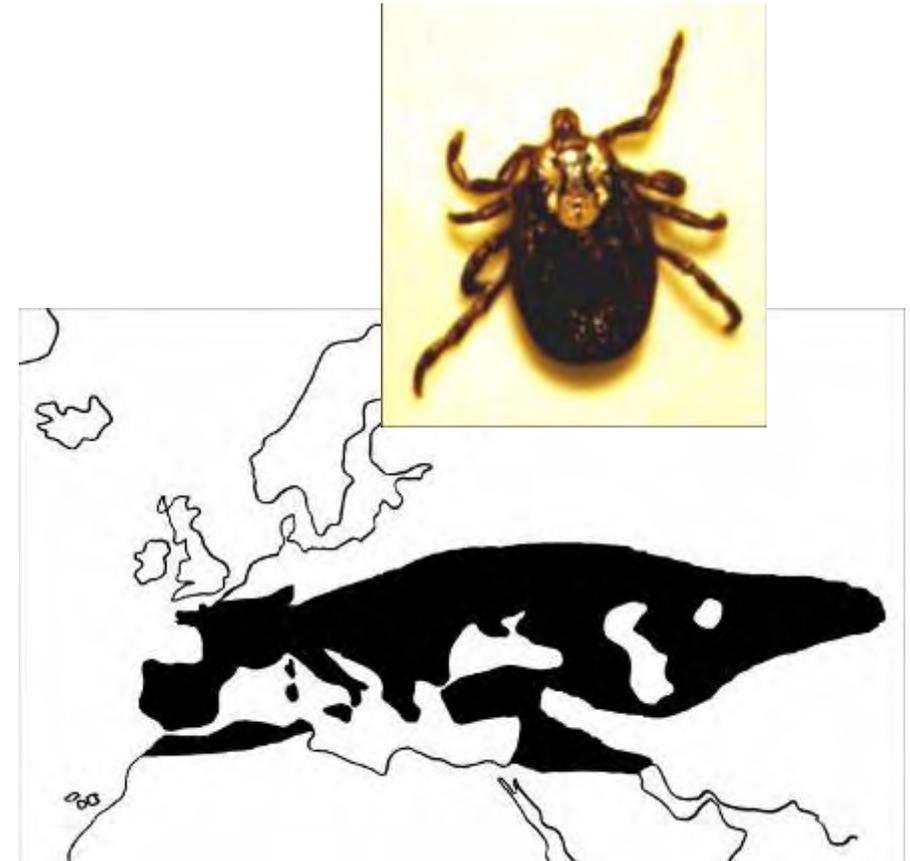
Renesto P. et al. Lancet. 2003; 362:447-9.

Raoult D. et al. Genome Res. 2003; 13:1800-9.

Rickettsia slovaca

Maladie infectieuse émergente (1997)

- Isolée en Slovaquie en 1968
- Transmise par *Dermacentor marginatus* et *Dermacentor reticulatus*
- Un premier cas confirmé à Marseille
(Raoult *et al.*, Lancet.1997;350:112-3)
- Fièvre, gros nodules lymphatiques, érythème
- Symptômes neurologiques
- Diagnostic de maladie de Lyme
- Décrit comme TIBOLA en Hongrie
(Lakos A, *et al.* Lancet. 1997;350:1006)
- Trouvé dans le sang
(Cazorla C, *et al.* Emerg Infect Dis. 2003;9:135)



Infection à *R. slovaca* (comparée à MSF)

- Basée sur 17 cas confirmés par PCR
- Plus de morsure de tique
- Lésions dans les cheveux
- Moins de fièvre
- Plus de nodules cervicaux
- Séquelles : asthénie résiduelle
alopécie localisée
- Taux de mortalité bas
- Jeune âge
- Femelles > mâles
- Titres sérologiques bas



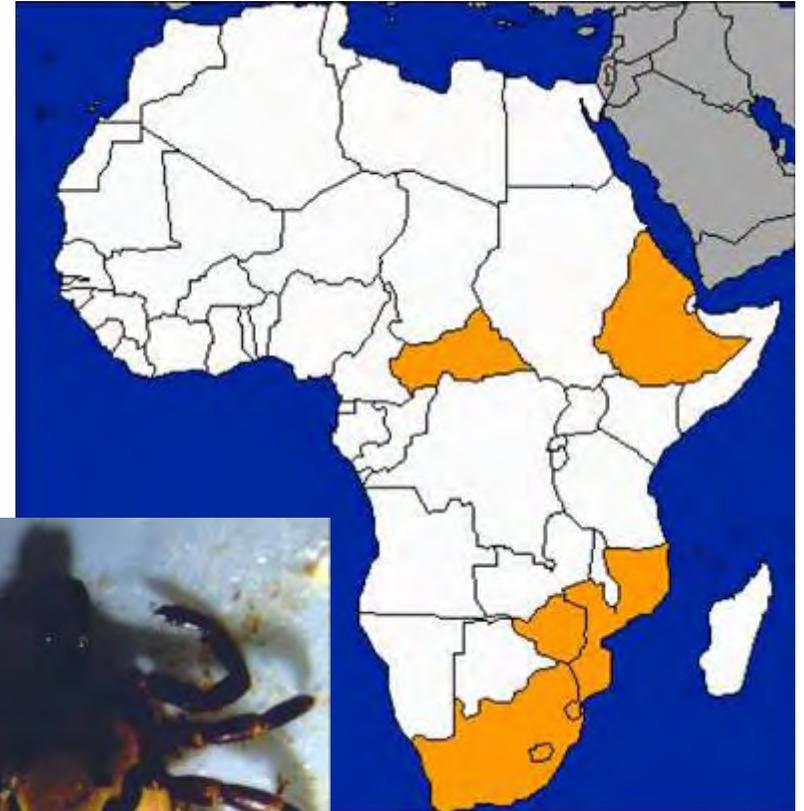
(Raoult D, et al. Clin Infect Dis. 2002 ;34:1331-6.)



Fièvre africaine à tiques

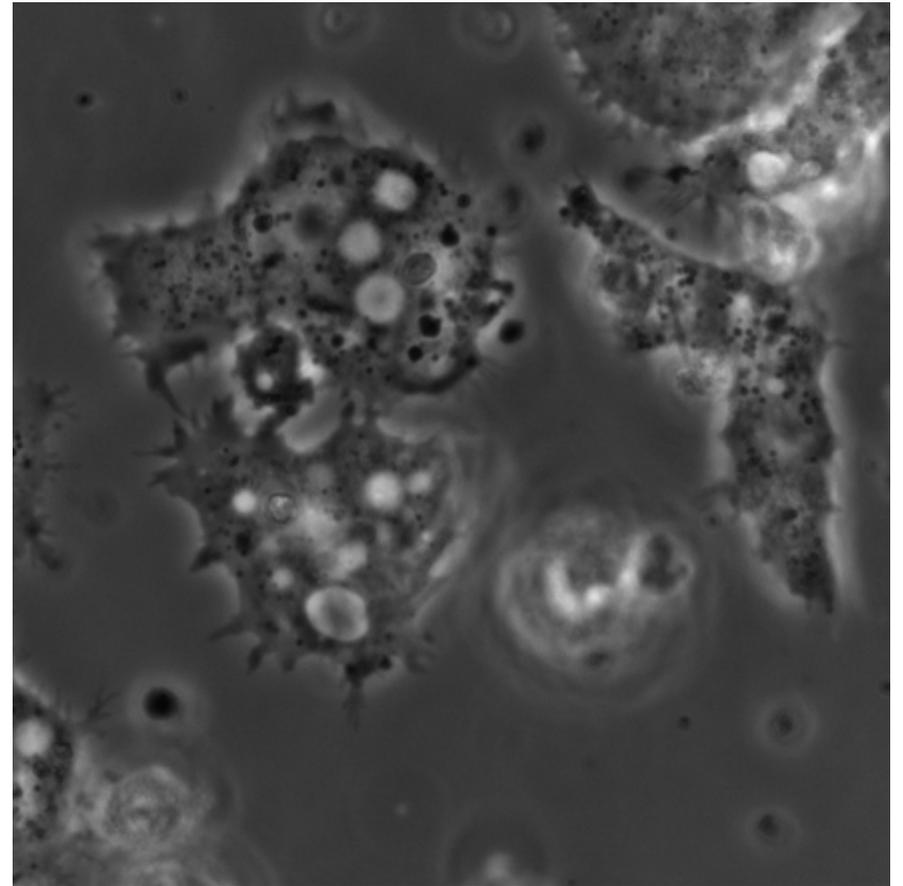
Maladie infectieuse émergente (1992)

- *Rickettsia africae*
- Transmise par les piqûres de tique (*Amblyomma hebraeum*)
- Haute incidence en Afrique du Sud
- Fièvre, "taches noires" (multiples)
rares éruptions (vésiculaires)
- Doux
- Découverte 2 fois
- Considéré comme identique à MSF jusqu'en 1992



Pneumonie

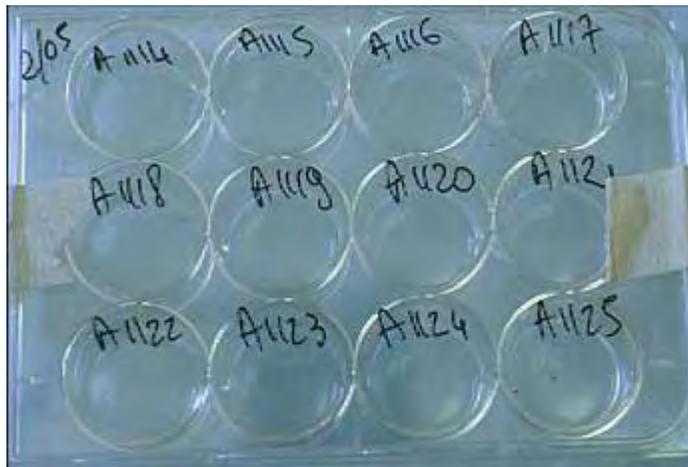
- L'agent causal de la pneumonie est inconnu dans $> 40\%$
- Les amibes de l'eau peuvent contenir des agents pathogènes
- Les amibes sélectionnent les futurs pathogènes
- Nous avons décidé de tester les bactéries associées aux amibes comme agents potentiels de pneumonie



Les amibes utilisées comme outil pour l'isolation de bactéries

- Première description par T. Rowbotham
 - Système shell vial
 - Bien adapté aux échantillons simples
- Permet d'isoler des bactéries dans des échantillons contaminés
- Isolation de *L. pneumophila*
- A partir de crachats et de selles
- Quand la bactérie pousse seulement dans les amibes
- Nommée : *Legionella-like amoebal pathogen* (LLAP)

Modifié dans notre laboratoire

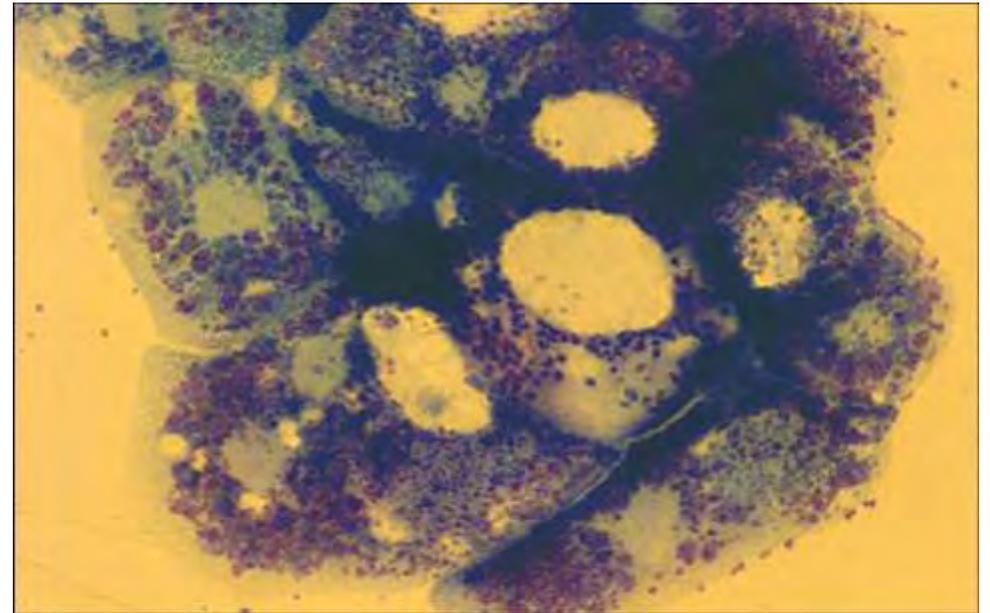


▫ La Scola B, Mezi L, Weiller PJ, Raoult D. Isolation of *Legionella anisa* using an amoebic coculture procedure. *J Clin Microbiol.* 2001 ;39(1):365-6.



Parachlamydia

- Par séquençage de l'ARNr 16S
- Étonnamment un des isolats de LLAP était un agent ressemblant à *Chlamydia*
- Nommé depuis *Parachlamydia acanthamoebae* et qui cause de rares cas de pneumonie

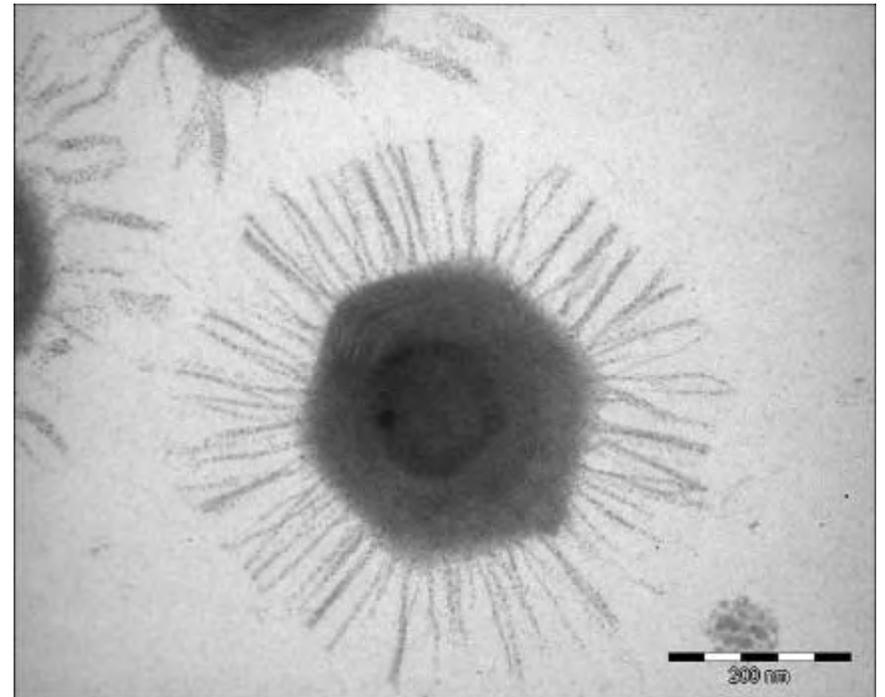


- Birtles RJ, Rowbotham TJ, Storey C, Marrie TJ, Raoult D. Chlamydia-like obligate parasite of free-living amoebae. Lancet. 1997;349:925-6.
- Greub G, Berger P, Papazian L, Raoult D. Parachlamydiaceae as rare agents of pneumonia. Emerg Infect Dis. 2003; 9(6):755-6.



Mimivirus

- En 1992 Rowbotham qui travaillait sur les relations entre les amibes et les *Legionelles* a isolé un nouveau coccus Gram positif dans un climatiseur après une épidémie de pneumonie à Bradford, UK, en utilisant les amibes comme système de culture
- Il a été considéré comme un LLAP (Legionella Like Amoebal Pathogen) comme les autres
- La collection de LLAP a été apportée à Marseille-France par Richard Birtles un post-doctorant anglais.



Mimivirus in Pneumonia Patients

**Bernard La Scola,* Thomas J. Marrie,†
Jean-Pierre Auffray,‡ and Didier Raoult***

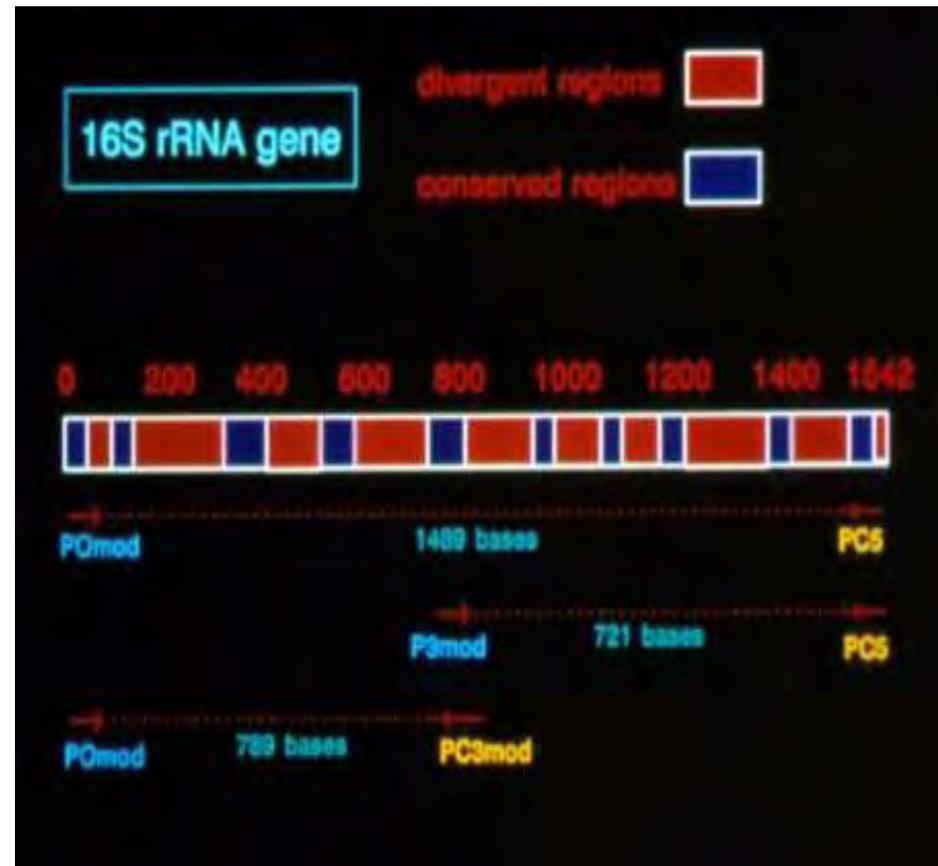
Mimivirus, the largest virus known to date, is an amoeba-like pathogen—like *Legionella* sp. When Mimivirus was used as an antigen in a migration inhibition factor assay, seroconversion was found in patients with both community- and hospital-acquired pneumonia. Mimivirus DNA was found in respiratory samples of a patient with hospital-acquired pneumonia.

Emerg Infect Dis, 2005;11:449-452



Les nouveaux outils

- **Biologie moléculaire**
 - Amplification
 - Séquences
 - GenBank
- **Méthodes de culture**
 - Cultures de cellulaires
 - Incubation prolongée
 - Amibe
- **Nouveau concept**
 - Infections chroniques
- **Métagénomique**



Les infections au XXI^{ème} siècle

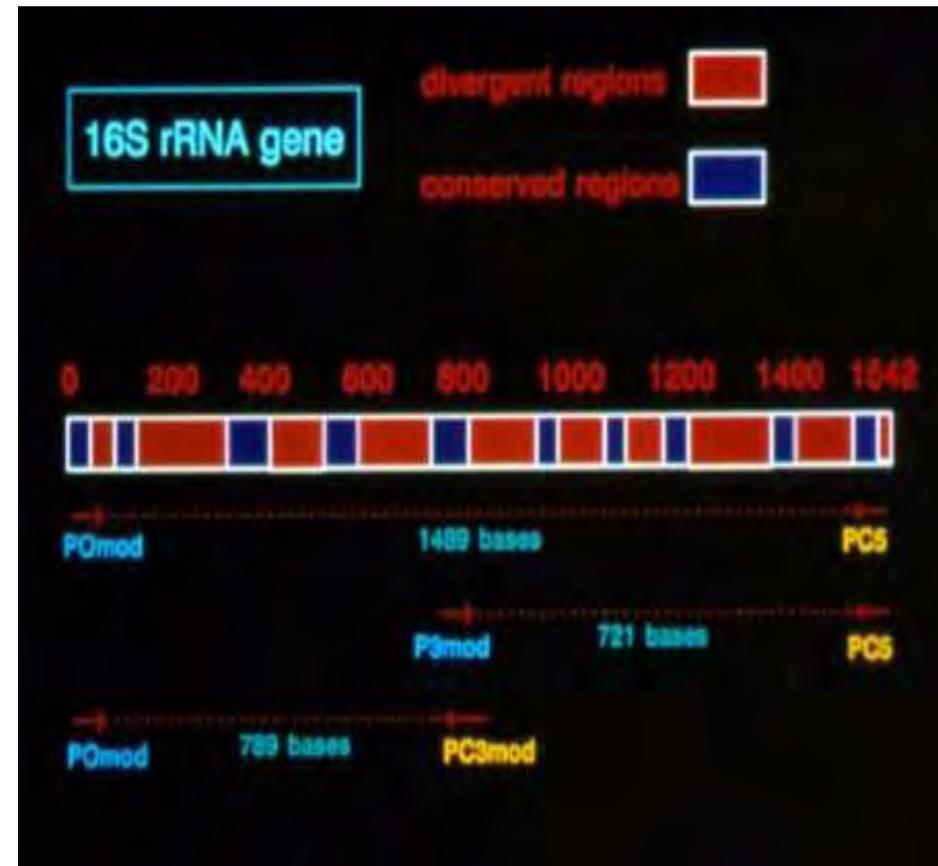
Infections chroniques :

- Cancer 25%
 - Foie (Hépatites B et C)
 - Estomac (Helicobacter)
 - Col de l'utérus (HPV)
 - Lymphome (EBV à 25%)
 - Gorge (HPV16)
- Autres
 - Ulcères gastro-duodénaux
 - Cirrhose hépatique
- HIV et Hépatites (B-C-D)



Les nouveaux outils

- **Biologie moléculaire**
 - Amplification
 - Séquences
 - GenBank
- **Méthodes de culture**
 - Cultures cellulaires
 - Incubation prolongée
 - Amibes
- **Nouveau concept**
 - Infections chroniques
- **Métagénomique**

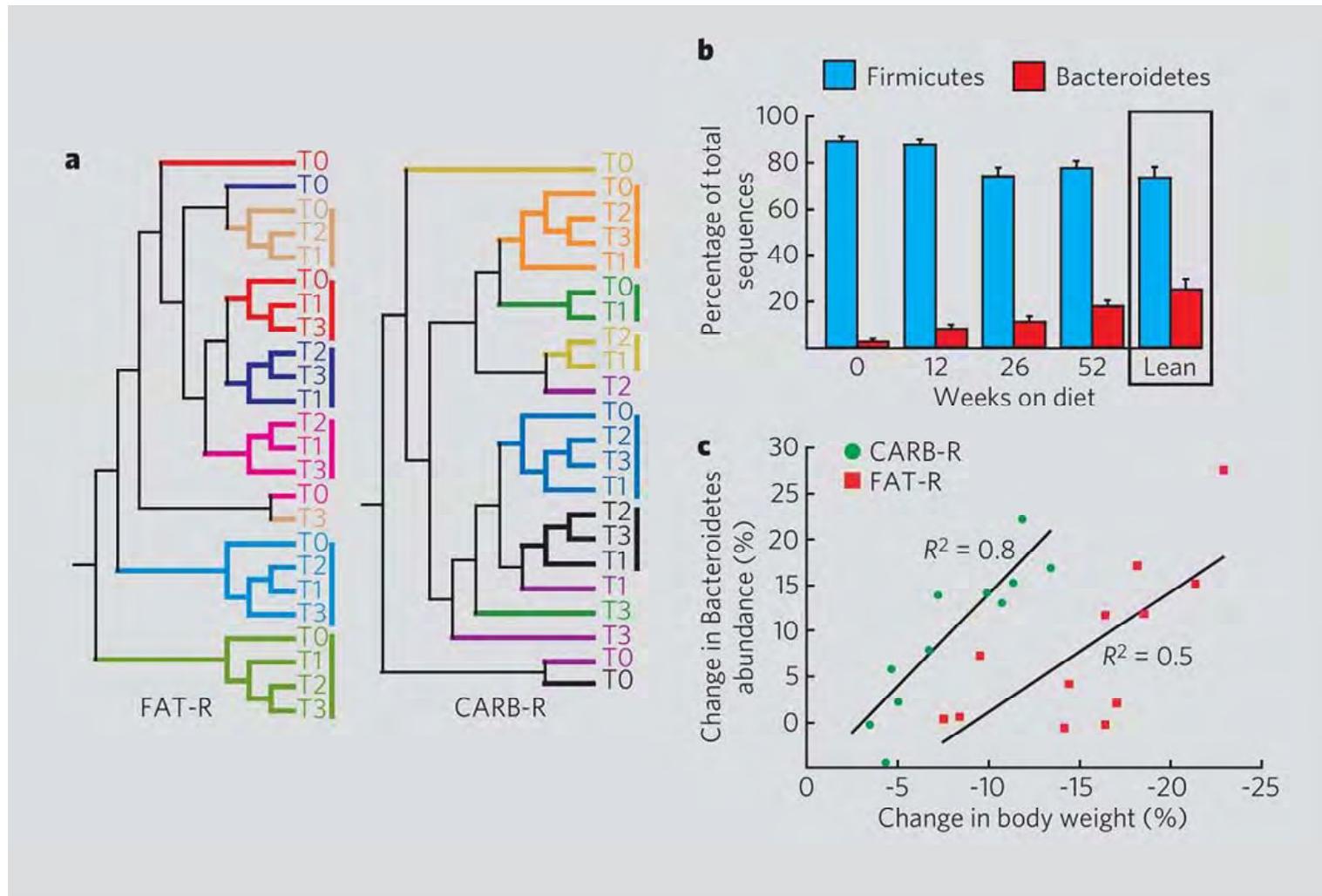


Nouveaux secteurs – Nouvelles stratégies

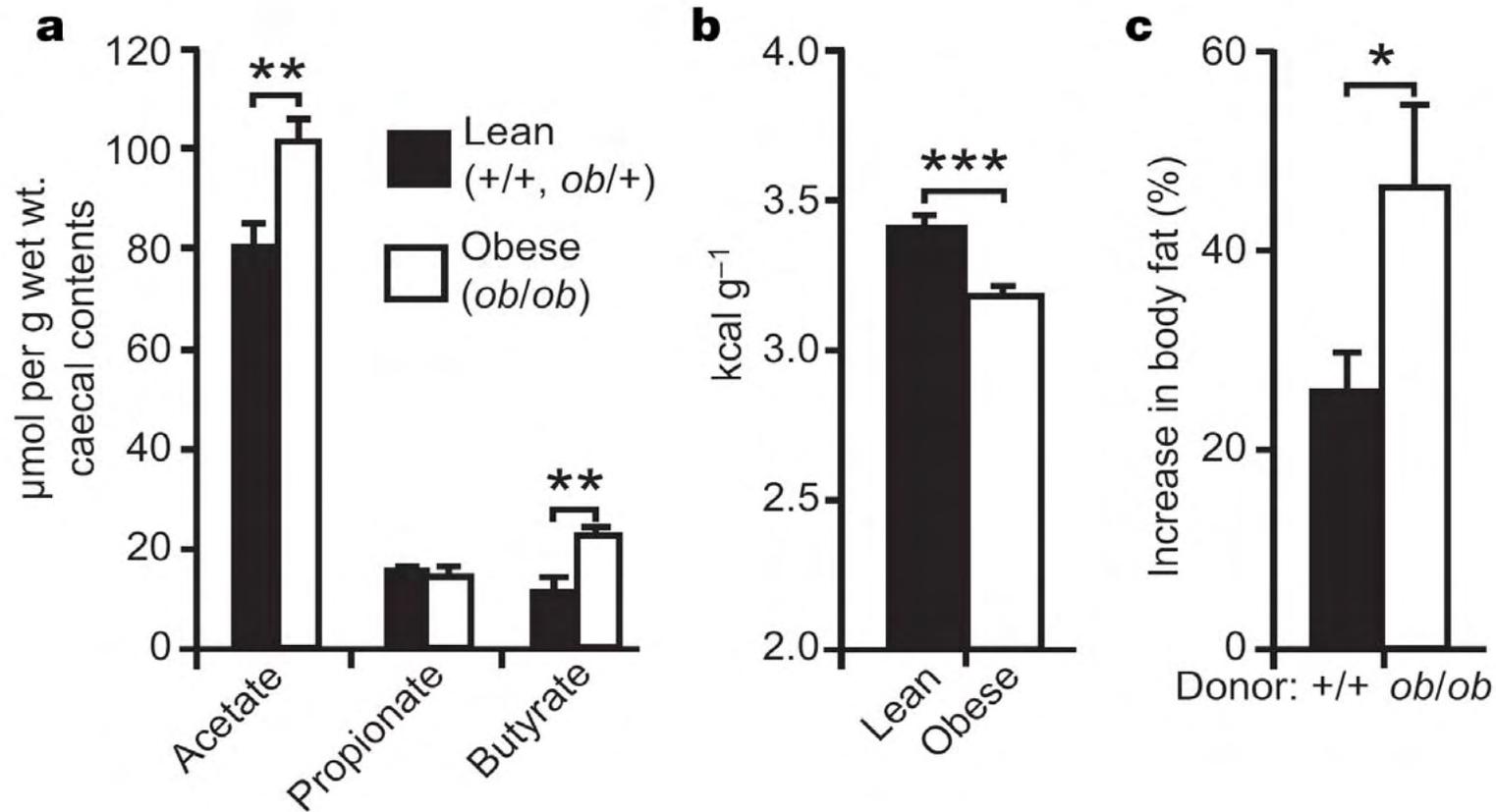
- Métagénomique = tout séquencer
- Selles
 - Bactéries (Ley RE, *et al.* Nature 2006;444:1022-3 and Turnbaugh PJ. *et al.* Nature 2006, 444:1027-31)
 - Virus (Zhang T *et al.* RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. Plos Biol 2006;4:e3.)
- Pneumonie et mucoviscidose
- Abcès cérébraux
- Infections osseuses (Fenollar F *et al.* Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. JCM 2006; 44:1018-28)
- Vaginoses bactériennes
- Bactéries de la langue



Ley RE., Turnbaugh PJ., Klein S., Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity. Nature 2006;444:1022-3.



Turnbaugh PJ., Ley RE., Mahowald MA., Magrini V., Mardis ER., Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 2006;444:1027-31.



Lactobacillus probiotique

(Commun dans les yaourts et les produits laitiers)

- Une inoculation augmente la taille des poulets de 15% à 30%
- Rôle dans l'obésité? Dans l'augmentation de la taille humaine?



Raoult D. Obesity pandemics and the modification of digestive bacterial flora. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008

Khan M, Raoult D, Richet H, Lepidi H, La Scola B. Growth-promoting effects of single-dose intragastrically administered probiotics in chickens. Br Poult Sci. 2007 ;48:732-5.



Analysis of 525 Samples To Determine the Usefulness of PCR Amplification and Sequencing of the 16S rRNA Gene for Diagnosis of Bone and Joint Infections

Florence Fenollar,^{1,2} Véronique Roux,^{1,2} Andréas Stein,¹ Michel Drancourt,^{1,2} and Didier Raoult^{1,2*}

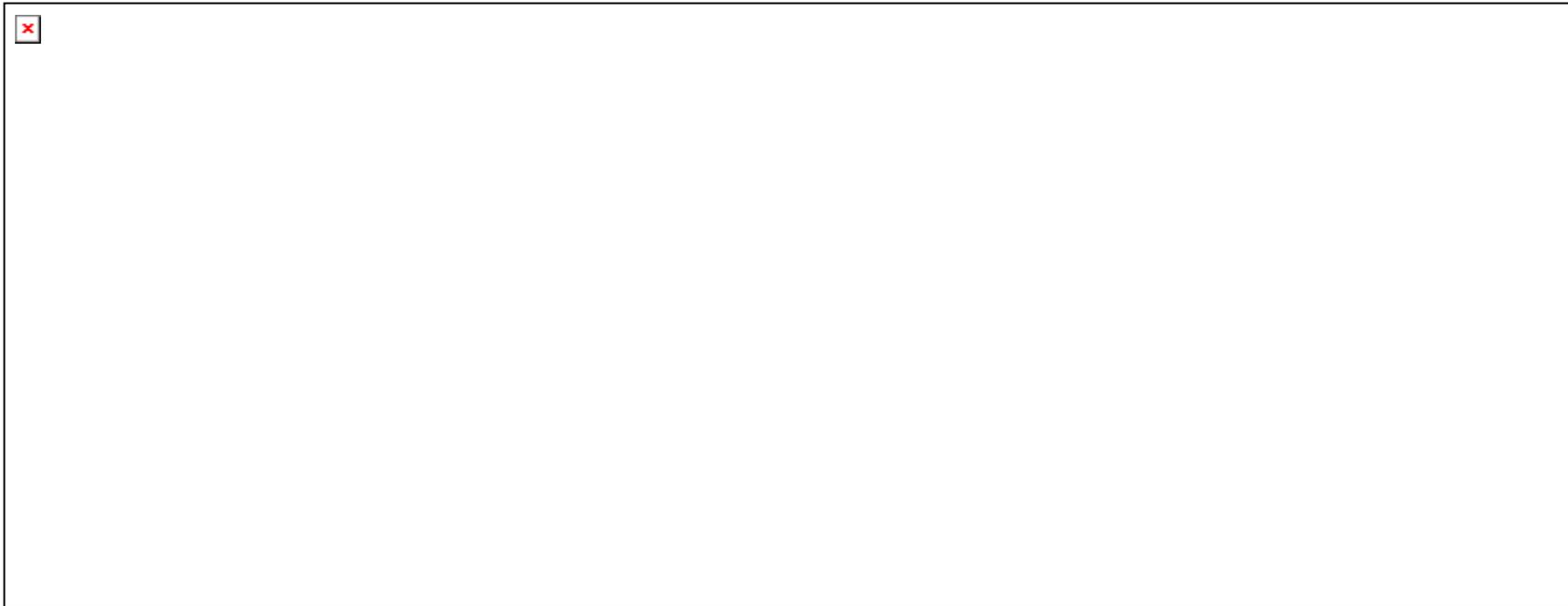
Unité des Rickettsies, CNRS UMR 6020, IFR 48, Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée, Marseille, France,¹ and Fédération de Microbiologie Clinique, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Hôpital de la Timone, Marseille, France²

Received 23 August 2005/Returned for modification 5 October 2005/Accepted 22 November 2005

The 16S rRNA gene PCR in the diagnosis of bone and joint infections has not been systematically tested. Five hundred twenty-five bone and joint samples collected from 525 patients were cultured and submitted to 16S rRNA gene PCR detection of bacteria in parallel. The amplicons with mixed sequences were also cloned. When discordant results were observed, culture and PCR were performed once again. Bacteria were detected in 139 of 525 samples. Culture and 16S rRNA gene PCR yielded identical documentation in 475 samples. Discrepancies were linked to 13 false-positive culture results, 5 false-positive PCR results, 9 false-negative PCR results, 16 false-negative culture results, and 7 mixed infections. Cloning and sequencing of 16S rRNA gene amplicons in 6 of 8 patients with mixed infections identified 2 to 8 bacteria per sample. Rarely described human pathogens such as *Alcaligenes faecalis*, *Comamonas terrigena*, and 21 anaerobes were characterized. We also detected, by 16S rRNA gene PCR, four previously identified bacteria never reported in human infection, *Alkanindiges illinoisensis*, dehydroabietic acid-degrading bacterium DhA-73, unidentified Hailaer soda lake bacterium, and uncultured bacterium clone HuCa4. Seven organisms representing new potential species were also detected. PCR followed by cloning and sequencing may help to identify new pathogens involved in mixed bone infection.



- *Atopobium vaginae* et vaginoses bactériennes
- Non identifié par le Gram (Score de Nugent)
- Trouvé par métagénomique (Fredricks DN., et al. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. N Engl J Med 2005;353:1899-911.)
- Trouvé par PCR dans 96% des patients (Verhelst R., et al. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. BMC Microbiol 2004; 21;4:16)



Métagénomique bactérienne et mauvaise haleine

Solobacterium moorei est
spécifiquement trouvée sur la
langue des sujets ayant
suggérant un traitement ciblé
(8/8 vs 0/5)

Haraszthy V.I. *et al.* Identification of
oral bacterial species associated with
halitosis. JADA. 2007; 138: 1113-
1120.



RNA Viral Community in Human Feces: Prevalence of Plant Pathogenic Viruses

Tao Zhang¹, Mya Breitbart², Wah Heng Lee¹, Jin-Quan Run¹, Chia Lin Wei¹, Shirlena Wee Ling Soh¹, Martin L. Hibberd¹, Edison T. Liu¹, Forest Rohwer², Yijun Ruan^{1*}

1 Genome Institute of Singapore, Singapore, **2** Department of Biology, San Diego State University, San Diego, California, United States of America

The human gut is known to be a reservoir of a wide variety of microbes, including viruses. Many RNA viruses are known to be associated with gastroenteritis; however, the enteric RNA viral community present in healthy humans has not been described. Here, we present a comparative metagenomic analysis of the RNA viruses found in three fecal samples from two healthy human individuals. For this study, uncultured viruses were concentrated by tangential flow filtration, and viral RNA was extracted and cloned into shotgun viral cDNA libraries for sequencing analysis. The vast majority of the 36,769 viral sequences obtained were similar to plant pathogenic RNA viruses. The most abundant fecal virus in this study was pepper mild mottle virus (PMMV), which was found in high concentrations—up to 10^9 virions per gram of dry weight fecal matter. PMMV was also detected in 12 (66.7%) of 18 fecal samples collected from healthy individuals on two continents, indicating that this plant virus is prevalent in the human population. A number of pepper-based foods tested positive for PMMV, suggesting dietary origins for this virus. Intriguingly, the fecal PMMV was infectious to host plants, suggesting that humans might act as a vehicle for the dissemination of certain plant viruses.

Citation: Zhang T, Breitbart M, Lee WH, Run J, Wei CL, et al. (2006) RNA viral community in human feces: Prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol* 4(1): e3.



Zhang T., *et al.* PLoS Biol. 2006;4:e3

Table2. Viruses identified in three RNA viral libraries (extract)

Viruses	Library 1	
	Clones	Percent
PMMV	7,966	79.97%
Tobacco mosaic virus	91	0.91%
Picobirnavirus	27	0.27%
Tomato mosaic virus	12	0.12%
Oat blue dwarf virus	1,358	13.63%
Grapevine asteroid mosaic-associated virus	302	3.03%
Maize rayado fino virus	91	0.91%
Grapevine red globe virus	16	0.16%
Physalis mottle tymovirus	11	0.11%
Poinsettia mosaic virus	11	0.11%
Grapevine rupestris vein feathering virus	10	0.10%
Prunus necrotic ringspot	9	0.09%
Nigerian tobacco latent virus	7	0.07%
Eggplant mosaic virus	5	0.05%
Grapevine fleck virus	5	0.05%
Ononis yellow mosaic virus	3	0.03%
Obuda pepper virus	2	0.02%



TABASCO, Hot Ketchup et selles humaines

- Détection positive par RT-PCR

TEM ~ 10⁹/ml

- Se multiplient-ils chez les humains ?
- Est-ce la cause de quelque chose ?



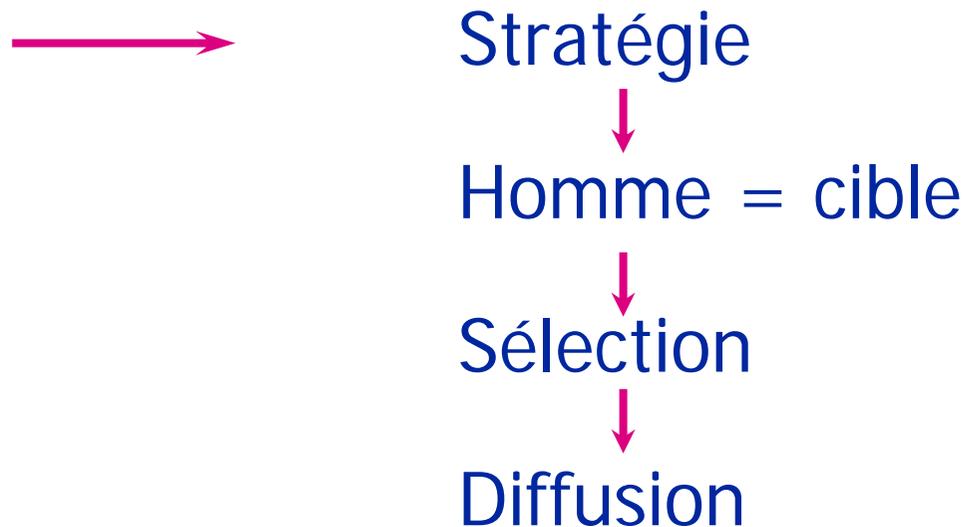
Pourquoi trouvons-nous de nouvelles maladies infectieuses?

- ① Nouveaux outils pour améliorer la découverte et palier au manque de connaissances
- ② Changements de notre environnement et mondialisation (voyages – technologie – zoonoses)
- ③ Nouveaux organismes: virus à ARN, organismes résistants



Maladies infectieuses

→ Accidentel (à partir de virus commensaux humains ou des microorganismes de l'environnement : zoonoses ou amibes)



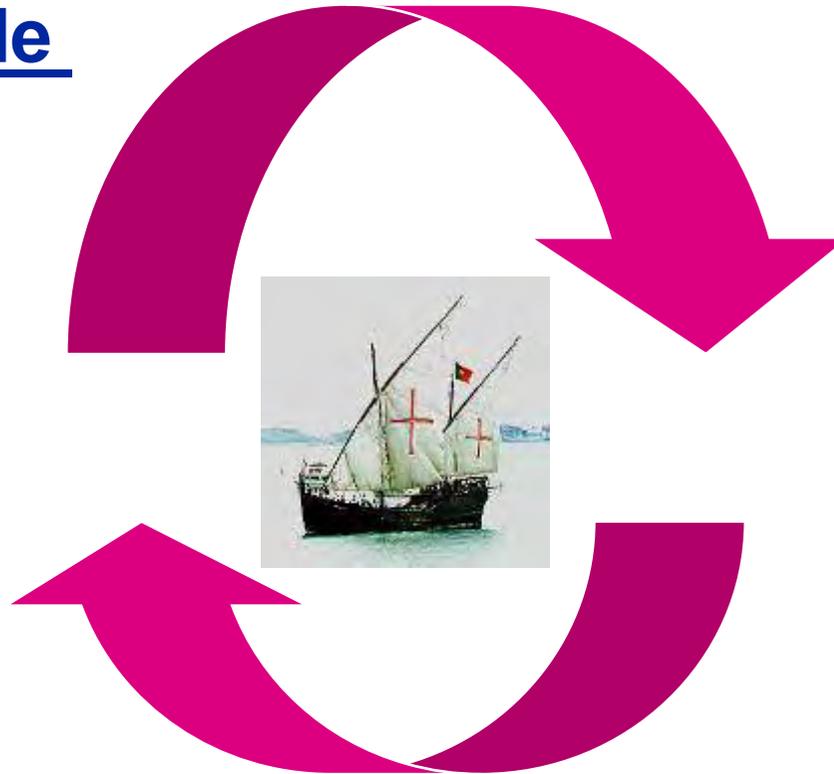
Diffusion par les voyages

Vieux monde

- Variole
- Rougeole

- Chevaux

- Alcool
- Opium



Amérique

- Syphilis
- Typhus ?

- Tomate
- Patates
- Maïs

- Tabac
- Coca

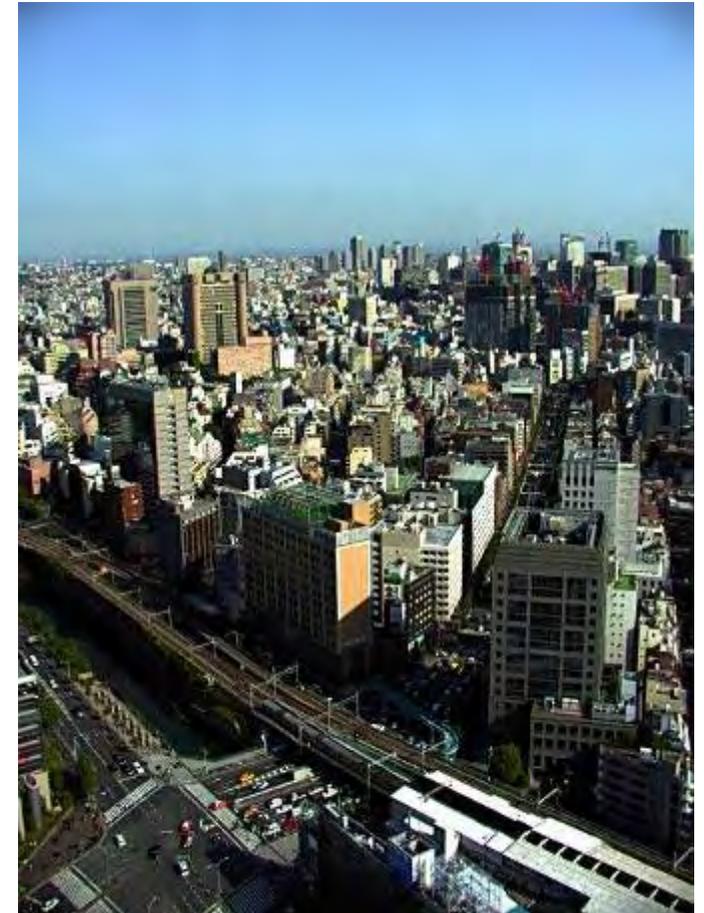
Aujourd'hui

2 milliards de passagers par an



Concentrations humaines

- Mégapoles (10 millions d'habitants)
- 24 (Europe : 1, USA : 2, Amérique latine : 2, Asie : 16, Afrique : 1)
- Population urbaine : 1,6 milliards d'humains

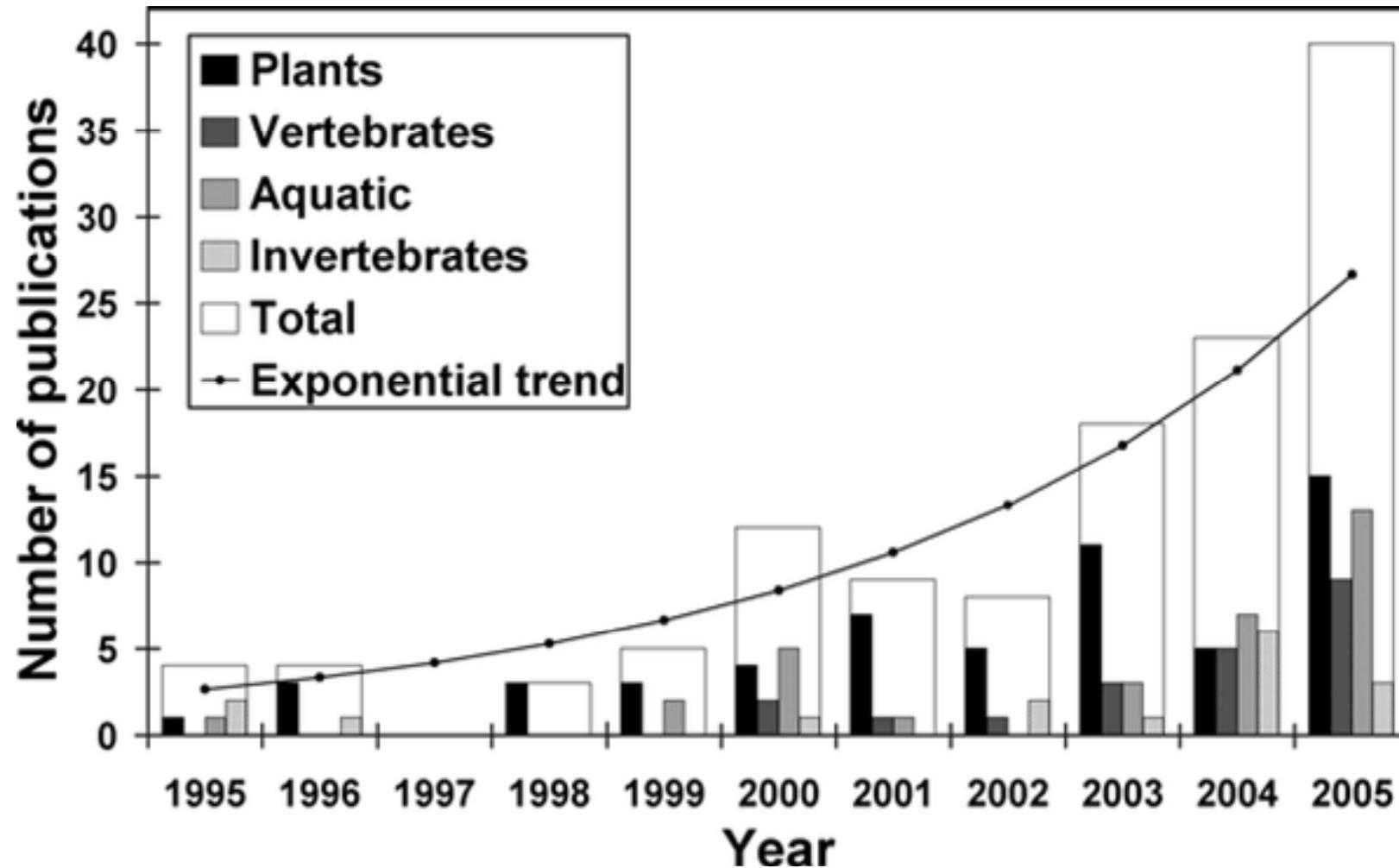




- Pèlerinage de la Mecque
- *Neisseria meningitidis*



Shirley S.M., Kark S. Amassing efforts against Alien invasive species in Europe, PLoS Biol, 2006;4:e279



Shirley S.M., Kark S. Amassing efforts against Alien invasive species in Europe, PLoS Biol, 2006;4:e279



Transmission: nouvelles technologies

- Aérosol, air conditionné: maladie du Légionnaire
- Seringues : inoculation, infections des drogués
- Bronchoscopie
- Transfusion (VMC, VIH, Hépatites B,C,E)
- Chirurgie: infections nosocomiales
- Transplantation
- Xénogreffes



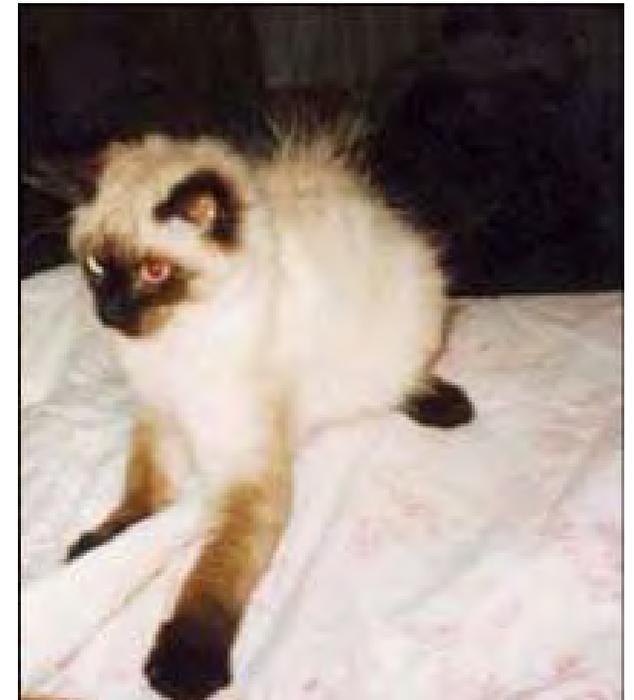
La nourriture

- **Contamination animale**, pas cuit : trichinose, cuit : Creutzfeldt Jacobs
- **Œufs et poulets** : *Salmonella*, *Campylobacter*
- **Hamburger** : *E. coli* 0157-B7
- **Porc** : *Listeria* (bactérie des réfrigérateurs)
- **Fruits et légumes** : *Salmonella*, hépatite A (fraises), *Cyclospora cayetanensis* (framboises)
- **Poissons crus** : anisikiases



Environnement : Animaux

- Bétail
- Chiens et chats
- Chiens de prairies et singes
- Poissons
- Oiseaux
- Muridés (rat, souris)
- Arthropodes vecteurs
 - Tiques
 - Poux
 - Moustiques



Maladie de Lyme

Bartonella quintana

Aedes, Dengue et Fièvre aune, West

Nile à New York



Les maladies infectieuses et l'hôpital

- Patients vulnérables
- Traumatismes
- Source :
 - patient
 - soin : eau (*Legionnella, Pseudomonas*)
 - main (Enterobacteries, Staphylocoques)
- Bactéries multirésistantes
 - main / alcool
 - habits
 - durée d'hospitalisation
 - contrôle d'antibiotiques

5 - 10.000 morts par an en France

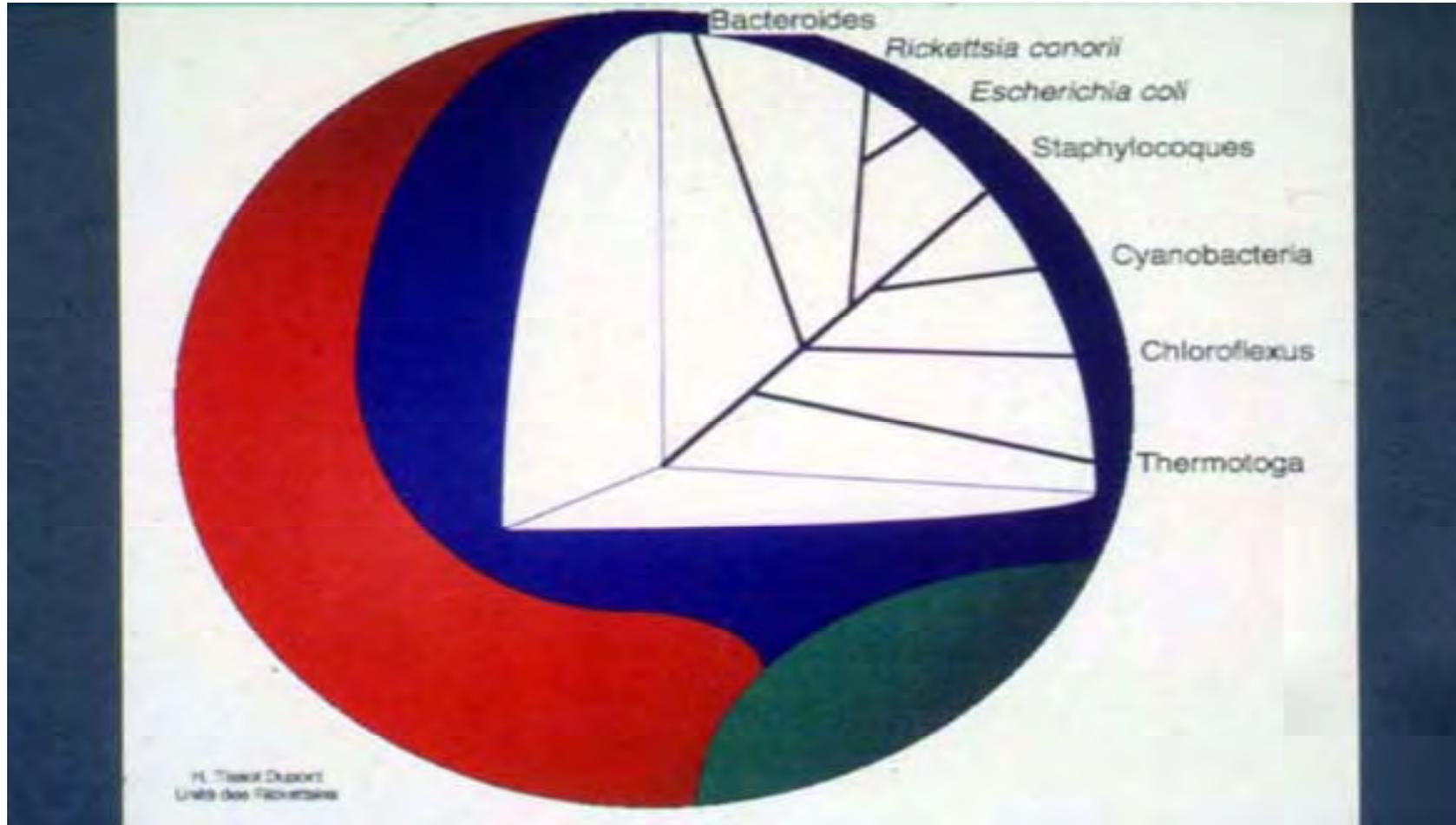


Pourquoi trouvons nous de nouvelles maladies infectieuses ?

- ① Nouveaux outils pour améliorer la découverte et palier au manque de connaissances
- ② Changement de notre environnement et la mondialisation (voyage – technologie – zoonoses)
- ③ Nouveaux organismes : virus à ARN, organismes résistants



Evolution des êtres vivants



Théorie de la reine rouge

«It takes all the running you can do, to keep in the same place»

L. Carroll.



Gross L. The Red Queen gets a new lease on life. PLoS,2006;4:e259



Gènes égoïstes

- Chaque gène s'auto-réplique
- Basé sur le concept de l'autocatalyse de l'ARN
- Cherche un seul support de réplication
- Les duplications d'ARN sont moins fiables (évolution rapide des taux de virus à ARN)
- Explique la coopération entre les organismes



Virus à ARN

- Virus respiratoires

- Grippe
- Rhinovirus
- Coronavirus (incluant le SARS)
- Parainfluenza

L. Kaiser – Genève
½ des infections
respiratoires chez les
enfants en bas âge

- Arbovirus

- Dengue
- West Nile
- Chikungunya

Parmi les 3 grandes causes
de fièvre chez les voyageurs
(avec la Malaria et les
Rickettsioses)

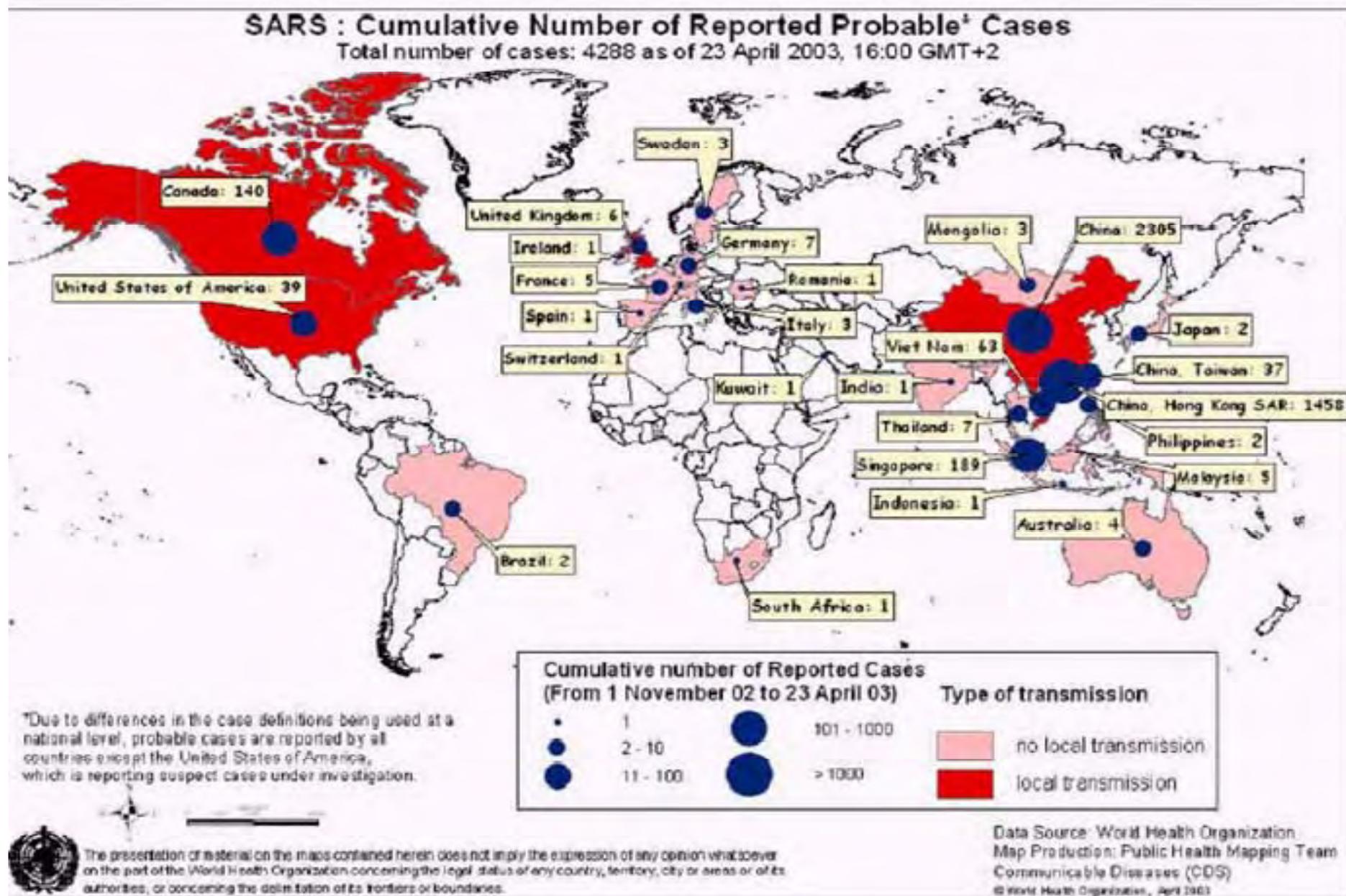


Virus à ARN

- Rétrovirus
 - HIV1-2
 - HTLV
- Autres
 - HCV (épidémies d'inoculation)
 - Virus de l'hépatite E (épidémies chez les porcs)



Extension de l'épidémie de SARS





Le virus du Chikungunya

PERSPECTIVE

CHIKUNGUNYA OUTBREAKS — THE GLOBALIZATION OF VECTORBORNE DISEASES

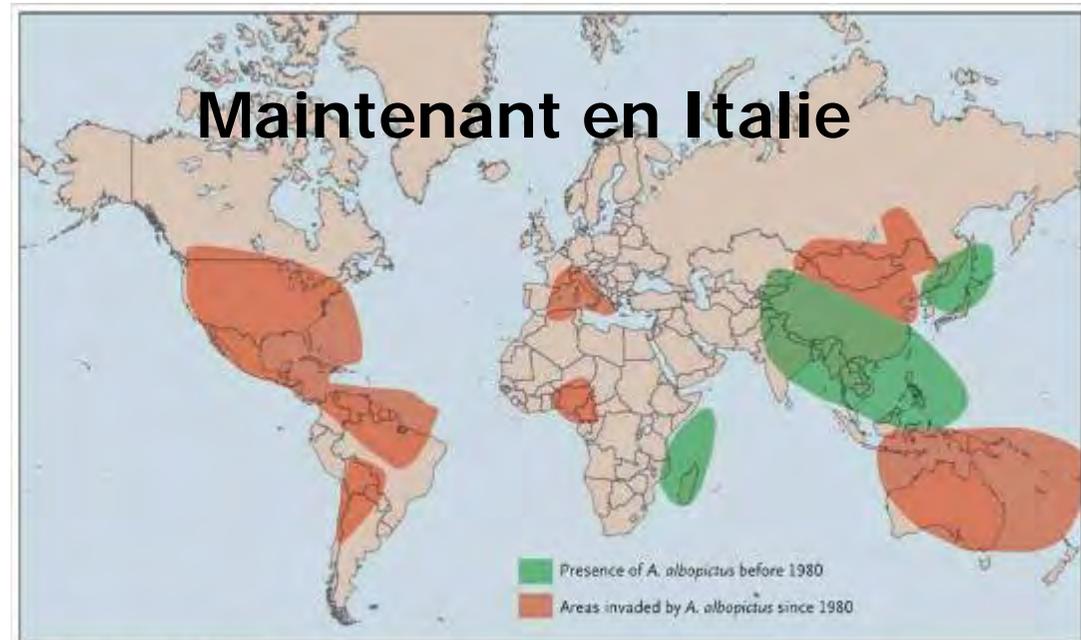
Chikungunya Outbreaks — The Globalization of Vectorborne Diseases

Rémi N. Charrel, M.D., Ph.D., Xavier de Lamballerie, M.D., Ph.D., and Didier Raoult, M.D., Ph.D.

N ENGL J MED 2007;356: 769-771



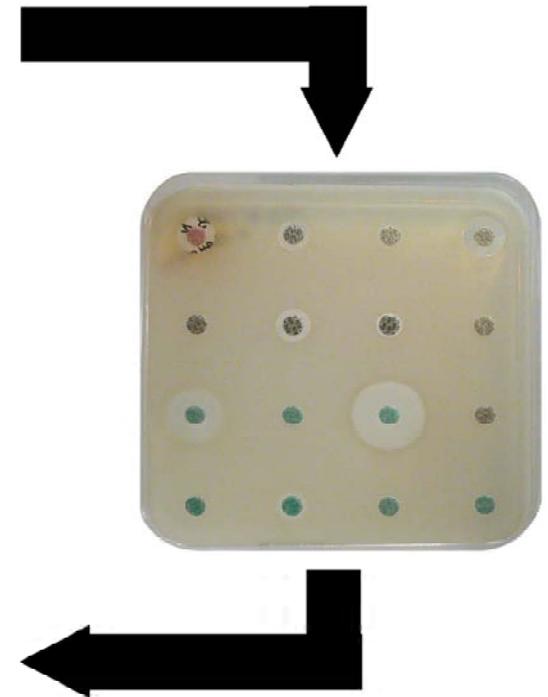
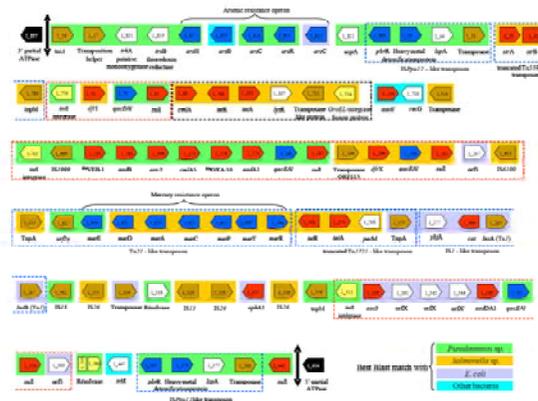
Aedes albopictus.



World Distribution of the *Aedes albopictus* Mosquito.

Nouveaux agents : les bactéries

- *S. aureus* résistant à la Methicilline et la Vancomycine
- Enterococcus résistant à la Vancomycine et l'Avoparcine
- *Actinobacter baumannii*
- La guerre en Irak



Adaptive Mutations in Bacteria: High Rate and Small Effects

Lília Perfeito,¹ Lisete Fernandes,^{1,2} Catarina Mota,¹ Isabel Gordo^{1*}

Evolution by natural selection is driven by the continuous generation of adaptive mutations. We measured the genomic mutation rate that generates beneficial mutations and their effects on fitness in *Escherichia coli* under conditions in which the effect of competition between lineages carrying different beneficial mutations is minimized. We found a rate on the order of 10^{-5} per genome per generation, which is 1000 times as high as previous estimates, and a mean selective advantage of 1%. Such a high rate of adaptive evolution has implications for the evolution of antibiotic resistance and pathogenicity.

Science, 2007;317:813-815.



C'est un tout petit monde



**Avec une espèce humaine
unique et aucune frontière
pour les microbes**

Potentiellement inconnu – Évoluant rapidement



Conclusion

- Hygiène de base (isolation, lavage des mains, masques, préservatifs)
- Vaccination
- Surveillance
- Utilisation raisonnée des agents anti-infectieux et biologiques

