

## **Cours #1 :**

Les émergences du « monde d'hier » revisitées : la peste et le choléra

## **Séminaire #1 :**

La lèpre prête pour une réémergence ?

Charlotte Avanzi (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne)

# Emergences du "monde d'hier" revisitées: peste et cholera



COLLÈGE  
DE FRANCE  
— 1530 —

Pr Philippe Sansonetti  
Leçon #1  
07 décembre 2016



## Emergences infectieuses: un aller vers le passé pour un retour vers le futur

Le demi-siècle écoulé a donné lieu à la survenue (probablement) sans précédent de maladies infectieuses nouvelles, émergentes ou réémergentes, largement facilitée par des facteurs anthropologiques (notion d'anthropocène) comportant (entre autre): globalisation des échanges, voyages de masse, changements écologiques, interface accrue avec le monde animal (élevage intensif, zoonoses, "one world-one health"), résistance aux antibiotiques

La diversité génétique microbienne est une source majeure de diversification phénotypique soutenant la dynamique de ces maladies (Lawrence, 2005, Curr Opin Genet Dev)

Ces modifications microbiennes peuvent être considérées comme un moteur influençant les interactions hôte-pathogènes au fil du temps, des épidémies et pandémies (Morse, 1995, Emerg Infect Dis; Pybus & Rambaut, 2009, Nat Rev Genet)

**L'identification de tels événements survenus à l'occasion de l'émergence/réémergence d'épidémies/pandémies anciennes peut nous informer utilement sur la dynamique possible d'évènements contemporains**

# Peste et Choléra revisités

Peut-on mieux appréhender, à l'aune des connaissances contemporaines, les mécanismes fondamentaux de l'émergence et de la réémergence de ces deux infections pandémiques qui ont marqué l'humanité de manière indélébile ?

Paramètres microbiologiques

Paramètres humains

Paramètres environnementaux

Réservoirs animaux, insectes vecteurs



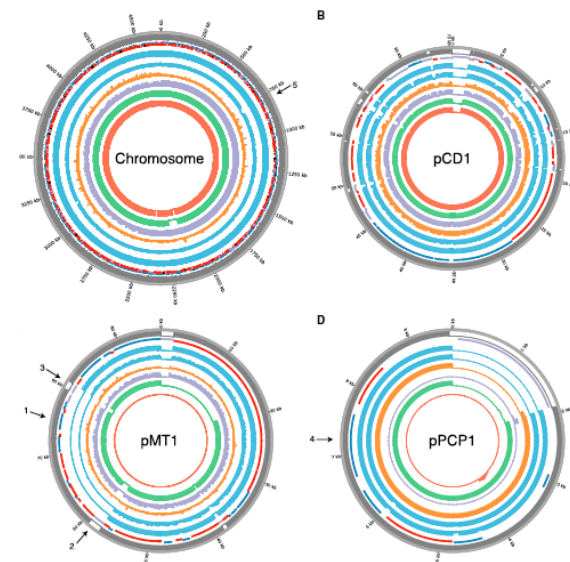
# La Peste: l'émergence se lit-elle dans les génomes ?



La peste d'Asdod  
Nicolas Poussin  
Musée du Louvre



Les pestiférés de Jaffa  
Antoine-Jean Gros  
Musée du Louvre

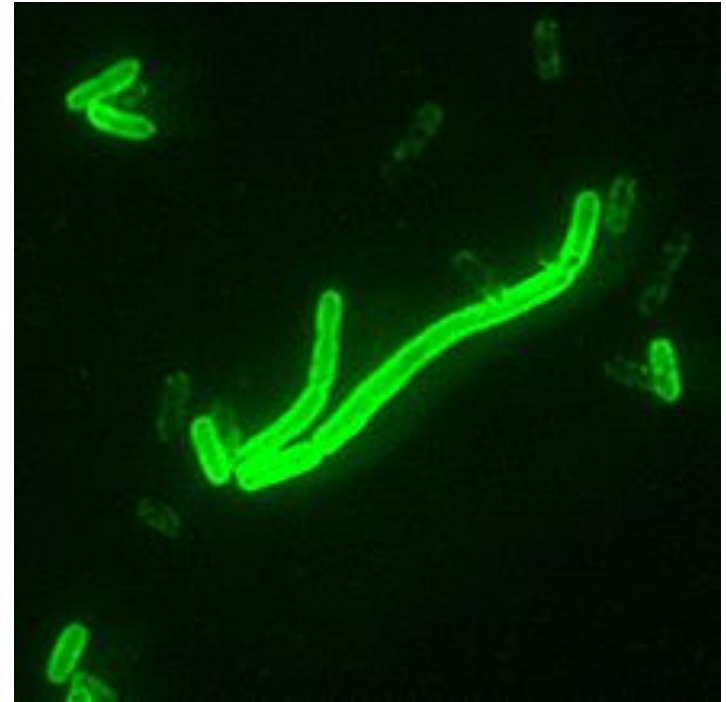




Saint Roch



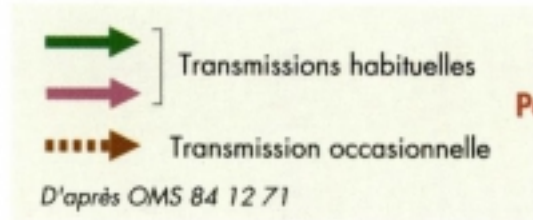
Alexandre Yersin  
1863-1943



*Yersinia pestis*



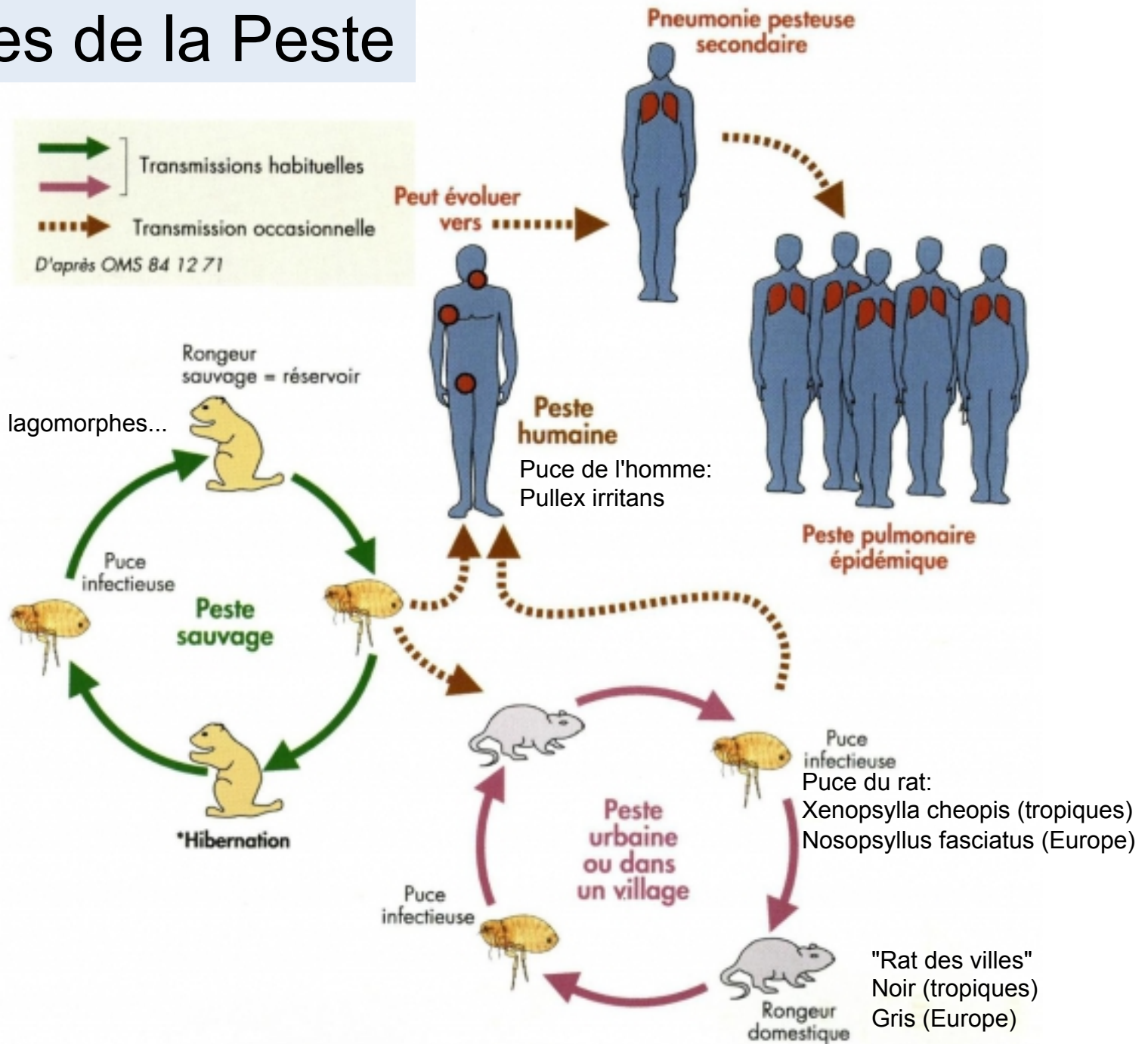
# Cycles de la Peste



200 espèces:  
marmotte, gerbille, lagomorphes...



Grande variété de puces  
adaptées aux espèces



"Rat des villes"  
Noir (tropiques)  
Gris (Europe)

# *Yersinia pseudotuberculosis*, ancêtre de *Yersinia pestis*

*Y. pestis* a divergé de *Y. pseudotuberculosis* entre 2600 à 28 000 ans

*Y. pseudotuberculosis*: entérobactérie, entéropathogène, tolérante au stress environnemental, moins pathogène que *Y. pestis* pour l'homme (Achtman et coll, 1999, 2004; Cui et coll, 2013, Wagner et coll, 2014)

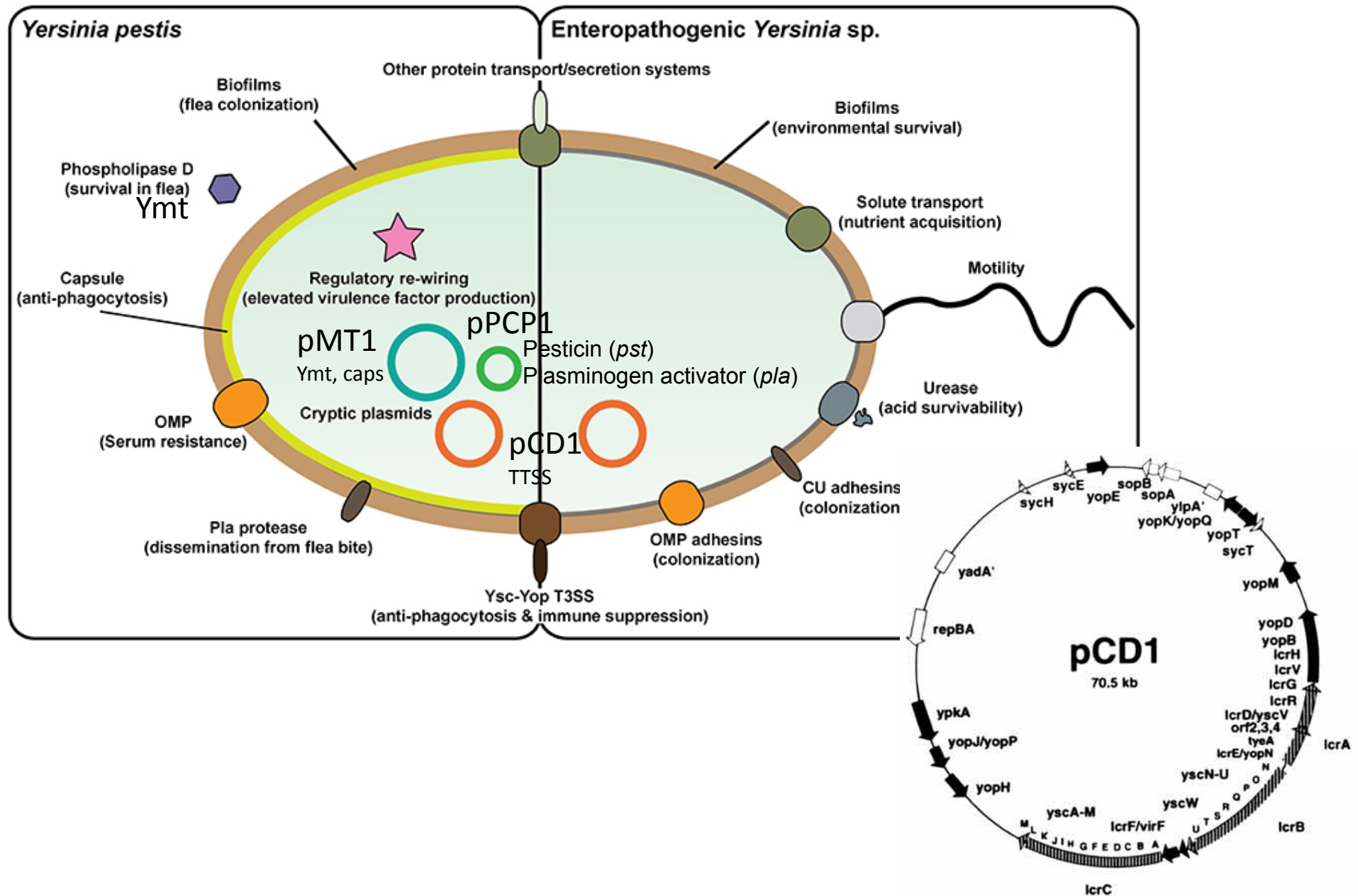
Les deux espèces demeurent génomiquement remarquablement proches...

Très peu d'additions, beaucoup de soustractions et de réarrangements génétiques

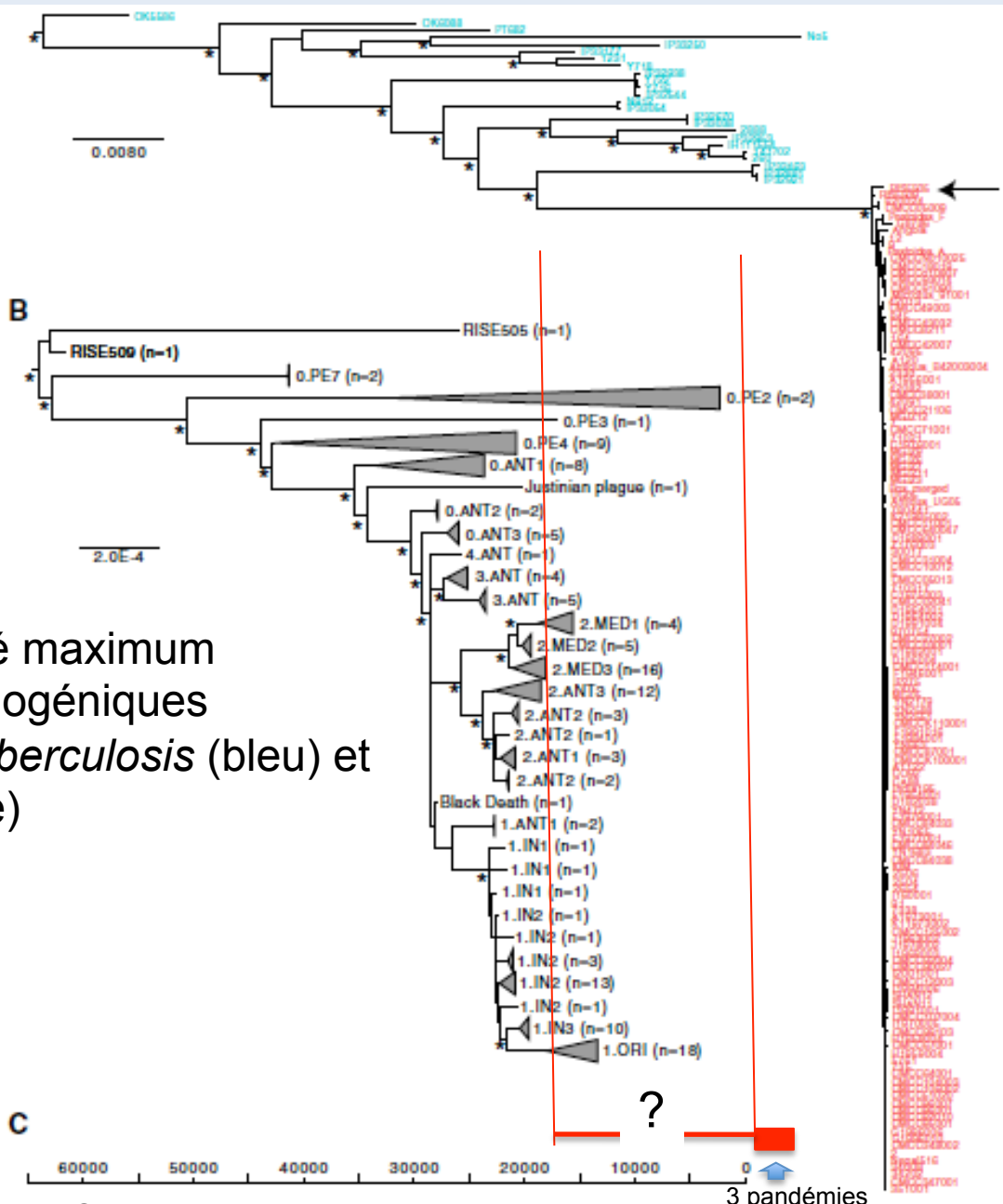
Phénomène d'adaptation à une espèce hôte (ou à un nombre limités)

s'accompagne souvent de réduction génomique (**mutations pathoadaptatives**) de toutes natures: mutations ponctuelles, délétions, surtout intégration de séquences d'insertion (IS)

# *Yersinia pestis* / *Yersinia pseudotuberculosis*



# Phylogénie de *Y. pestis* / *Y. pseudotuberculosis*



Reconstruction avec probabilité maximum des arbres phylogéniques de *Y. pseudotuberculosis* (bleu) et *Y. pestis* (rouge)



# Les trois pandémies de peste et d'autres...

Trois grandes pandémies de pestes sont clairement documentées, en particulier par l'analyse d'aDNA:

**"Peste de Justinien"** (541-544 AD) qui continua de manière intermittente jusqu'en 750 environ. Pestis inguinaria/glandularia. Marque l'arrêt de l'expansion de l'Empire Romain d'Orient. Byzance ne pourra reconquérir l'Italie.

**Seconde pandémie: "Peste Noire" d'Europe** (1347-1351), décès de 30-50% de la population Européenne  
Effondrement économique et social de cités, régions, crise morale et religieuse  
Suivie de vagues successives: "Grande Peste" de Londres (1665-1666)

**Troisième pandémie (intercontinentale):** émergence en Chine au milieu du 19<sup>ème</sup> siècle, explosion en 1894 (découverte de *Y. pestis* par Alexandre Yersin à Hong Kong), extension à l'ensemble de la planète jusqu'au milieu du 20<sup>ème</sup> siècle

Des épidémies antérieures sont sans doute survenues, comme la "Peste d'Athènes (430-427 avant JC) mais on ne dispose pas actuellement de confirmation par aDNA (début du déclin de la Grèce Classique ?

(Bos et coll., 2011, Cui et coll, 2013, Drancourt et coll, 1998, Drancourt et Raoult, 2002, Harbeck et coll, 2013, Parkhill et coll, 2001, Wagner et coll, 2014)

## 3<sup>ème</sup> pandémie de Peste: impact de l'explosion des transports maritimes à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle



# ADN fossile / ancien

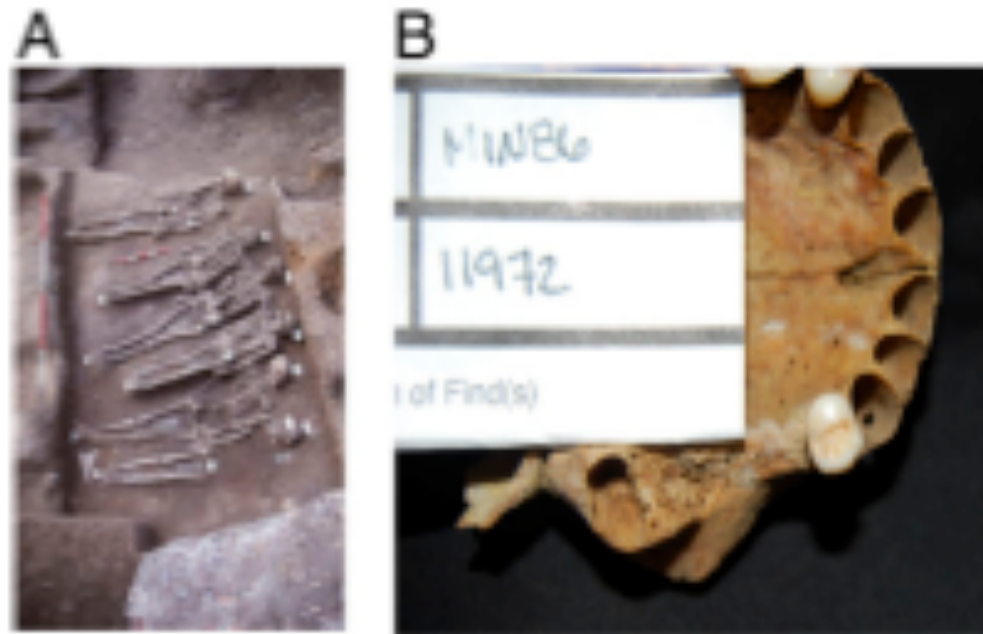
La recherche de l'étiologie des maladies infectieuses qui ont frappé l'humanité et fait vaciller ou s'effondrer certaines civilisations a toujours posé de sérieux problèmes: archives défailtantes, détails insuffisants pour différencier les grandes pathologies, insuffisance de l'analyse des squelettes dans la plupart des situations (excepté lésions osseuses caractéristiques (tuberculose osseuse, brucellose, syphilis...)).

L'ADN ancien (aDNA) a récemment pris une place prépondérante dans **l'archéomicrobiologie / paléomicrobiologie** (homme, animaux, plantes, microbes). Problème = dégradation +++

**Puces ADN et PCR** permettent d'identifier les grands phyla pathogènes, en particulier à partir de prélèvements de pulpe dentaire

Confirmation de l'étiologie d'épidémies historiques: choléra, peste, typhus, variole... (Devault et coll., 2014, Scientific Reports; Drancourt, 2012, Clin Microbiol Infect)

# Archéomicrobiologie , aDNA: échantillons, diagnostic, phylogénie



Sépultures Royaume Uni  
Peste Noire  
Schuenemann et coll, 2011, PNAS

## Mieux que le diagnostic moléculaire ?

Au delà du diagnostic moléculaire "relativement aisé" car ne nécessitant pas la connaissance de l'intégralité du génome, peut-on développer une véritable génomique phylogénétique permettant, sur la base du séquençage avancé de l'ADN prélevé, de reconstituer des contigs permettant de comparer des génomes d'époques/épidémies différentes et d'en tirer des conclusions sur la survenue de modifications génomiques ayant entraîné l'émergence, ou expliquant la sévérité particulière d'une épidémie/pandémie ?

## Yes we can... but

Méthodes moléculaires standards permettent identification et ébauche de phylogénie du microorganisme étiologique suspecté, sur la base de la PCR utilisant un set d'amorces de gènes spécifiques

Méthodes standards deviennent insuffisantes/obsolètes si l'on vise une analyse phylogénique fine et la recherche d'altérations génomiques pouvant expliquer une caractéristique particulière de la maladie (gravité, bénignité, contagiosité, différence entre deux épidémies/pandémies distantes dans le temps, etc...)

PCR pas adaptée:

Biais d'amplification d'ADN intact, essentiellement c-contaminant contemporain vs. aDNA très dégradé



# Yes we can... if

Succès repose sur assemblage de longs contigs exclusivement formés d'aDNA, fournissant une image de plus haute résolution de l'architecture génomique spécifique du microorganisme

aADN très dégradé:

(1) dégradation **enzymatique** = autolyse tissus, décomposition bactéries

(2) dégradation **chimique**: oxydation = altération des nucléotides empêchant l'appariement des bases et hydrolyse = cassure des brins

**Extrême fragmentation de aDNA** (Paäbo et coll, 2004, Annu Rev Genet)

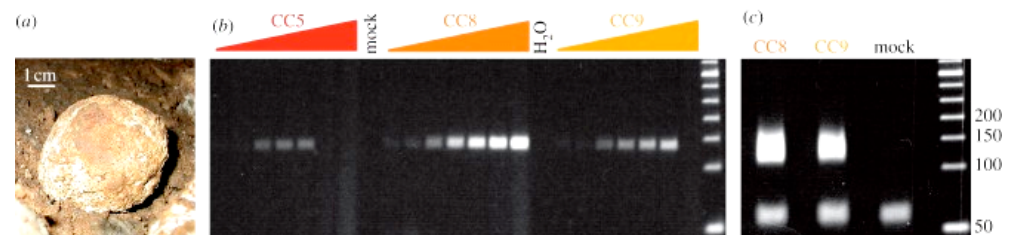
Stratégies d'enrichissement ciblé (array-based sequence capture) mises au point pour la séquence du génome de l'homme de Néanderthal (Burbano et coll, 2010, Science) combinées au séquençage à haut débit de nouvelle génération permettent l'assemblage de grands contigs dans un environnement métagénomique complexe et dégradé.

Validation sur l'existence de patterns de dégradation caractéristiques des nucléotides, plus séquençage d'aDNA mitochondrial humain devant présenter un pattern de dégradation similaire

Leonardi M et coll. 2016. Syst Biol

Bos KI et coll. 2016. eLife

Bon C et coll. 2012. Proceed Roy Soc



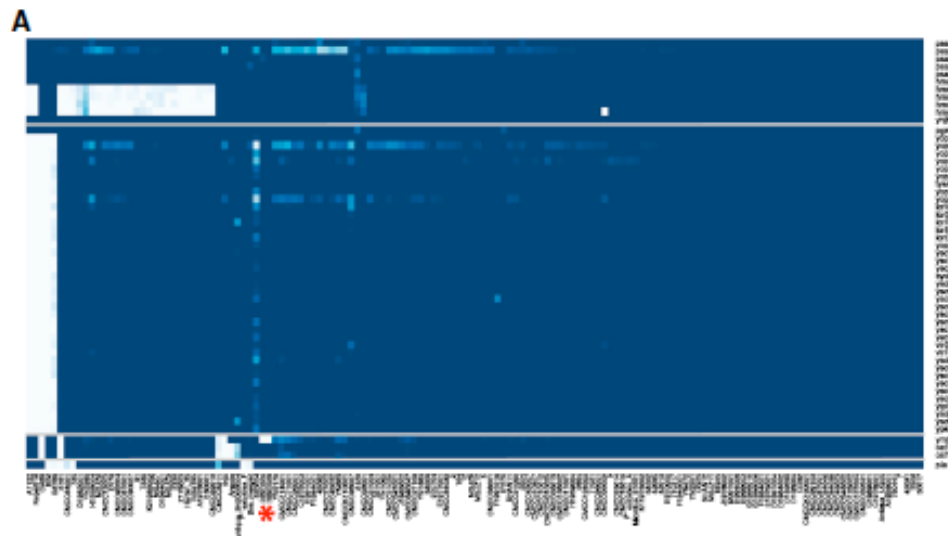
# Sur le chemin de la construction de *Y. pestis* "moderne"

Souches de *Y. pestis* de l'âge de bronze (3000 à 800 ans avant JC):

55 gènes associés à la virulence présents dans les souches des 3 pandémies, en particulier de la "Peste Noire" médiévale

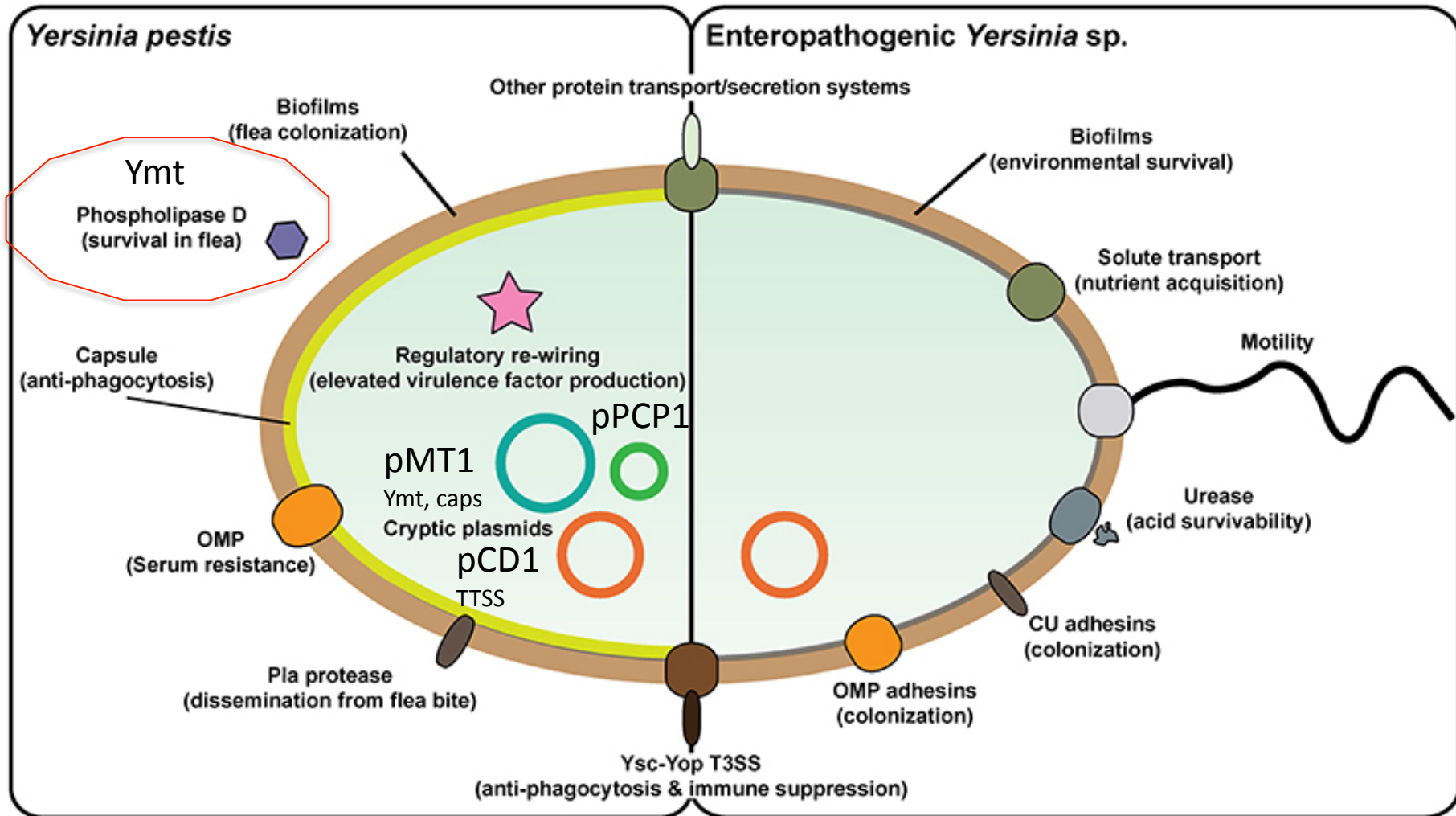
Un seul gène manquant: *ymt* codé par le plasmide pMT1

Considéré initialement comme une toxine murine (Ymt), phospholipase D produite par *Y. pestis* dans l'intestin de la puce et y facilitant sa croissance, donc sa transmission plus efficace (Hinnebusch et coll, 2005)



Rasmussen et coll, 2015, Cell

# Ymt



# Acquisition de *ymt*: étape clé vers l'émergence de la peste humaine

Plague in Bronze Age Eurasia  
3000 BC - 800 BC



Ancestral *Y. pestis*

*ymt* (~1000 BC)

Plague pandemics



## Une "protopeste" ?

*Y. pestis* était présente et sans doute prévalente à l'âge de bronze chez l'homme en Eurasie

Le gène *ymt* a été acquis antérieurement à 951 avant JC, permettant à la maladie d'être transmise par la puce

La peste de l'âge de bronze ne pouvait donner lieu à une forme bubonique jusqu'à l'acquisition du gène *ymt*

## *Y. pestis*, souche(s) de la 1<sup>ère</sup> pandémie



Souche de *Y. pestis* de la première pandémie: lignage original maintenant éteint (Wagner et coll, 2014, Lancet)

Totalement distincte des souches des pandémies suivantes dont elle n'est pas la souche ancestrale

Présence de l'ilôt de pathogénicité DFR4 ("difference regions")

30-50 % de mortalité urbaine plusieurs dizaines de millions de morts

(Procopé de Byzance)

Cause de l'extinction ?

Forte adaptation à l'homme, dissémination large sur plusieurs siècles =  
immunité globale ?

Sélection d'une mutation chez l'homme entraînant la résistance ?

Changement climatique, raréfaction du réservoir murin ?



## *Y pestis*, souche(s) médiévale(s)

Espoir de trouver dans le génome des signatures du caractère dramatique de la seconde pandémie de peste en Europe

Modification d'architecture dans les contigs rappelant pour certaines l'architecture de l'espèce ancestrale *Y. pseudotuberculosis*

Analyse phylogénétique détaillée indique l'existence de plusieurs isolats distincts et une possible parenté par rapport aux souches modernes

Pas de trait génomique indiquant une modification pouvant expliquer le caractère dévastateur de l'épidémie.

Hypothèses:

Transmission essentiellement aérienne ? Forme pulmonaire dominante ?

Modification du vecteur (pou ?)

Facteurs environnementaux, anthropologiques (pauvreté, guerres, malnutrition, surpopulation et insalubrité urbaine, facteurs climatiques...)

(Schuenemann et coll, 2011, PNAS; Bos et coll, 2011, Nature; Drancourt et coll, 2012, Clin Microbiol Infect)



## *Y. pestis* 18<sup>ème</sup> siècle

Epidémies successives en Europe suivant la Peste Noire Médiévale

Origine des souches responsables ?

Souche médiévale évoluant, passant d'homme à réservoir animal, rythmant les épidémies ?

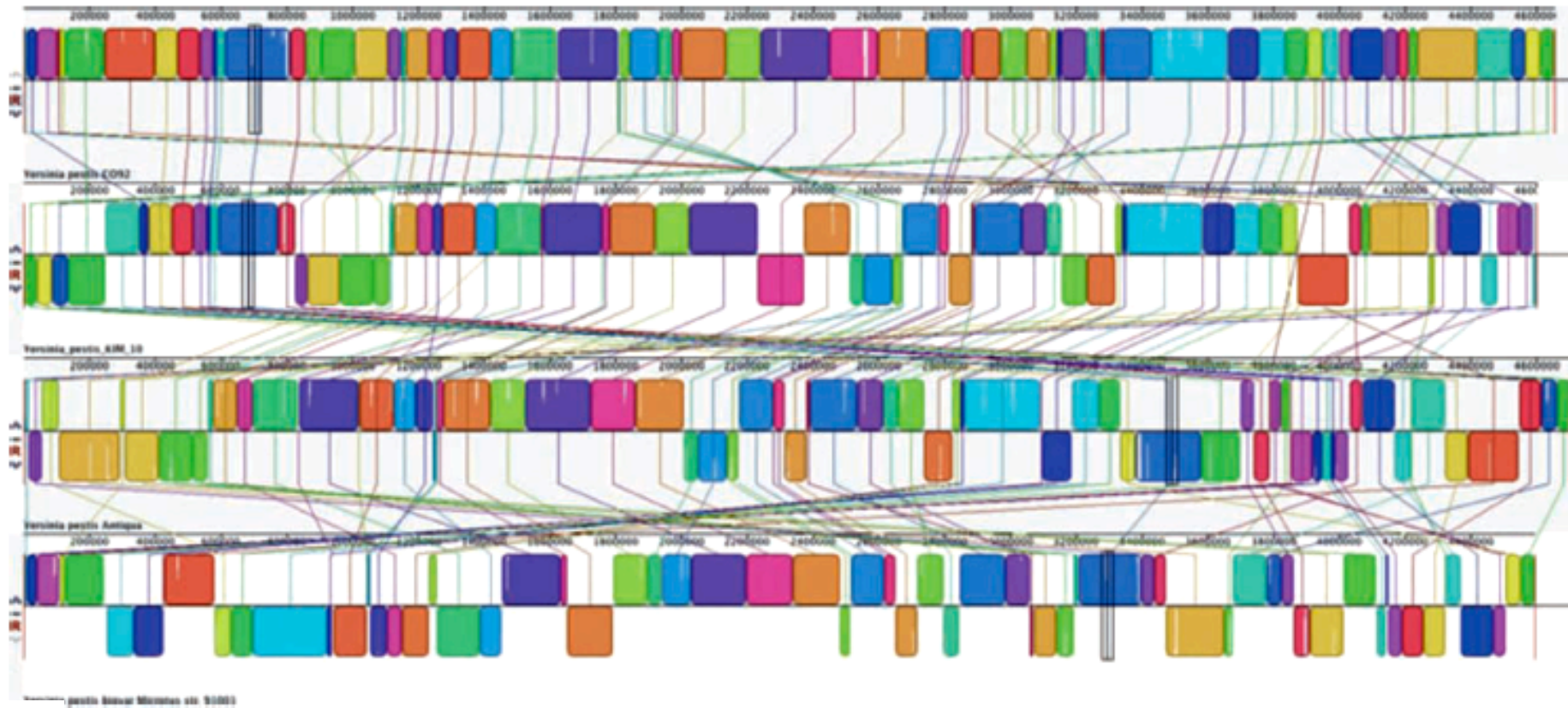
Pas de circulation "en boucle" européenne, mais réintroductions successive à partir du réservoir de rongeurs d'Asie (aller-retour Europe-Asie)

"Grande Peste de Marseille (1720-1722). Episode le plus tardif/mieux documenté de la "queue" de la seconde pandémie.

La reconstruction des génomes a confirmé l'ancestralité de la souche médiévale, probablement un variant unique, et donc le modèle de circulation en boucle pendant 3 siècles dans un réservoir animal inconnu

Phylum apparemment éteint comme les prédécesseurs (Bos et al, 2016, eLife)

# Un fait dominant: les réarrangements génomiques



Genome rearrangements drive the diversity of modern *Yersinia pestis* isolates. (a) *Y. pestis* CO92 (Orientalis). (b) *Y. pestis* KIM (Medievalis). (c) *Y. pestis* Antiqua. (d) *Y. pestis* 91001 (Microtus).



# Choléra: un siècle et demi de science pour résoudre six énigmes...



DEPARTEMENT DU FINISTERE.

## INSTRUCTION POPULAIRE

SUR LES PRINCIPAUX MOYENS A EMPLOYER POUR SE GARANTIR DU

### Cholera-Morbus,

Et sur la Conduite à tenir lorsque cette Maladie se déclare.

**LE CHOLÉRA** est une maladie grave; cependant il est plus effrayant quand on l'attend que dangereux quand il existe.

Pour s'en préserver, il faut se pas avoir peur; éloigner toutes les passions qui pourraient troubler la tranquillité de l'âme, et se prêter à la maladie que peut exécuter les précautions propres à s'en garantir.

Le Choléra n'est pas contagieux, c'est-à-dire, qu'il ne se communique point aux personnes qui sont en rapport avec les malades, il a allégué que ceux qui ont soigné pas leur soie, qui commencent des foyers de rigueur, des crues de différents genres.

Il faut observer la plus grande propreté sur soi et dans son logement; éviter tout refroidissement, et se traiter chaullement, surtout le ventre et les pieds.

Il faut éviter de poser les pieds nus sur la terre ou la pierre, en sortant du lit. Les ouvriers qui seraient obligés de travailler, dans un lieu froid ou humide, devront porter des sabots.

Il ne faut pas dormir les croisées étant ouvertes. On doit rester chez soi de bonne heure, afin d'éviter le froid et l'humidité des nuits.

On fera bien d'éviter, autant que possible, l'exercice de fatigue. Quelle que soit la saison ou la température, on se gardera bien de se vêtir trop légèrement.

La sobriété ne peut être trop recommandée. On doit s'abstenir tous les excès de nourriture et de boissons; car on a observé que les liqueurs, et les gros vins à la diététique, étaient les plus exposés à être atteints du Choléra.

Il faut se nourrir de soupes grasses, de viandes bouillies et rôties, de poissons frais, etc., quand on en a les moyens; user le moins possible de charcuterie et de viandes salées; renoncer aux pâtisseries chaudes; s'abstenir de crudités de toute espèce. L'usage des fruits, même bien mûrs, doit être modéré. Les fruits crus sont préférables. Les personnes qui ne sont pas dans l'habitude et qui ne peuvent pas se nourrir de viandes, s'éloignent de se procurer de bon pain, des pommes de terre, des soupes maigres, des raves, des bouillies de blé noir, du lait doux bouilli, des œufs, etc.

Toutes boissons froides, prise quand on a chaud, peut être dangereuse. L'eau dont on se sert pour boisson doit être claire. Au lieu de la faire purer, il est préférable d'y ajouter deux cuillerées de vinaigre par pinte. L'eau rouge, c'est-à-dire, à laquelle on ajoute un peu de bon vin naturel, est une très-bonne boisson. L'eau des fontaines artésiennes est très-purifiée. Il en est de même de l'eau de l'océan prise seule et à jeun.

On doit proscrire, de son régime, la bière et le cidre qui seraient de mauvais qu'ils, ou qui n'auraient pas suffisamment fermenté; le cidre doux est une très-mauvaise boisson.

Quand le Choléra règne, il faut, dès qu'on en ressent les premières atteintes, s'adresser à un médecin. L'expérience a appris que plus tôt on y porte remède, plus les chances de salut sont grandes. Il faut donc que chacun connaisse les premières signes qui indiquent qu'un individu va être ou est actuellement atteint du Choléra.

**VIERS LES SIGNES:**

L'assitude subite, sentiment de pesanteur dans la tête, insomnie, nausée souvent pénible, douleur de la face, œdème concomitant, diminution de l'appétit, sentiment d'oppression, d'excès dans la poitrine et de brûlure dans le creux de l'estomac, gargouillement dans les intestins, accompagnés de coliques auxquelles succède le dévoiement, peau sèche et froide, quelquefois couverte d'une sueur froide. Quelques malades éprouvent des frissons le long de l'épine du dos, et une sensation dans les chevrons, comme si on y soufflait de l'air froid. Ces signes ne se manifestent pas toujours dans cet ordre. Ils ne se montrent pas non plus chez tous les malades.

En attendant les soins du médecin, qu'il faut se hâter d'appeler, il faut se mettre au lit, et prendre une infusion bien chaude de menthe ou de sauge et de tilleul, et se réchauffer, par tous les moyens possibles, comme friction avec une brosse douce, un bain de siège, applications sur le ventre de tissus bien chauffés; sans bouillies dans des bouteilles bien bouchées enveloppées d'un tissu, et promenées autour du malade, carreau des talons, etc.

Se et approuvé par l'Administration de Quimper, le 15 Mars 1865.

Pour l'Administration:  
Le Président Sanitaire,  
F. DUMARHALLACH.  
En par le Préfet de Finistère,  
PELENG.

QUIMPER, IMPRIMERIE DE S. BLOY, 36.

Enigmes concernant le choléra à l'époque des grandes  
pandémies du 19<sup>ème</sup> siècle...  
Puis au fur et à mesure de la progression des connaissances

Mode de contamination interhumaine ?

Agent infectieux ?

Croissance rapide et présence quasi exclusive de *V. cholerae* dans les selles des patients ?

Physiopathologie du Choléra ?

Variations bio et sérotypiques ?

Causes des émergences ?

# Une brève histoire du Choléra

Tout au long de l'histoire le choléra a frappé sur l'ensemble de la planète  
Hippocrate (460-377 avant JC) et Galien (129-216 après JC) ont décrit une maladie ressemblant de près au choléra

La maladie était connue dès l'antiquité dans le delta du Gange, "l'épicentre" historique du choléra: description d'une maladie ressemblant au choléra à Sushruta Samshita, Inde, écrit en Sanskrit 400-500 ans avant JC

Maladie bien installée dans le sous-continent Indien, avant les premières descriptions par les troupes britanniques dès le début des années 1800, rapportant des épidémies touchant rapidement des centaines de milliers d'individus, causant une mortalité très élevée. "Première pandémie" (1817), née dans le delta du Gange

Une des maladies les plus craintes de l'histoire, mais acmé au 19<sup>ème</sup> siècle  
Deviens pandémie suite à l'explosion des échanges commerciaux: grandes routes terrestres, routes maritimes

Rôle de l'eau de cale des navires (ballast) dans la contamination intercontinentale  
Golfe du Bengale-Europe (Anglais)

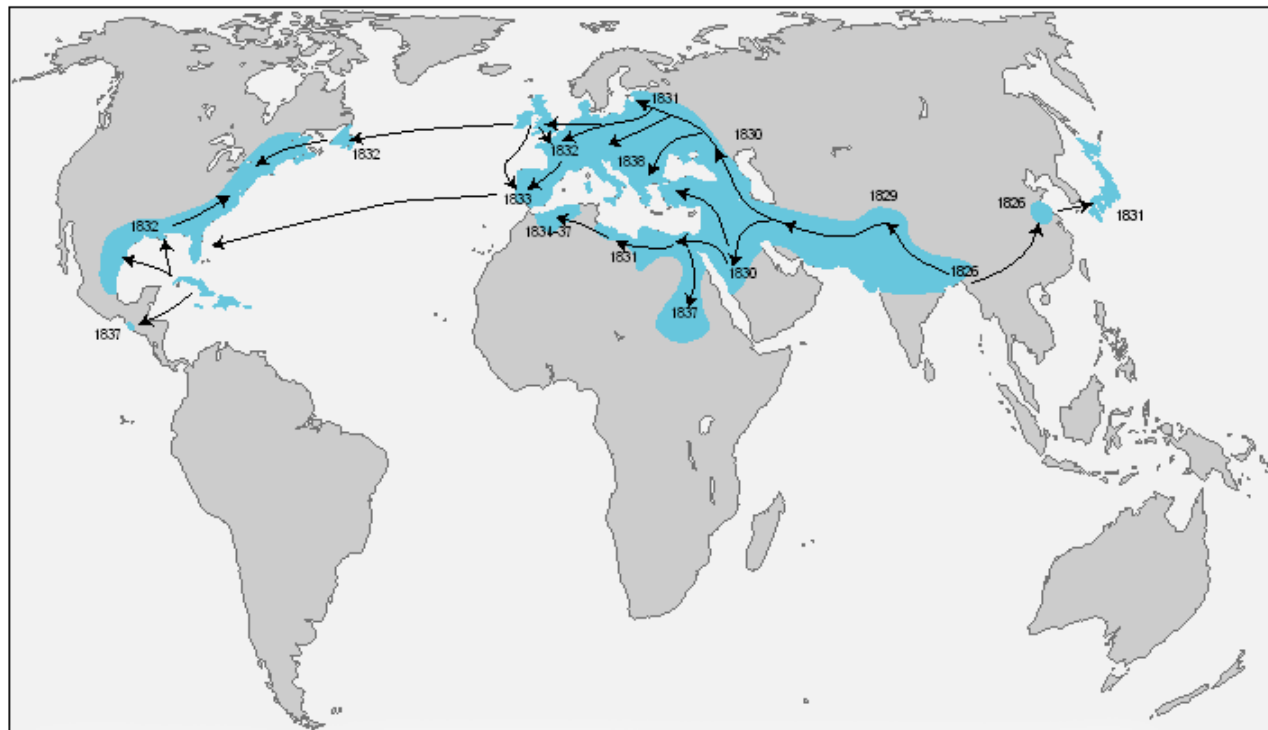
Europe-Amérique du nord (Français) 1832: épidémie de Montreal (vaisseaux venus de France), touchant sévèrement New York (Rosenberg CE. The Cholera years, University of Chicago Press, 1987)



## Les sept pandémies de Choléra

Epidémie	Période
Première	1817-1824
Deuxième	1829-1837 (dite de choléra-morbus)
Troisième	1840-1860 (deux vagues)
Quatrième	1863-1875
Cinquième	1881-1896
Sixième	1899-1923
Septième	1961- toujours en cours (Haïti 2010)

Années et grands axes de circulation de la seconde pandémie de choléra (choléra-morbus) dans le monde (1826-1837)



D'après Bourdelais P., Ralot Y., 1987. Réalisation : E. Daudé, E. Eliot, E. Bonnet, in <http://geoconfluences.ens-lyon.fr>, oct. 2012

# Choléra morbus

Bien que l'étiologie de la maladie ne fut pas encore connue au début du 19<sup>ème</sup> siècle, certaines hypothèses sur sa transmission avaient été émises par des médecins anglais de l'armée des Indes vers 1820 et Moreau de Jonnés en France (Moyen-Orient, "choléra morbus pestilentiel")

L'épidémie de 1832 en Europe, particulièrement en France, suscita des inquiétudes, des terreurs, des réactions irrationnelles: réactions de défi à Paris "Peur bleue" du Choléra Morbus

Elle amorça aussi des changements profonds dans l'organisation et la gestion des systèmes de soins, dans la représentation et la gestion des maladies:

Bases de l'hygiénisme, statistique médicale

Choléra cause ou conséquences de mutations sociales, ou les deux ?

En France: juste après l'arrivée de Louis-Philippe, suite aux Trois-Glorieuses  
Agitation sociale. Casimir Périer et le Choléra...

# Concepts de l'époque: débats entre AERISTES et CONTAGIONNISTES

AERISTES:

**Exemple: Londres au milieu du 19<sup>ème</sup> siècle**

- Pas de tout à l'égout généralisé, surtout dans les quartiers pauvres, donc pas d'évacuation des matières fécales dans des égouts collecteurs, utilisation de fosses septiques individuelles, ou élimination dans les caves des maisons

La combinaison de ce moyen d'évacuation, de l'absence de collecte systématique des ordures qui pourrissaient sur place et de la présence de marécages non asséchés à la périphérie de la ville, causaient des odeurs pestilentielles, particulièrement en été dans les quartiers défavorisés où la plus grande mortalité était interprétée comme une conséquence de la dépravation des moeurs des pauvres qui fragilisait leur résistance aux "miasmes" responsables de cette atmosphère pestilentielle et des maladies. La théorie tenait d'un certain bon sens....

- Eau: combinaison d'un système de distribution urbain d'eau puisée dans la Tamise et de très nombreux puits (peu profonds) très prisés par la population car l'eau de certains de ces puits avait bien meilleur goût que l'eau municipale

# Concepts de l'époque: débats entre AERISTES et CONTAGIONNISTES

## CONTAGIONNISTES

John Snow, médecin épidémiologiste, pensait que le choléra se "reproduisait" dans les patients infectés et se transmettait par l'intermédiaire de l'eau contaminée

Epidémie commence à Soho, proche de son domicile, en septembre 1854 et se poursuit plusieurs mois (troisième pandémie)

Snow reporte sur une carte du quartier la position des 13 puits ainsi que les domiciles des cas rapportés (572).

Mise en évidence du regroupement des cas près d'une pompe/puit, angle sud-ouest de l'intersection Broad Street (maintenant Broadwick St) et Cambridge St

L'eau avait le meilleur goût de tous les puits du quartier

**Obtient avec difficulté des autorités l'autorisation d'enlever la poignée/bras de la pompe**

**Arrêt rapide de l'épidémie**

Mieux, Snow regarda l'eau des différents puits au microscope et vit dans celle du puits de Broad St des "**animalicules**" identiques et en grand nombre...

2 anomalies:

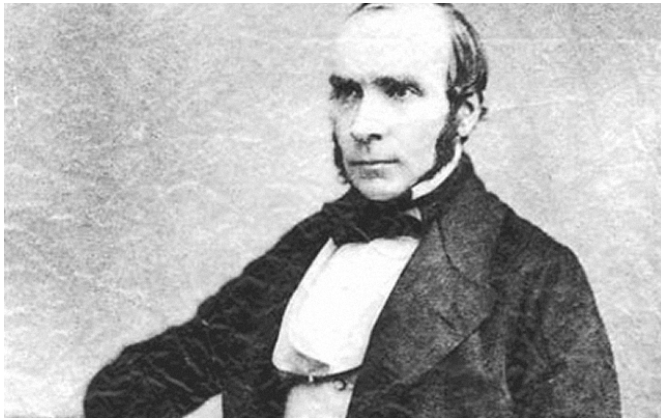
Un refuge de déshérités du quartier fut à peine touché. Il avait son propre puits

Les travailleurs d'une brasserie du quartier qui bénéficiaient d'un usage gratuit de la bière ne furent jamais malades. La bière protégeait du choléra...

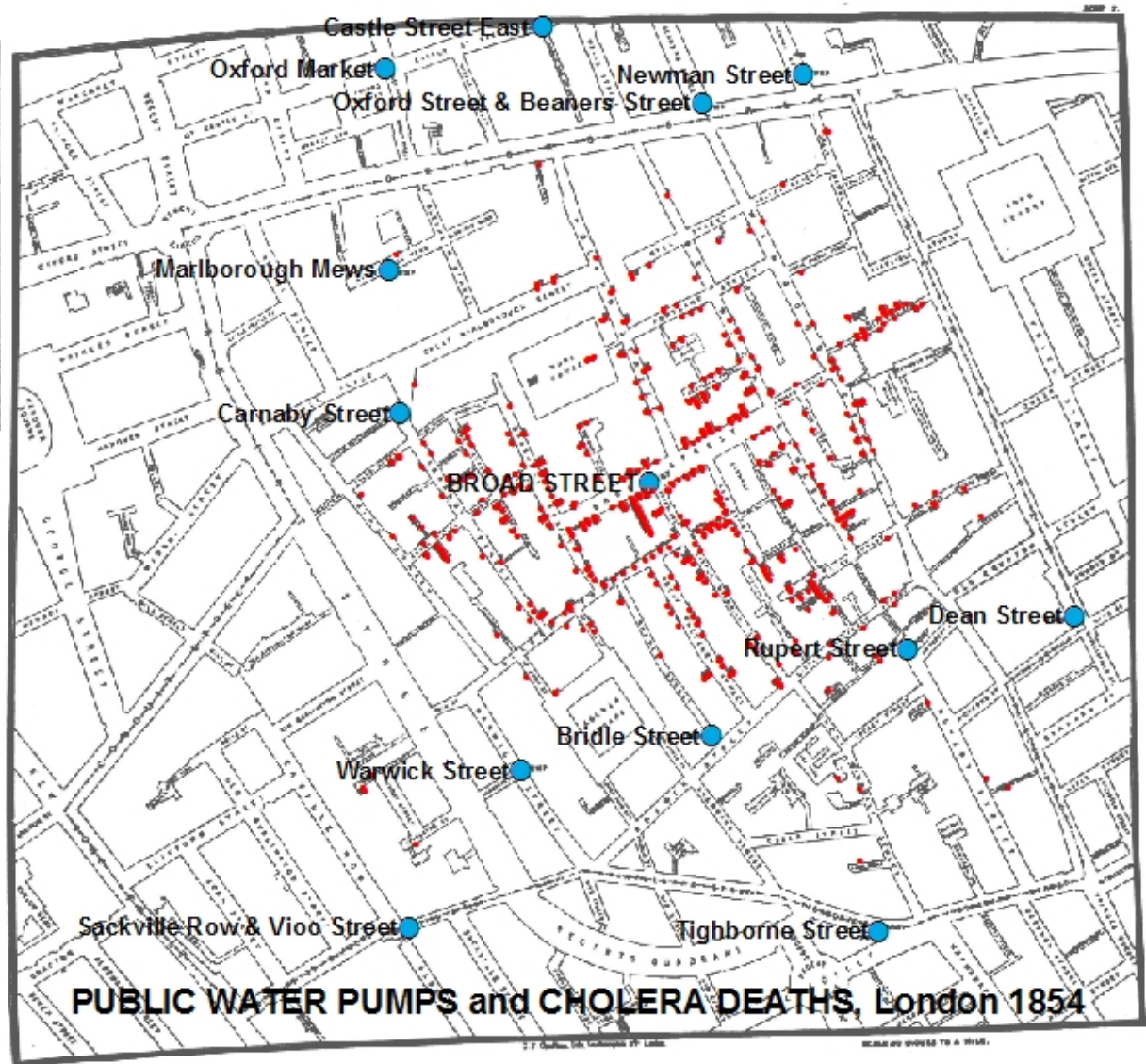
# Enigme de la transmission du Choléra résolue





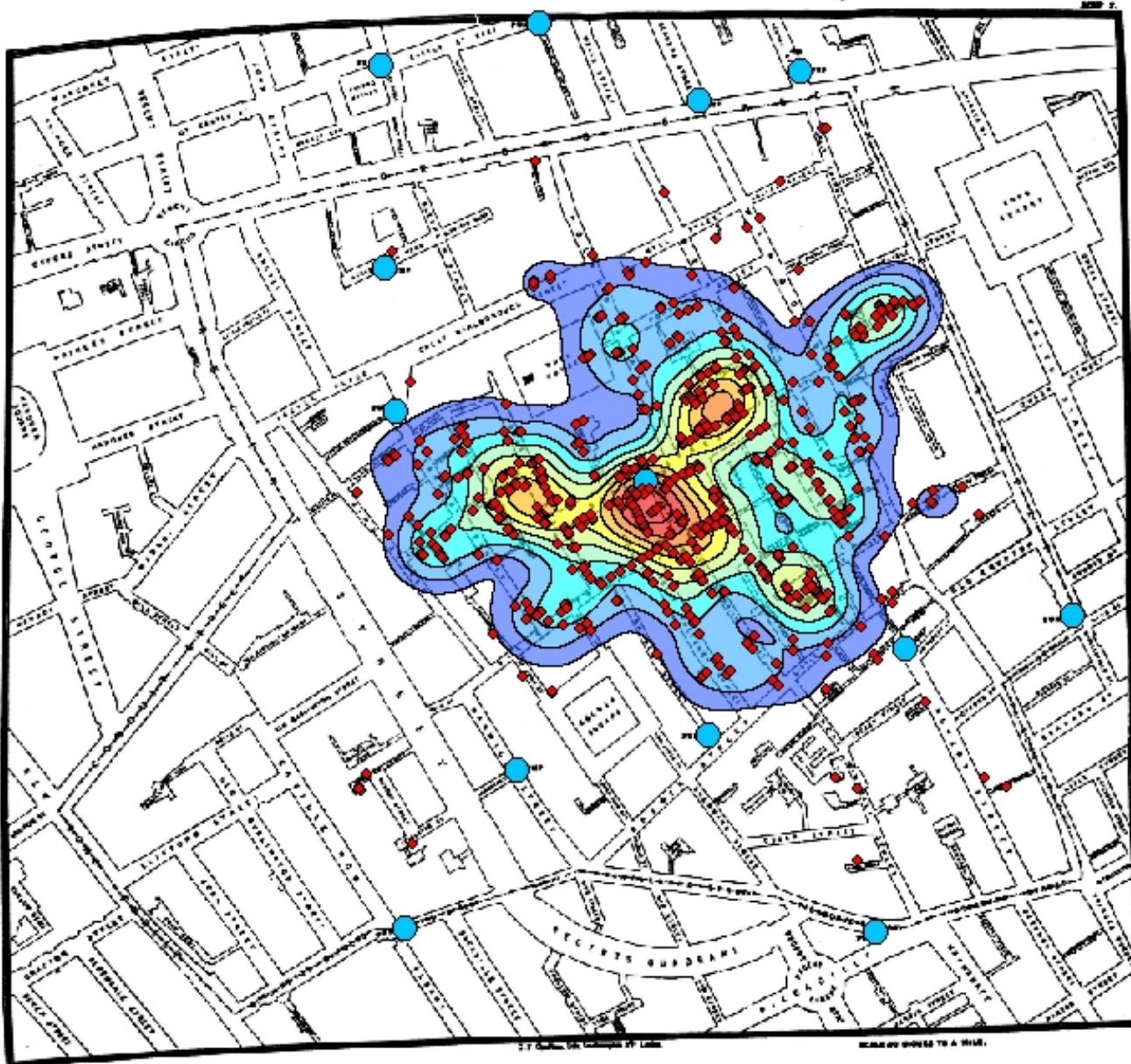


John Snow, 1813-1858



Steven Johnson, 2006, *The ghost map: the story of London most terrifying epidemic, and how it changed science, cities and the modern world*

# Proto-GIS



**Geographic Information Systems (GIS)** = méthodes d'analyse spatiale en épidémiologie

Polygones de Thyssen





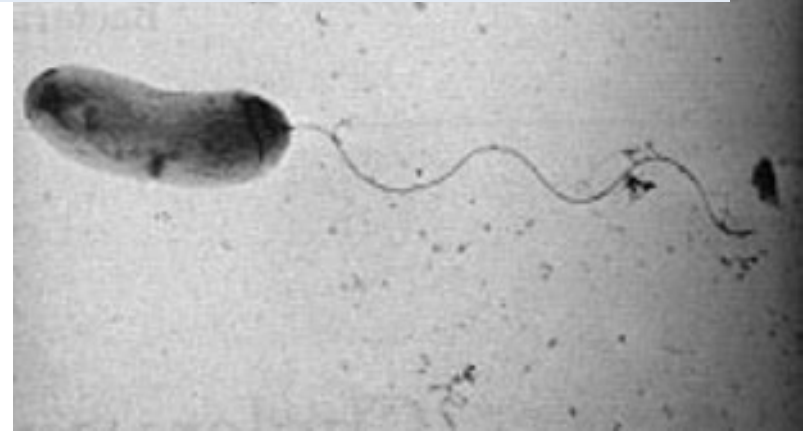
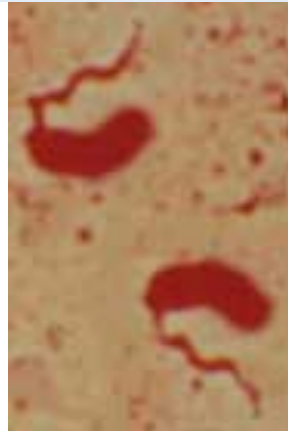
John Snow:  
Pionnier épidémiologie géographique  
Pionnier épidémiologie interventionnelle

NAISSANCE DE L'HYGIENE



Robert Koch  
1843-1910

## De l'animanicule à *Vibrio cholerae* Alexandrie, 1884, 4<sup>ème</sup> pandémie Enigme de l'étiologie résolue



***Vibrio cholerae***: bacille Gram -, incurvé, extrêmement mobile, flagelle unipolaire  
Aéro-anaérobies, prototrophes, en culture aérée, temps de division < 30 mn !

**Deux biotypes**: "Classique" (6 premières pandémies) et "El Tor" (7<sup>ème</sup> pandémie, émergence dans les Iles Célèbes en 1961)

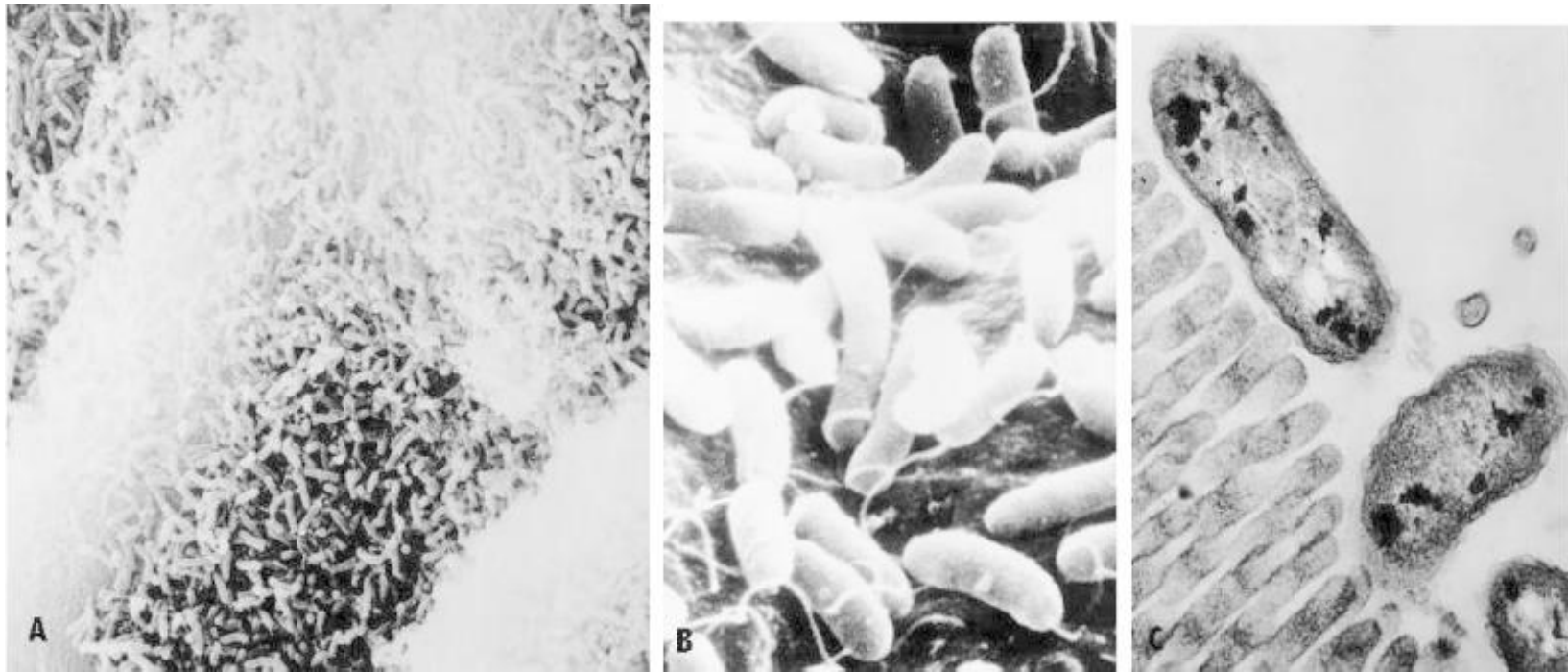
Un sérotype: O1 (A), deux sérotypes: Ogawa (B) et Inaba (C), portés par le LPS  
Au cours de la 7<sup>ème</sup> pandémie, EL Tor s'est quasiment substitué au sérotype Classique. En 1991, il touche la zone côtière du Pérou

1992: apparition d'un nouveau sérotype: O139 (+ capsule), sur un fond de biotype El Tor dans le Golfe du Bengale,

Extension et durée limitée de l'épidémie

Apparition d'un variant asiatique d'El Tor (épidémie en Haïti depuis 2010)

# Enigme de la pathogénicité du choléra résolue: colonisation de l'intestin grêle et toxine cholérique



Adhérence à la bordure en brosse de l'apex de l'épithélium de l'intestin grêle

# Mystère de la pathogénicité du choléra révélé: colonisation de l'intestin grêle et toxine cholérique

Finkelstein RA, LoSpalluto. 1969

J Exp Med

**Purification of CT**

Lonnroth I, Holmgren J. 1973

J Gen Microbiol

**Structure CT (A1B5)**

King CA, Van Heyningen. 1973

J Infect Dis

**Liaison de sous-unité B au ganglioside GM1**

Gill DM, King CA. 1975

J Biol Chem

**Mode d'action: ADP-ribosylation**

Majoul IV, Bastiens PI, Söling HD. 1996.

J Cell Biol

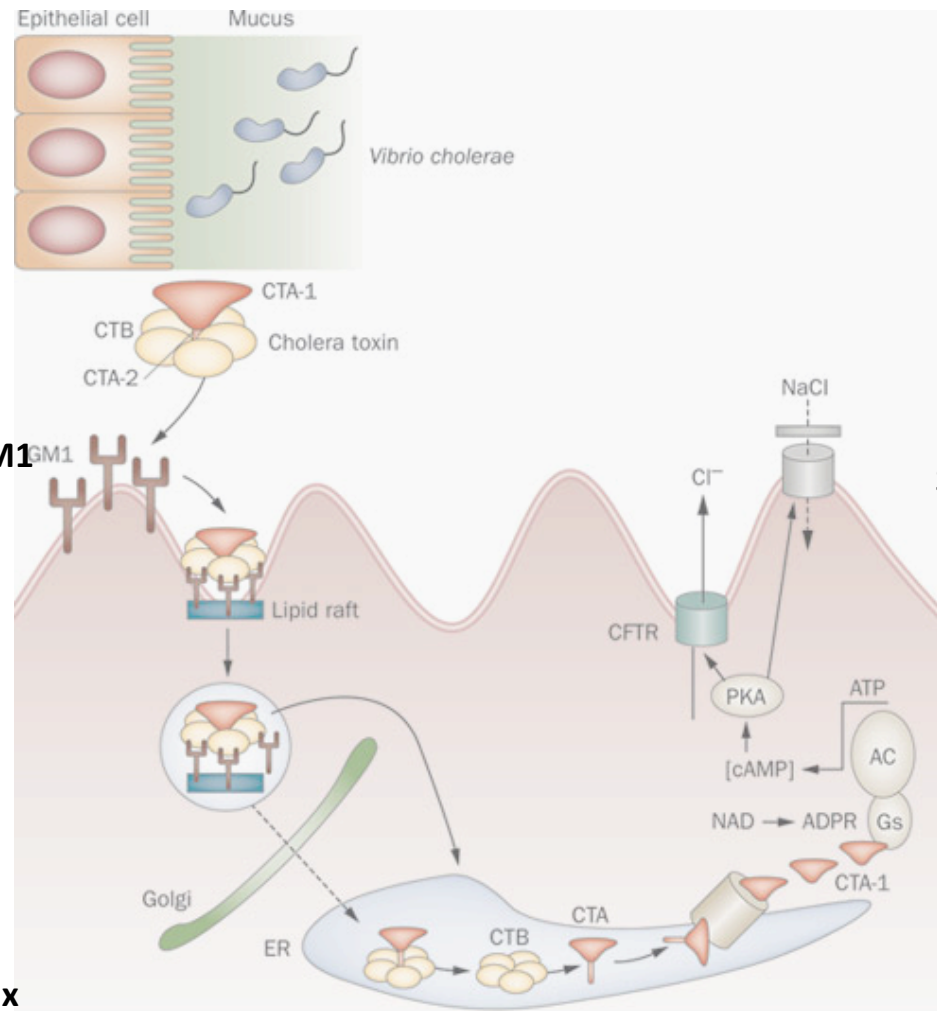
**Transport rétrograde de CT/accès au cytosol**

Waldor MK, Mekalanos JJ. 1996. Science

**CT est codée par un prophage filamenteux**

De SN, Chatterje DN. 1953. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. J Pathol Bacteriol. 66:559-62

De SN. 1959. Enterotoxicity of bacteria-free culture filtrate of *Vibrio cholerae*. Nature. 183:1533-4

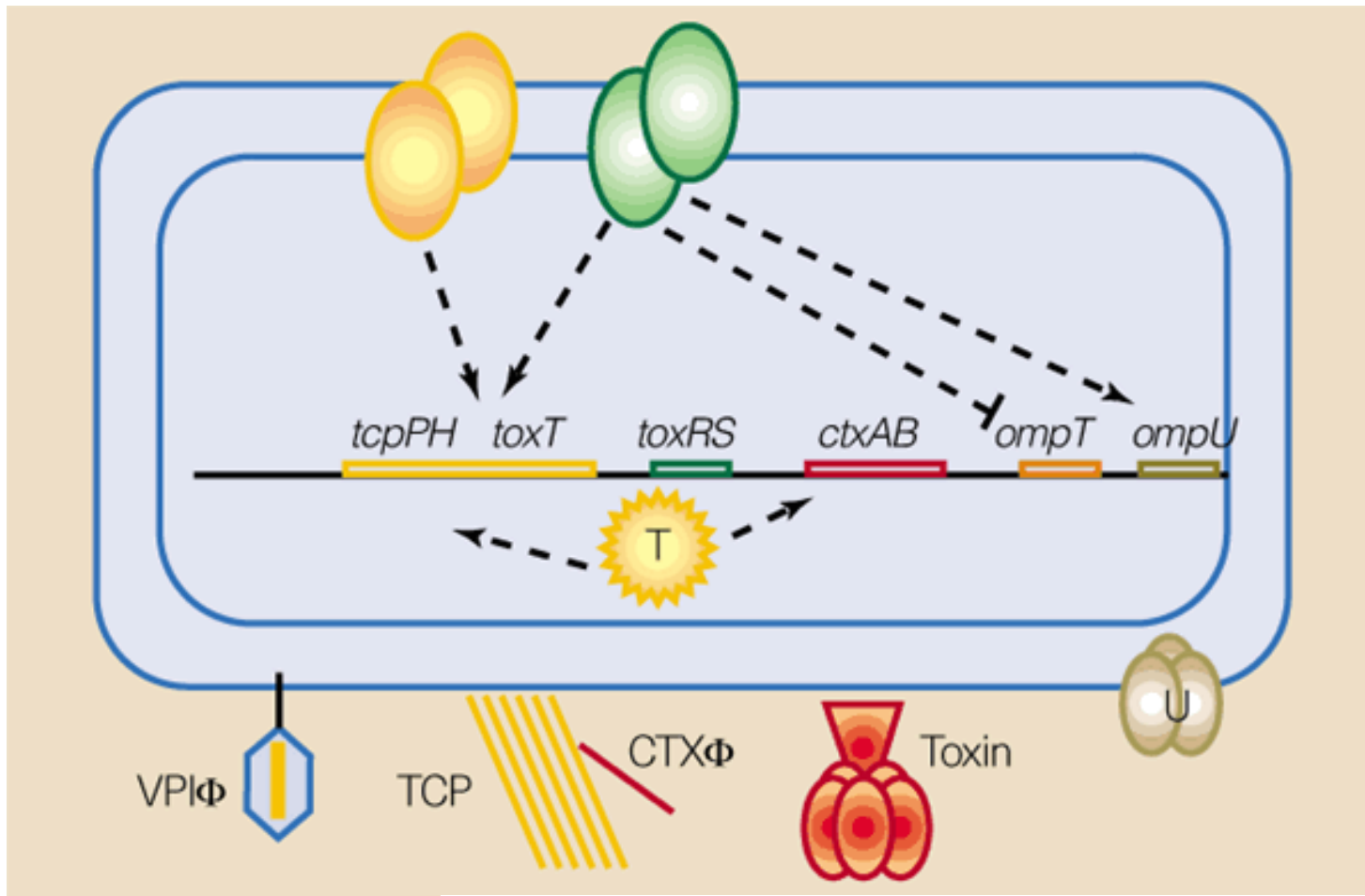


Sambhu Nath De  
1915-1985

**Identification of CT  
1953**



# Mystère de l'acquisition des gènes de pathogénicité: Toxine cholérique: une histoire de bactériophages

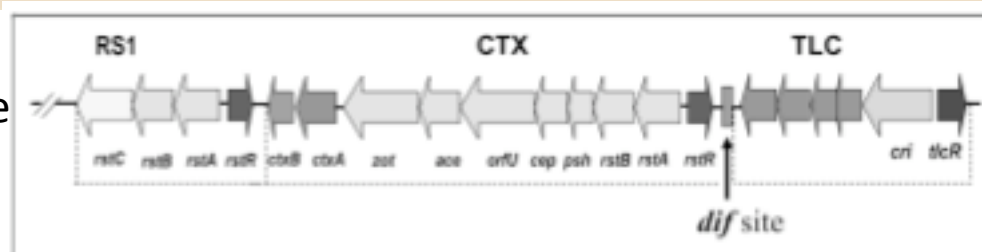


CTXΦ:

Waldor & Mekalanos. 1996. Science

VPIΦ

Karaolis et coll. 1999. Nature



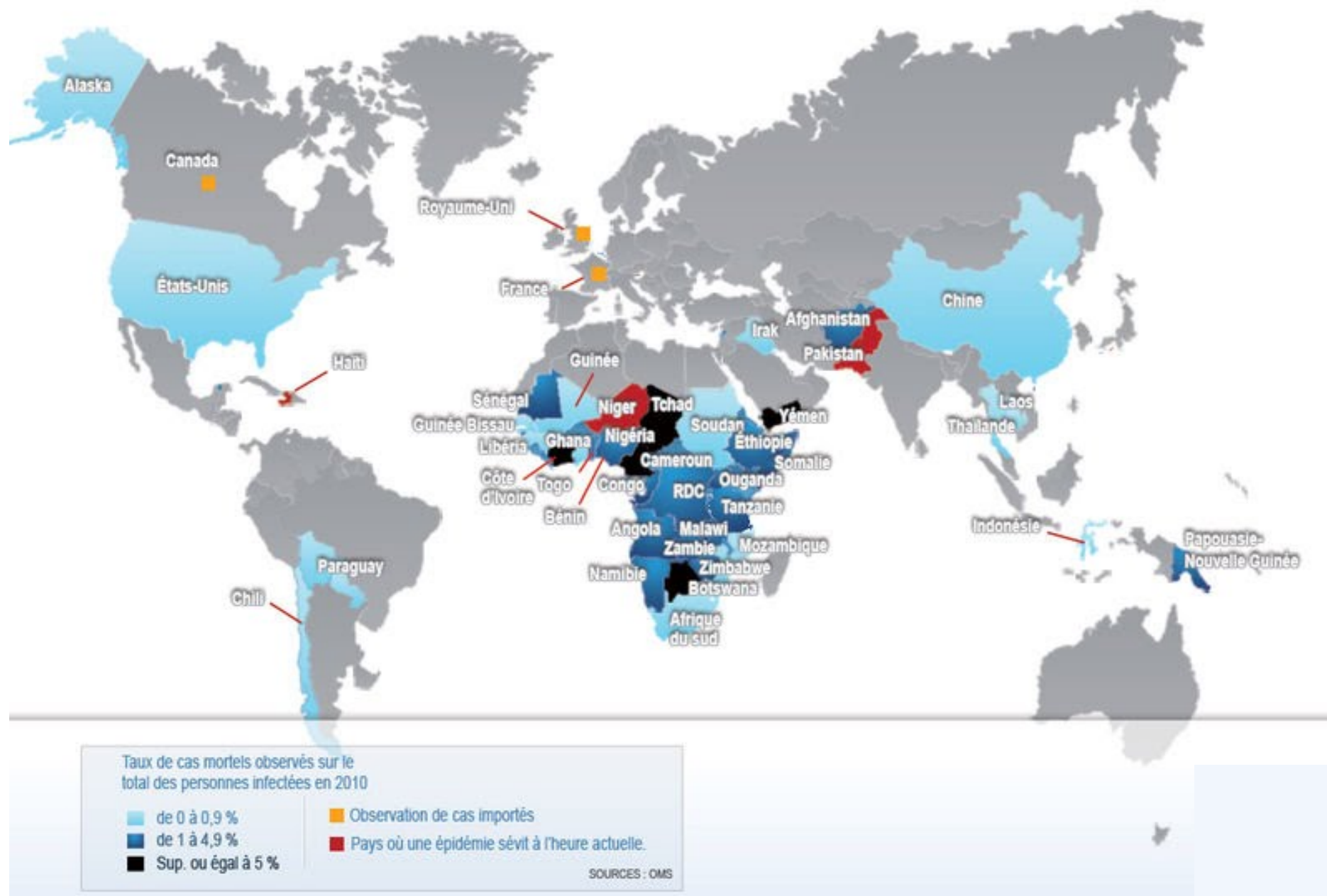
# Le choléra moderne et l'énigme de l'émergence

Diffusion de la septième pandémie de choléra : itinéraires, chronologie



Source : P. Berche, [www.jle.com](http://www.jle.com). Adaptation : S. Tabarly

# CARTE MONDIALE DU CHOLÉRA

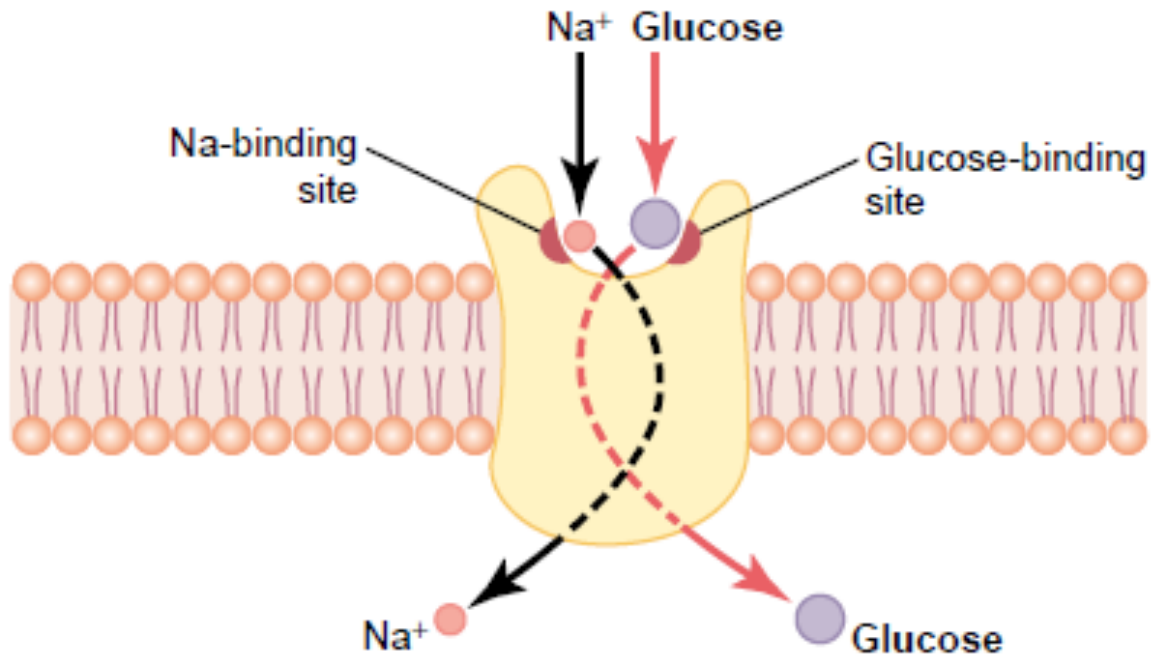




# Epidémie de Choléra, Dakka, Bangladesh, 1986



# Traitement "miracle" du choléra: solution de réhydratation orale



SLGT1 = Sodium/Glucose cotransporteur

Hirschhorn et coll. 1973. J Pediat

Recette "artisanale" SRO

1 litre d'eau potable

6-8 cuillères à thé de sucre

½ tasse à thé de sel



Enigme de l'émergence des épidémies de choléra résolue:  
*Vibrio cholerae* ne vit pas là où l'on pense...

Contagion interhumaine rend compte de la transmission – surtout urbaine - du choléra

Ne rend pas compte de l'émergence des épidémies/pandémies, en particulier dans le Golfe du Bengale qui semble réunir les conditions géographiques, écologiques et climatique nécessaires

Paradoxalement, la maladie humaine reste un épiphénomène par rapport au domaine de présence du vibrion cholérique dans l'environnement et il n'y a que peu de portage chronique asymptomatique

La vision anthropocentrique du choléra – compréhensible du fait de l'aspect terrifiant des épidémies/pandémies - a longtemps prévalu et il fallut attendre la fin du 20<sup>ème</sup> siècle pour qu'elle se modifie de manière drastique

On suspectait depuis longtemps la vie environnementale du vibrion cholérique, mais on n'avait pas pu l'y identifier

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Jan. 1983, p. 275-283  
0099-2240/83/010275-09\$02.00/0  
Copyright © 1983, American Society for Microbiology

Vol. 45, No. 1

## Ecological Relationships Between *Vibrio cholerae* and Planktonic Crustacean Copepods

ANWARUL HUQ,<sup>1</sup> EUGENE B. SMALL,<sup>2</sup> PAUL A. WEST,<sup>1</sup> M. IMDADUL HUQ,<sup>3</sup> REZAUR RAHMAN,<sup>3</sup> AND RITA R. COLWELL<sup>1\*</sup>

Departments of Microbiology<sup>1</sup> and Zoology,<sup>2</sup> University of Maryland, College Park, Maryland 20742, and International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh, Dacca-2, Bangladesh<sup>3</sup>

Received 15 July 1982/Accepted 5 October 1982

APPLIED MICROBIOLOGY, Feb. 1975, p. 269-274  
Copyright © 1975 American Society for Microbiology

Vol. 29, No. 2  
Printed in U.S.A.

## Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto Chitin and Copepods

TATSUO KANEKO<sup>1</sup> AND RITA R. COLWELL<sup>1\*</sup>

Department of Microbiology, University of Maryland, College Park, Maryland 20742

Received for publication 30 September 1974



Rita R Colwell

*V. cholerae* et de nombreuses autres espèces de vibrios sont des microorganismes marins se développant dans les eaux estuariennes chaudes plutôt alcalines  
Zone favorable : **écotone** = zone de transition entre deux écosystèmes. Pour les vibrios: rencontre eaux fluviales/eaux océaniques

*V. cholerae* est un saprophyte du zooplancton et la chitine est essentielle à ce saprophytisme



## Enigme de l'émergence des épidémies de choléra résolue: *Vibrio cholerae* ne vit pas là où l'on pense...

Durant les périodes épidémiques, la présence de *V. cholerae* dans l'environnement estuarien était surtout mise sur le compte d'une contamination par les hommes infectés.

Le concept d'un cycle environnemental de *V. cholerae* alternant des périodes de prolifération intense (isolement et culture facile) initiant les épidémies et des périodes de latence/dormance correspondant à des microorganismes vivants mais incultivables a été difficile à s'imposer du fait de l'impossibilité de démontrer la réalité de ces formes incultivables

Succès de la culture en utilisant des eaux similaires à celles des estuaires contaminés, en particulier à hautes concentrations de sels ont permis ce changement de paradigme.

La démonstration de l'association de *V. cholerae* avec du phytoplancton, en particulier des copépodes, prend tout son sens car elle procure un substrat sur lequel peuvent alterner les phases de croissance et de dormance

On comprend donc mieux les cycles qui sont largement influencés par les événements climatiques

Colwell RR, 1996, Science



Enigme de l'émergence des épidémies de choléra résolue:  
*Vibrio cholerae* ne vit pas là où l'on pense...

Condition idéales de croissance:

30 – 37 °C (>17°C)

pH alcalin (7 – 10)

Salinité = halophile + halotolérant (NaCl < 3 %)

Eau océanique trop salée, eau douce pas assez salée

Episodes intenses de chaleurs + pluie dans les zones côtières et à l'intérieur

Golfe du Bengale – particulièrement delta du Gange – est le terrain idéal.

**Optimum pour une croissance active = période post-mousson**

Pluies massives en période chaude assurent un écosystème idéal dans les zones estuariennes:

Mouvements des sédiments par le flot fluvial accru, croissance galopante du phytoplancton dont se nourrit le zooplancton qui assure la matrice

de soutien de *V. cholerae*, contexte métabolique favorable à sa croissance par dilution de la salinité océanique, alcalinisation, température élevée

Maintenant un vrai cadre écologique/écopathologique aux émergences saisonnières de choléra

# Copépodes

Les copépodes sont de petits crustacés dont les adultes ne mesurent pas plus d'un à deux mm

Les copépodes se développent dans tous les milieux aquatiques: eaux salées/eaux douces, océans, étangs



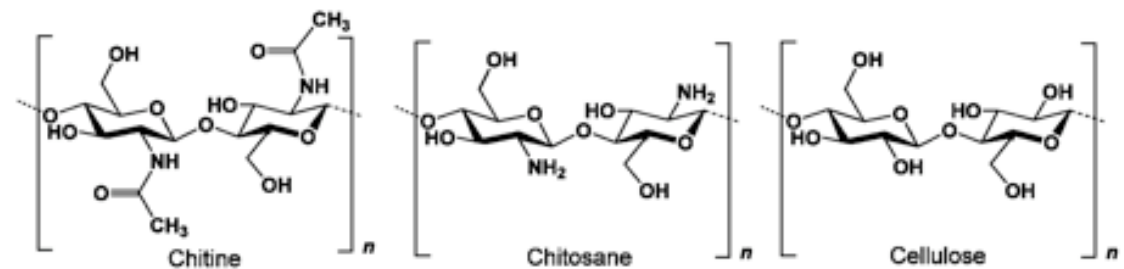
Composent de 60 à 80 % de la biomasse du zooplancton:  
Copépodes pélagiques  
Vivent aussi dans les sédiments = copépodes benthiques

Tégument = chitine

Chitine et chitosan sont des copolymères linéaires, aléatoires, de glucosamine et de N-acétyl-glucosamine

Variation dans le degré d'acétylation

Structure assez proche de la cellulose



## Copépode: support du cycle environnemental de *V. cholerae*

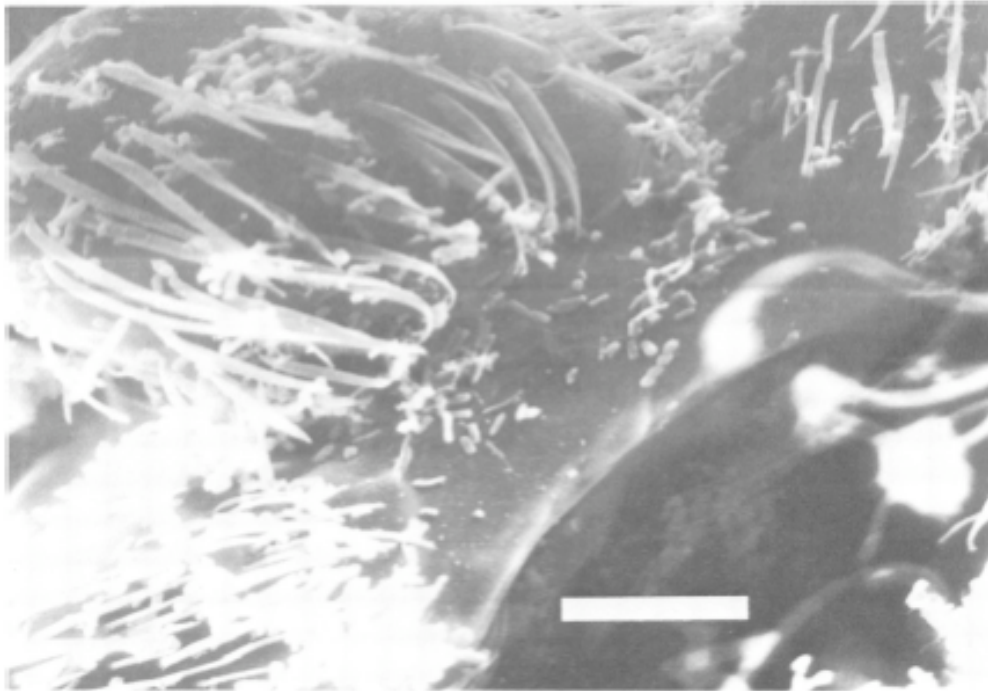


FIG. 4. View of a copepod oral region and feeding apparatus after incubation for 36 h in Patuxent River water and *V. cholerae* CA401. Bar, 10  $\mu$ m.

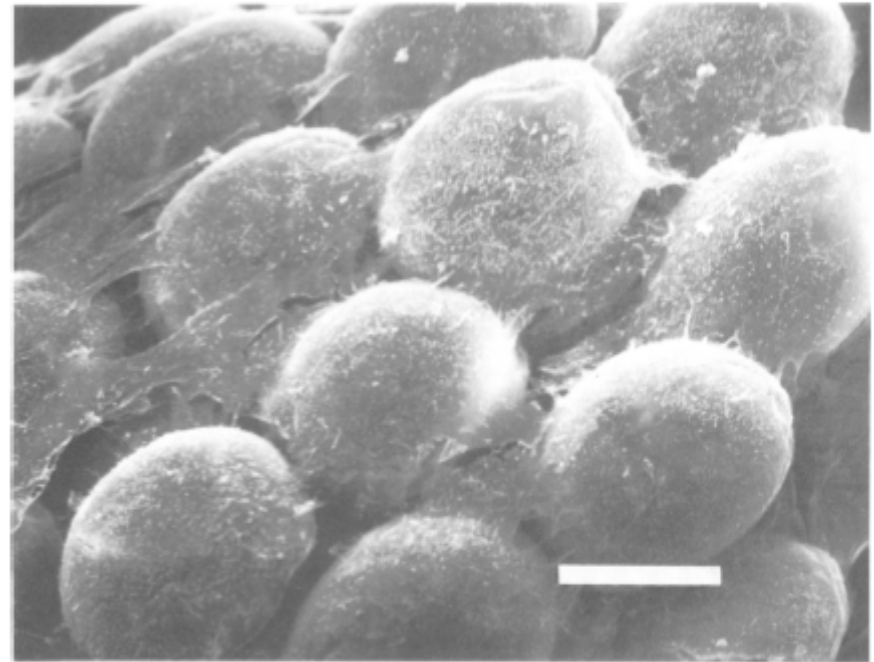


FIG. 5. Colonization of a copepod egg sac after incubation for 36 h in Patuxent River water and *V. cholerae* CA401. Bar, 50  $\mu$ m.

Kaneko & Colwell, 1975, Appl Environment Microbiol

### *V. cholerae*:

Ecto-symbiote des copépodes, colonise oeufs, bouche voire tube digestif

Adhérence à la chitine, colonisation externe et interne des copépodes

Ligands/adhésines bactériennes encore inconnues

Association à la chitine induit l'expression et l'activation d'une chitinase qui va faciliter la colonisation puis la dispersion des oeufs

Colonisation massive des espèces marines se nourrissant par filtrage de l'eau: huitres, moules coquillages, mais aussi crabes, voire poissons

# La chitine est au centre de la biologie de *V. cholerae* dans sa vie environnementale

*Science*. 2005 Dec 16;310(5755):1824-7.

## Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*.

Meibom KL<sup>1</sup>, Blokesch M, Dolganov NA, Wu CY, Schoolnik GK.

### Author information

#### Abstract

The mosaic-structured *Vibrio cholerae* genome points to the importance of horizontal gene transfer (HGT) in the evolution of this human pathogen. We showed that *V. cholerae* can acquire new genetic material by natural transformation during growth on chitin, a biopolymer that is abundant in aquatic habitats (e.g., from crustacean exoskeletons), where it lives as an autochthonous microbe. Transformation competence was found to require a type IV pilus assembly complex, a putative DNA binding protein, and three convergent regulatory cascades, which are activated by chitin, increasing cell density, and nutrient limitation, a decline in growth rate, or stress.

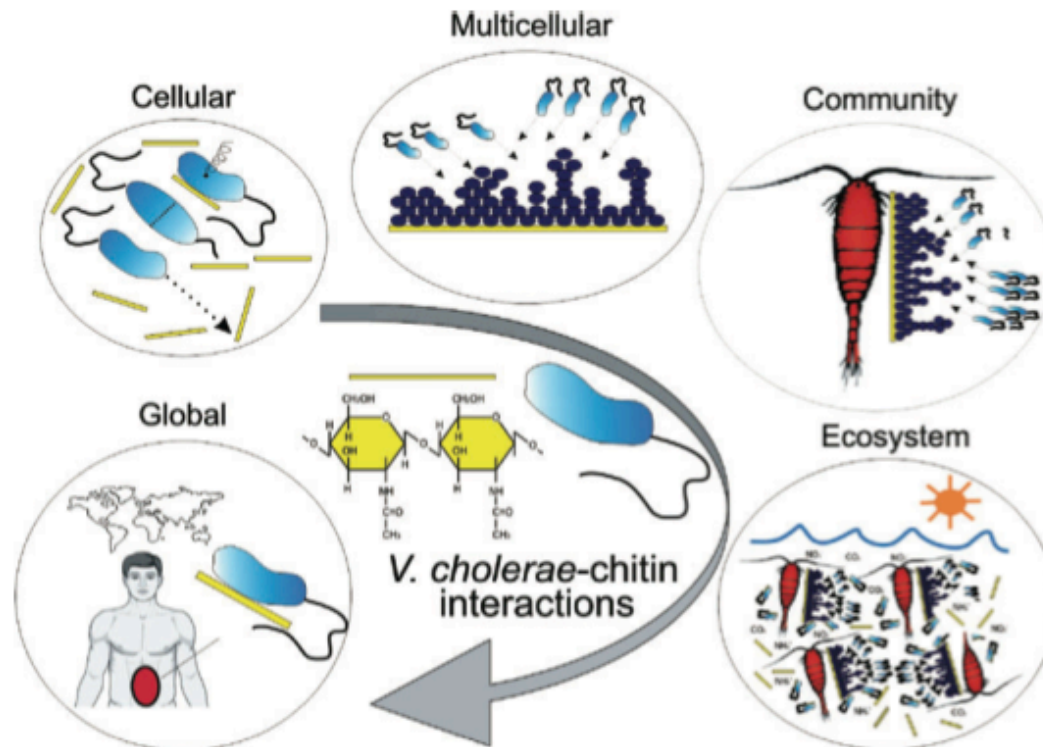


Fig. 1. Global impact of *V. cholerae*-chitin binding at different hierarchical scales in the environment, comprising: cell response (e.g. cell multiplication, chemotaxis, competence), biofilm formation, association with chitinous organisms, C and N cycling, and pathogenicity for humans.

## La chitine est au centre de la biologie de *V. cholerae* dans sa vie environnementale

Interaction de *V. cholerae* avec chitine: modèle écologique du succès de l'interaction d'une bactérie avec un substrat influençant puissamment une diversité de propriétés qui vont définir le mode de vie du microorganisme

Chitine = un des biopolymères les plus abondants sur la planète et dans les océans

Avantages de l'association pour *V. cholerae*:

Réserve de nutriment et adaptation aux gradients environnementaux de ces nutriments

Tolérance au stress

Protection contre des prédateurs

Interactions intervenant à des niveaux hiérarchiques variés:

Réponses cellulaires physiologiques et métaboliques comme induction de compétence, chémotaxie, entrée en phase de croissance, formation de biofilms, régulation de l'interaction symbiotique avec les eucaryotes comme le zooplancton, pathogénicité pour les animaux aquatiques et l'homme.

**Symbiose mutualiste ? Rôle des facteurs de pathogénicité dans l'environnement ? Régulation osmotique des copépodes ?**

Superbe modèle pour étudier le "priming" à la virulence (secondaire) chez l'homme de l'habitat primaire du microorganisme.

Pruzzo et coll, 2008, Environment Microbiol



# Les outils de la prévalence écologique de *V. cholerae* dans l'environnement et dans l'intestin humain

PNAS

## Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system

Stefan Pukatzki\*, Amy T. Ma\*, Derek Sturtevant\*, Bryan Krastins<sup>†</sup>, David Sarracino<sup>‡</sup>, William C. Nelson<sup>‡</sup>, John F. Heidelberg<sup>‡</sup>, and John J. Mekalanos\*<sup>§</sup>

\*Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, 200 Longwood Avenue, Boston, MA 02115; <sup>†</sup>Harvard Partners Center for Genetics and Genomics, 65 Landsdowne Street, Cambridge, MA 02140; <sup>‡</sup>The Institute for Genomic Research, 9712 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850

Contributed by John J. Mekalanos, December 1, 2005

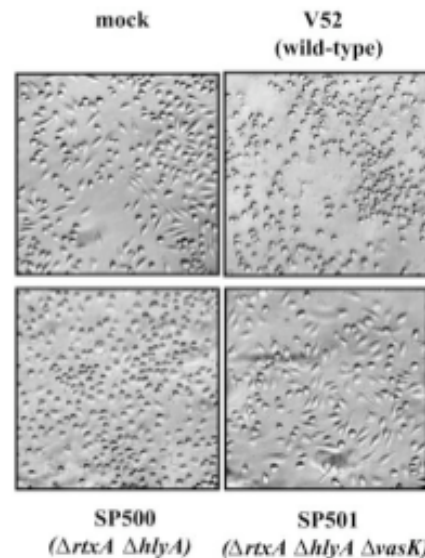


Fig. 4. *V. cholerae* cytotoxicity toward J774 macrophages. J774 cells were infected for 2 h with V52 (wild type) and isogenic mutant SP500 ( $\Delta rtxA$ ,  $\Delta hlyA$ ) or mutant SP501 ( $\Delta rtxA$ ,  $\Delta hlyA$ ,  $\Delta vasK$ ). Cells were fixed with 3% paraformaldehyde to assess the morphology of infected cells.

日本語要約

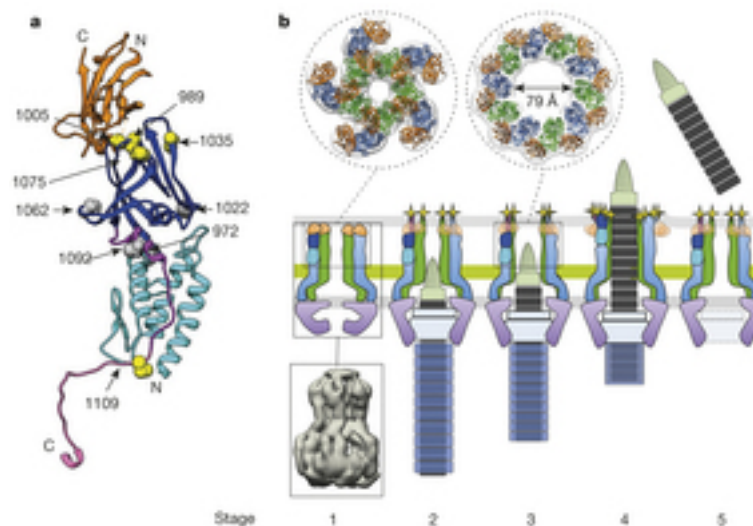
# Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex

Eric Durand, Van Son Nguyen, Abdelrahim Zoued, Laureen Logger, Gérard Péhau-Arnaudet, Marie-Stéphanie Aschtgen, Silvia Spinelli, Aline Desmyter, Benjamin Bardiaux, Annick Dujeancourt, Alain Roussel, Christian Cambillau, Eric Cascales & Rémi Fronzes

[Affiliations](#) | [Contributions](#) | [Corresponding authors](#)

*Nature* **523**, 555–560 (30 July 2015) | doi:10.1038/nature14667

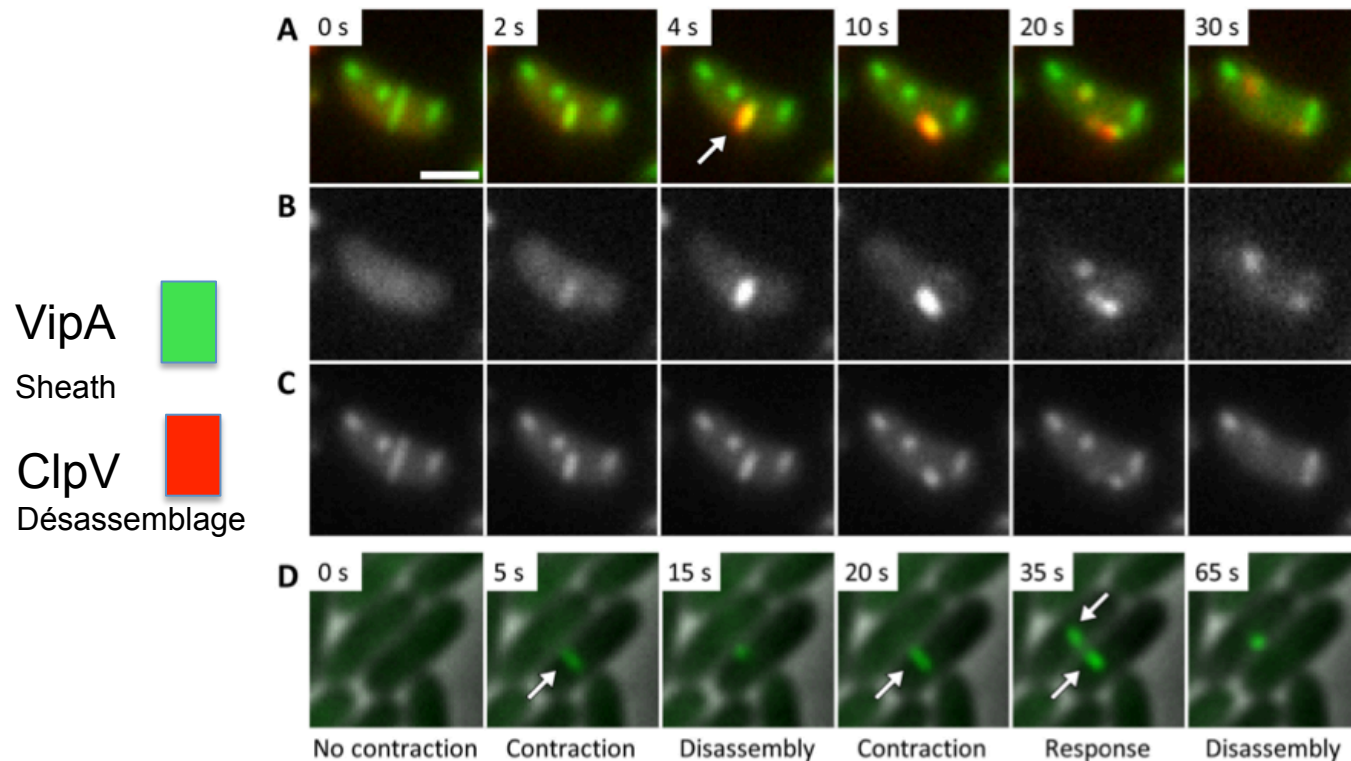
Received 10 March 2015 | Accepted 15 June 2015 | Published online 22 July 2015



## Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells

M. Basler<sup>1</sup> and J. J. Mekalanos<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, 200 Longwood Avenue, Boston, MA 02115 U.S.A.



**Figure 1. ClpV co-localizes with contracted sheath**

3×3 μm field of cells is shown. Bar in A is 1 μm and applies to A–D. (A–C) *V. cholerae* ClpV-mCherry2 + pBAD24-VipA-sfGFP. (A) merge of ClpV-mCherry2 and VipA-sfGFP signals. (B) ClpV-mCherry2 signal. (C) VipA-sfGFP signal. Additional frames and cells are shown in Videos S2 and S3. (D) *P. aeruginosa* Δ*retS*/ClpV1-GFP, additional frames and cells are shown in Videos S6 and S7.

# Relation T6SS, "killing" des proies bactériennes, chitine, compétence et versatilité génétique de *V. cholerae*

## BACTERIAL EVOLUTION

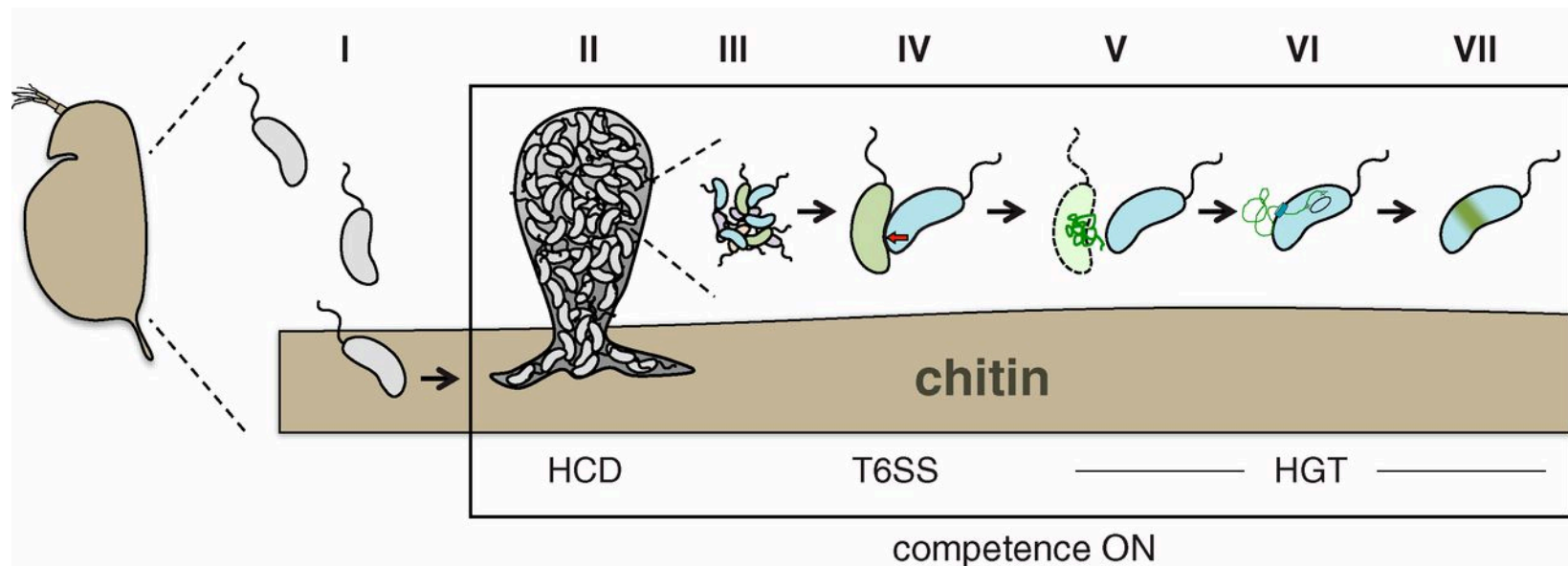
### The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer

Sandrine Borgeaud, Lisa C. Metzger, Tiziana Scrignari, Melanie Blokesch\*

Natural competence for transformation is a common mode of horizontal gene transfer and contributes to bacterial evolution. Transformation occurs through the uptake of external DNA and its integration into the genome. Here we show that the type VI secretion system (T6SS), which serves as a predatory killing device, is part of the competence regulon in the naturally transformable pathogen *Vibrio cholerae*. The T6SS-encoding gene cluster is under the positive control of the competence regulators TfoX and QstR and is induced by growth on chitinous surfaces. Live-cell imaging revealed that deliberate killing of nonimmune cells via competence-mediated induction of T6SS releases DNA and makes it accessible for horizontal gene transfer in *V. cholerae*.

Science, 2015

# Relation T6SS, "killing" des proies bactériennes, chitine, compétence et versatilité génétique de *V. cholerae*



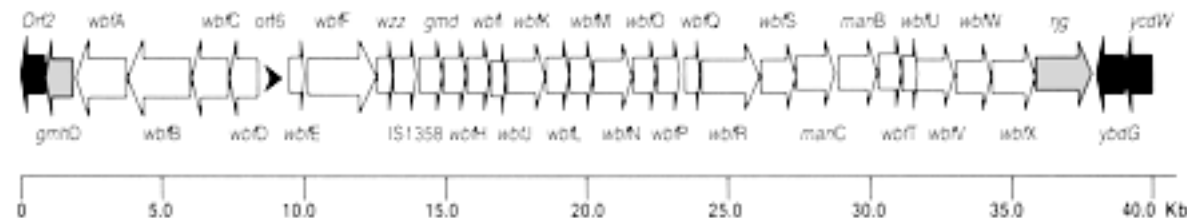
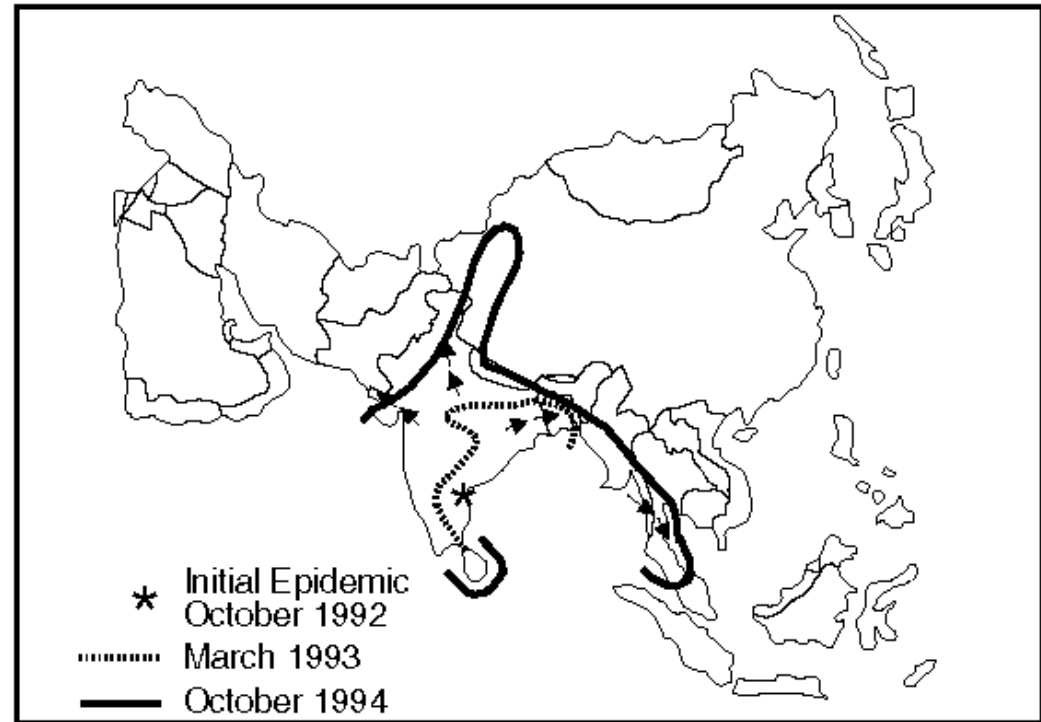
Sandrine Borgeaud et al. Science 2015;347:63-67





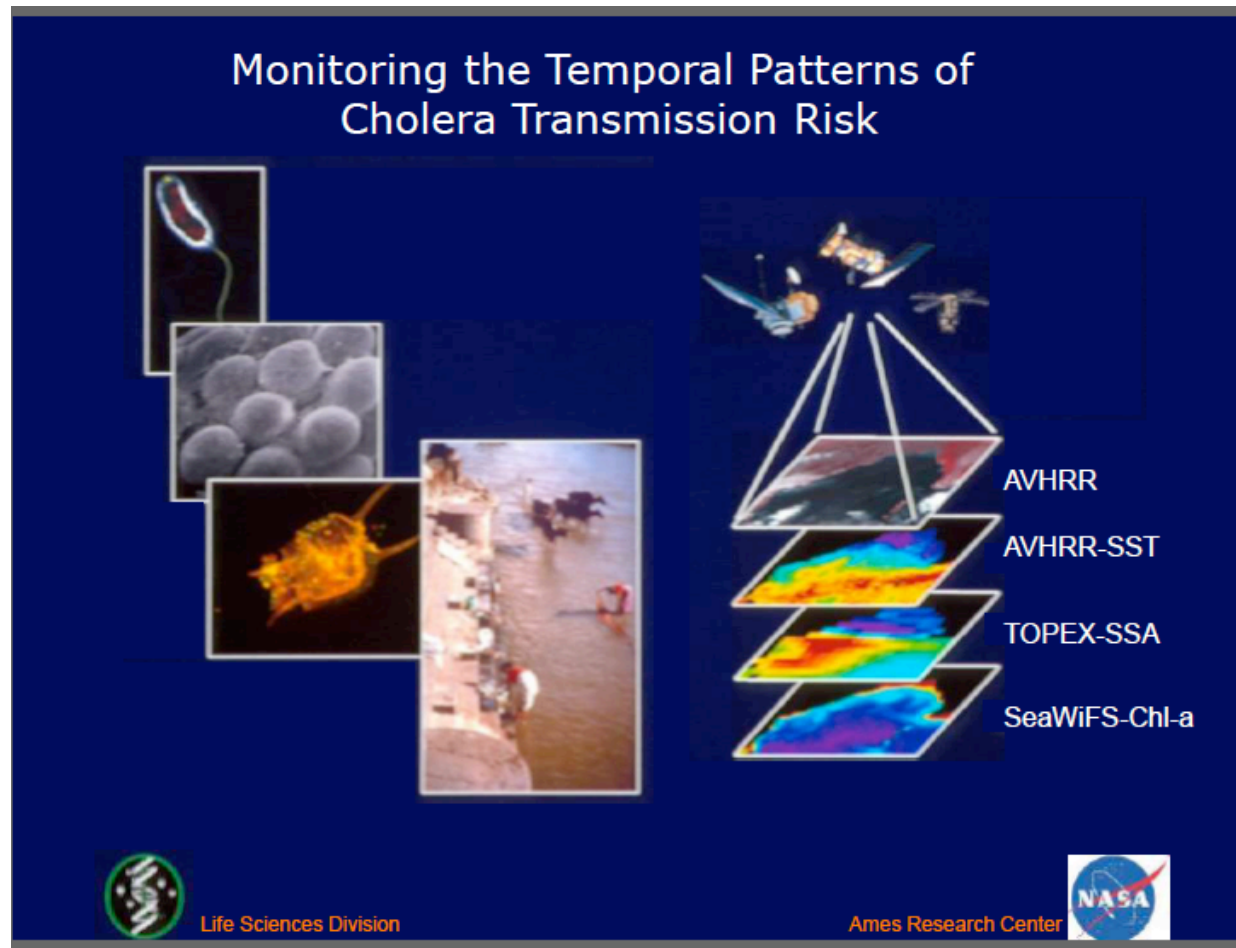
# Enigme de l'apparition de nouveaux biotypes/sérotypes pathogènes de *V. cholerae*

Emergence du sérotype O139  
Souche "chassis" O1/EI Tor  
ancestrale  
Substitution de l'antigène somatique  
O1 (4-NH<sub>2</sub>-4,6-didéoxymannose) par  
(3-deoxy-L-acide glycéro-tétronique)  
(Weintraub, 1994, Microb Pathog)



Cluster génétique codant pour l'antigène O139 (41 221 bp). Insertion de la séquence  
O139-spécifique (locus *wbf* = 35 807 bp de *wbfA* à *wbfX*)  
Origine du locus *wbf* ?

# "Remote sensing" et anticipation du Choléra



Les paramètres de développement de *V. cholerae* sont identifiables et susceptibles de suivi par observation satellitaire:

- Développement du phytoplancton
- Température de surface de l'eau
- Spectre de la chlorophylle
- Précipitations massives

# Carte de conditions optimales de survenue du choléra ("suitability maps")

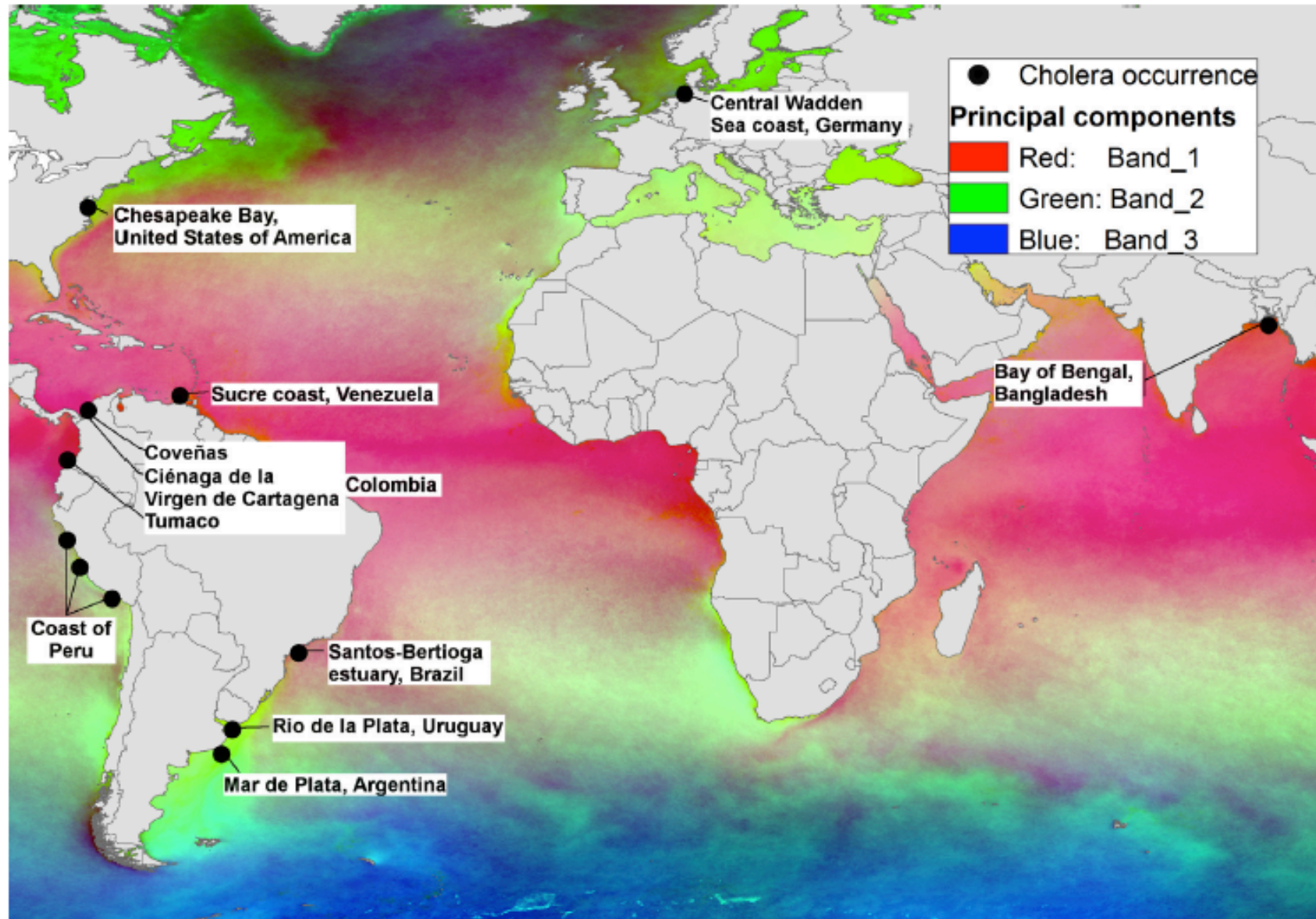


Fig. 1. Reports of *Vibrio cholerae* from sea water samples.



Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Acta Tropica

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/actatropica](http://www.elsevier.com/locate/actatropica)



## A global map of suitability for coastal *Vibrio cholerae* under current and future climate conditions



Luis E. Escobar<sup>a,b,\*</sup>, Sadie J. Ryan<sup>a,c,d,e</sup>, Anna M. Stewart-Ibarra<sup>a,f</sup>, Julia L. Finkelstein<sup>g</sup>, Christine A. King<sup>a,h,i</sup>, Huijie Qiao<sup>j</sup>, Mark E. Polhemus<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Center for Global Health and Translational Science, State University of New York (SUNY) Upstate Medical University, Syracuse, NY, USA

<sup>b</sup> Facultad de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Andres Bello, República 440, Santiago, Chile

<sup>c</sup> Department of Geography, University of Florida, Gainesville, FL, USA

<sup>d</sup> Emerging Pathogens Institute, University of Florida, Gainesville, FL, USA

<sup>e</sup> School of Life Sciences, College of Agriculture, Engineering, and Science, University of KwaZulu Natal, Durban, South Africa

<sup>f</sup> Department of Medicine, SUNY Upstate Medical University, Syracuse, NY, USA

<sup>g</sup> Division of Nutritional Sciences, Cornell University, Ithaca, NY, USA

<sup>h</sup> Department of Microbiology and Immunology, SUNY Upstate Medical University, Syracuse, NY, USA

<sup>i</sup> Laboratorio de Biomedicina, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador

<sup>j</sup> Key Laboratory of Animal Ecology and Conservation Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

ENM = Ecological niche models

Identification de zones côtières réunissant (principal components) des paramètres similaires (clusters) connus pour favoriser la croissance de *V. cholerae* mesurables à distance (satellitaire):

Concentration de chlorophylle, température de surface, pH.

Etablissement de "cartes de vulnérabilité"



# Choléra: le pire encore à venir ?

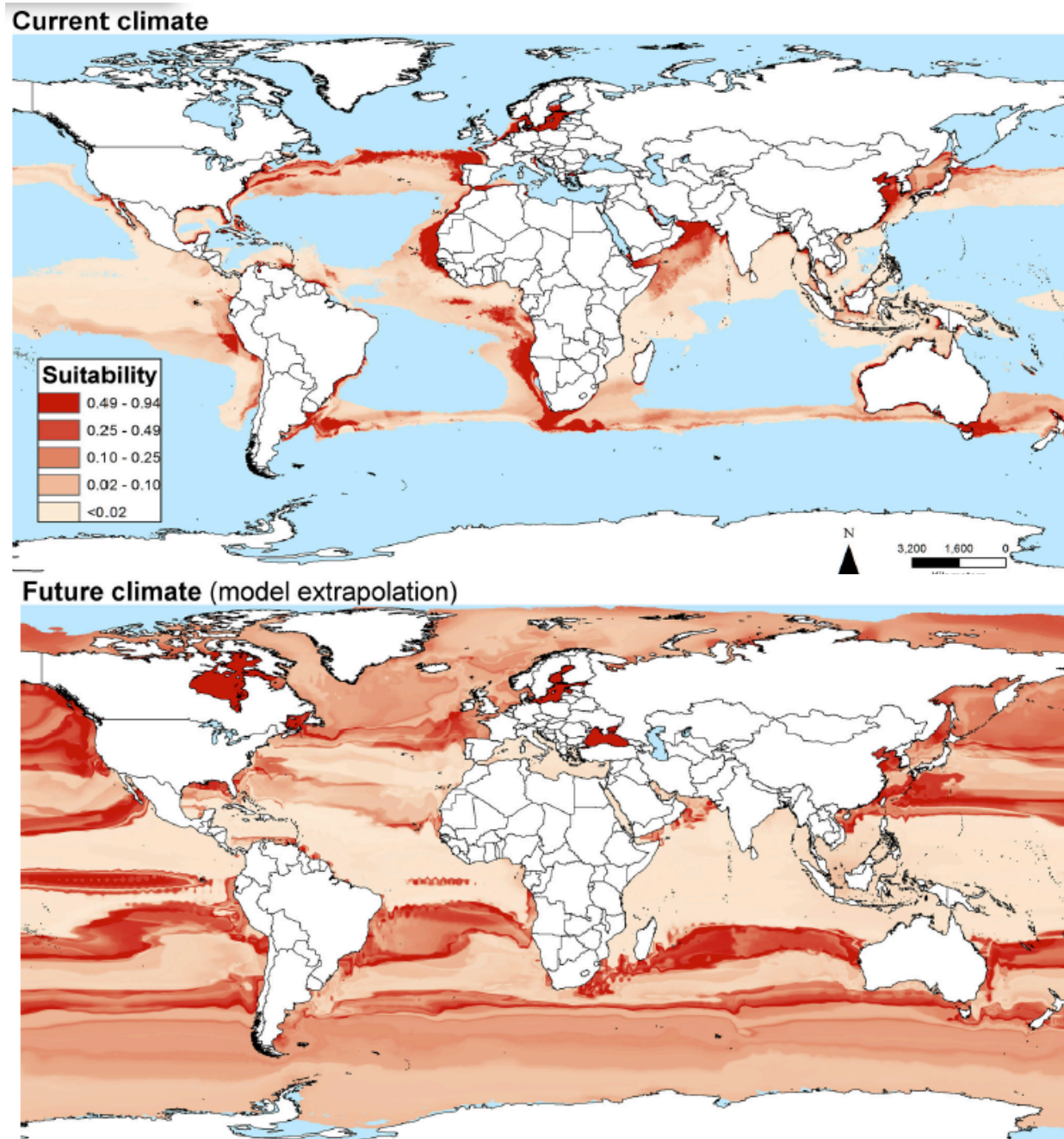


Fig.5. Global map of *Vibrio cholerae* suitability in seawater under future B1 (IPCC) climate scenarios. Models calibrated with current sea surface temperature and salinity were transferred (top) and extrapolated