

**Intérêt de l'étude moléculaire
des microorganismes responsables
de maladies d'importation**

**Pr Jean-Louis Koeck
HIA Robert Picque Bordeaux**

**Améliorer les performances
du diagnostic**



**Prise en charge individuelle
précoce et adaptée**

Performances

❖ Sensibilité, spécificité, rapidité

- Acide nucléique cible en plusieurs copies
- PCR en temps réel



Indications : contribution insuffisante...

❖ De la culture

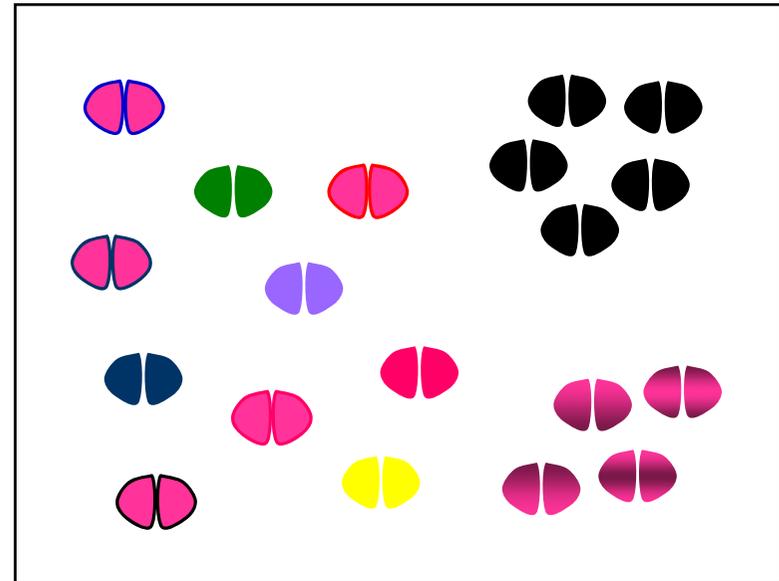
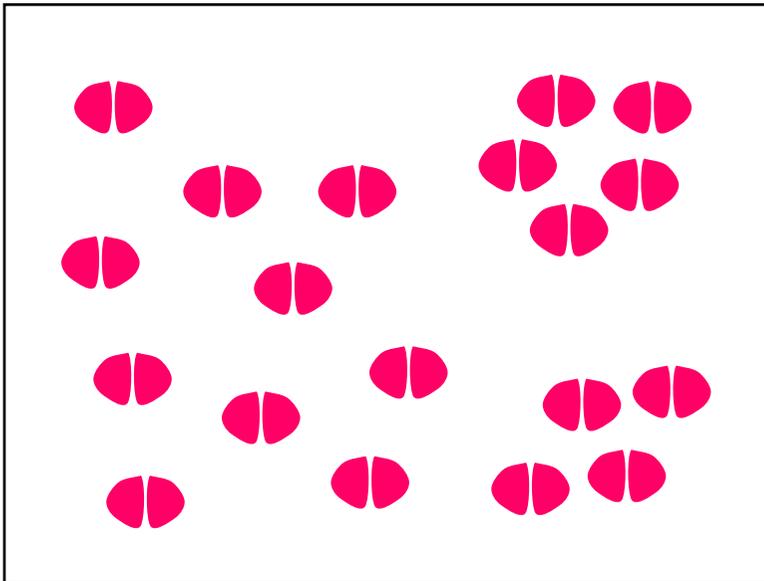
- Virus : arbovirus, influenza, coronavirus, norovirus...
- Protozoaires : toxoplasmes, leishmanies, *Plasmodium*...
- Certaines bactéries : BK, rickettsies, leptospires...

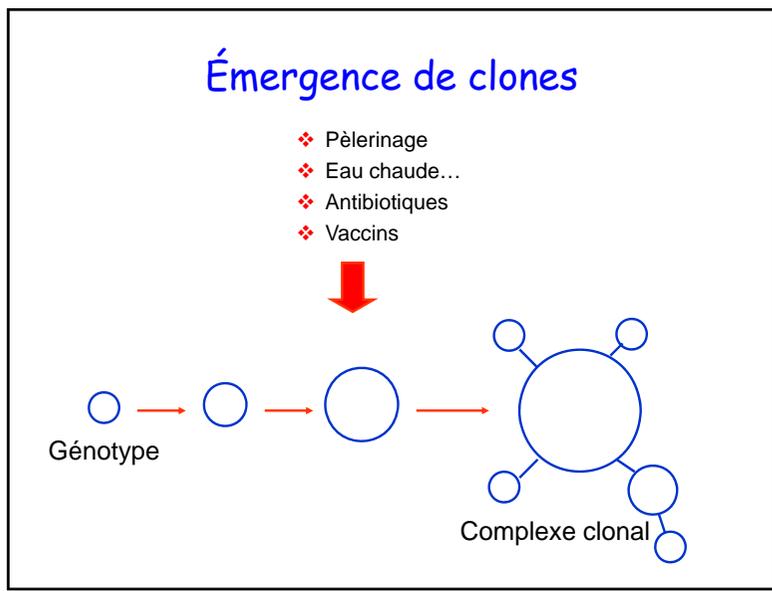
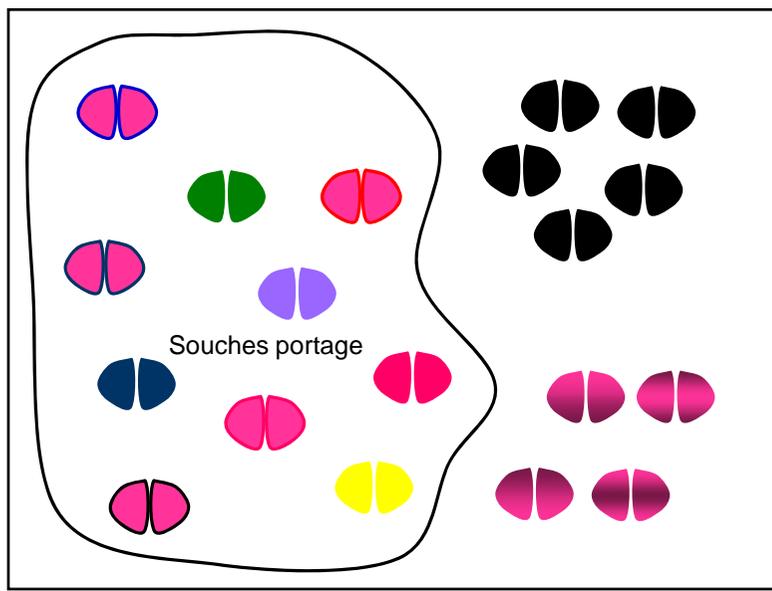
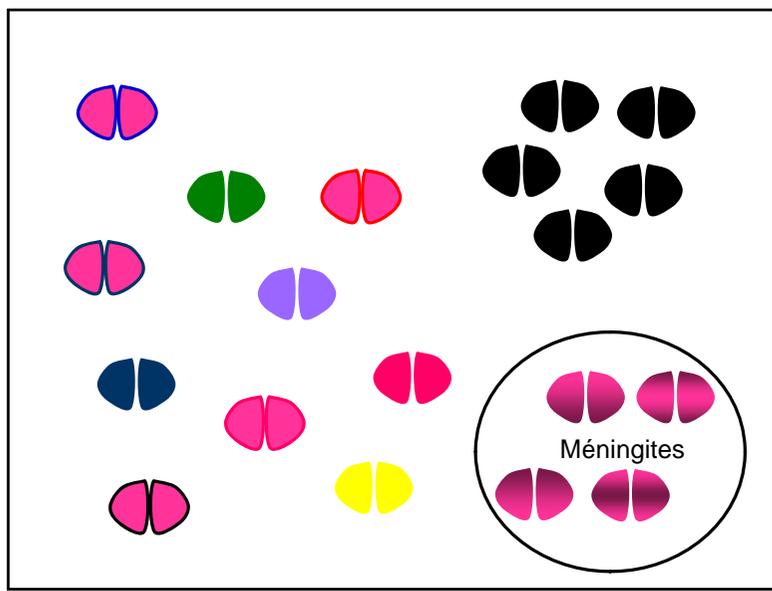
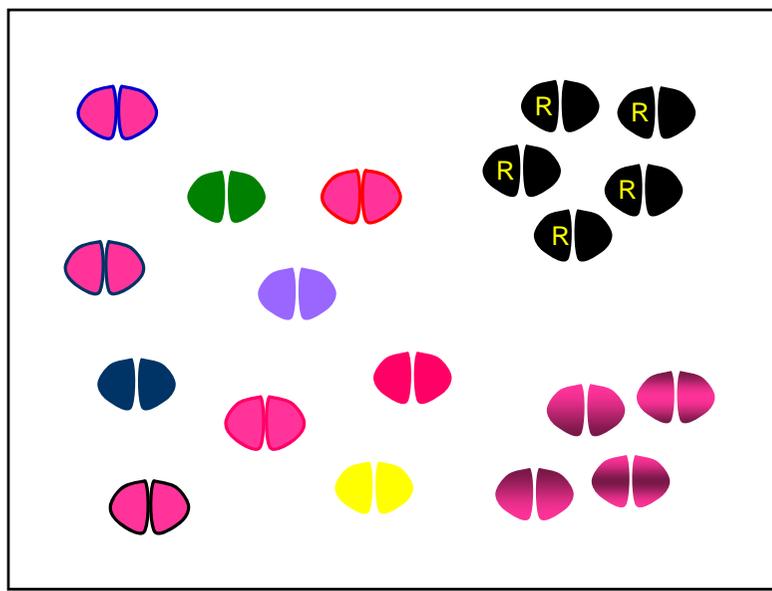
❖ De la sérologie

Diagnostic rapide de la résistance

- ❖ BK : multirésistance et ultrarésistante
 - Détection moléculaire de la résistance à la rifampicine
- ❖ Paludisme
 - Atovaquone + proguanil
- ❖ Bactéries multirésistantes

Étude de la diversité génétique des microorganismes





Pourquoi génotyper un agent infectieux ?

- ❖ Déterminer l'origine d'une contamination, d'une infection
- ❖ Identifier une épidémie
- ❖ Comprendre l'épidémiologie en confrontant génotypes et :
 - **Caractéristiques phénotypiques des agents infectieux** :
virulence, résistance, antigènes...
 - **Caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques des populations humaines** : âge, géographie, létalité, symptomatologie, protection immunitaire...

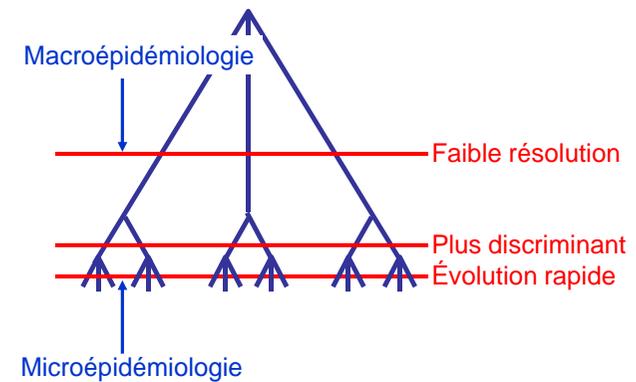
Comprendre l'épidémiologie de la maladie d'importation

- ❖ Réservoir
- ❖ Transmission
- ❖ Distribution géographique
- ❖ Diffusion dans des groupes à risque
- ❖ Facteurs de risque

Méthodes de génotypage

- ❖ Virus
- ❖ Bactéries
- ❖ Parasites

Vitesse de mutation des marqueurs



Principales méthodes

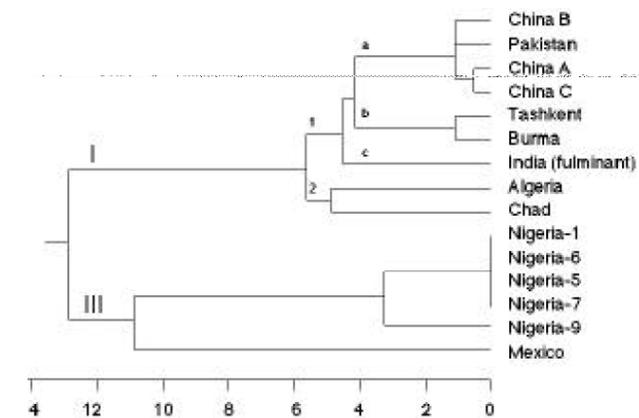
- ❖ Virus
 - Séquence nucléotidique
- ❖ Bactéries ou parasites
 - Séquence nucléotidique de «gènes de ménage»: MLST
 - Motifs d'ADN répétés
 - 1 à 8 pb = microsatellites
 - > 8pb – minisatellites – VNTRs → MLVA
 - Electrophorèse en champ pulsé
 - AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism
 - SNPs: Single Nucleotide Polymorphism

Méthodes

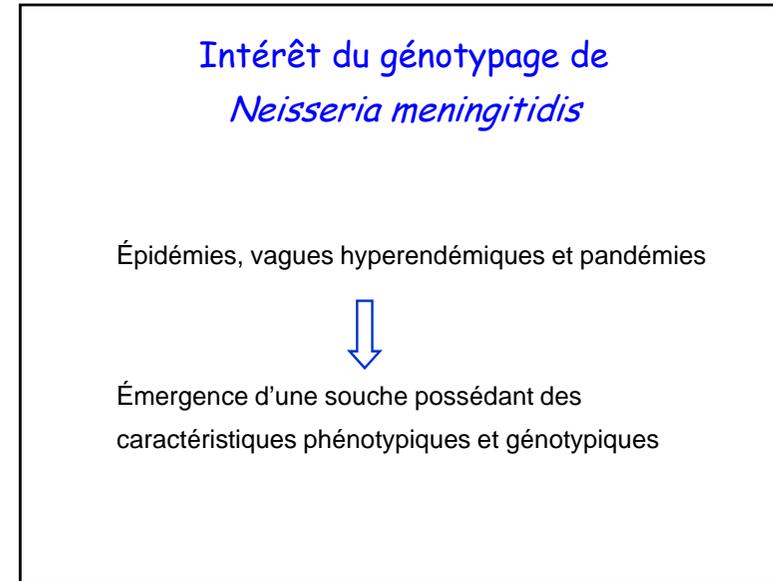
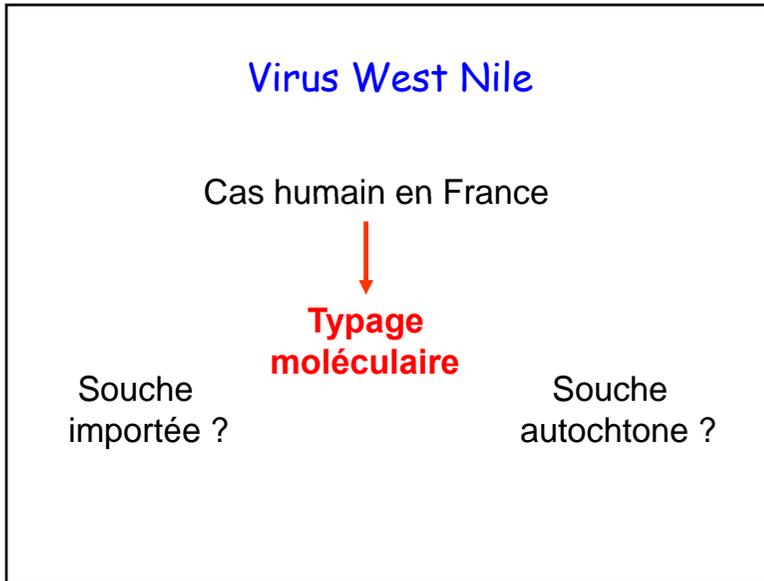
- ❖ « **MONOLOCUS** »
 - Une seule région génomique étudiée
 - Ex. : spoligotyping
- ❖ « **MULTILOCUS** »
 - Plusieurs régions génomiques étudiées
 - Ex. : MultiLocus Sequence Typing (MLST)

Origine géographique

Répartition géographique des génotypes du virus de l'hépatite E



Grandadam, Bull Soc Pathol Exot. 1999



Carte d'identité du méningocoque

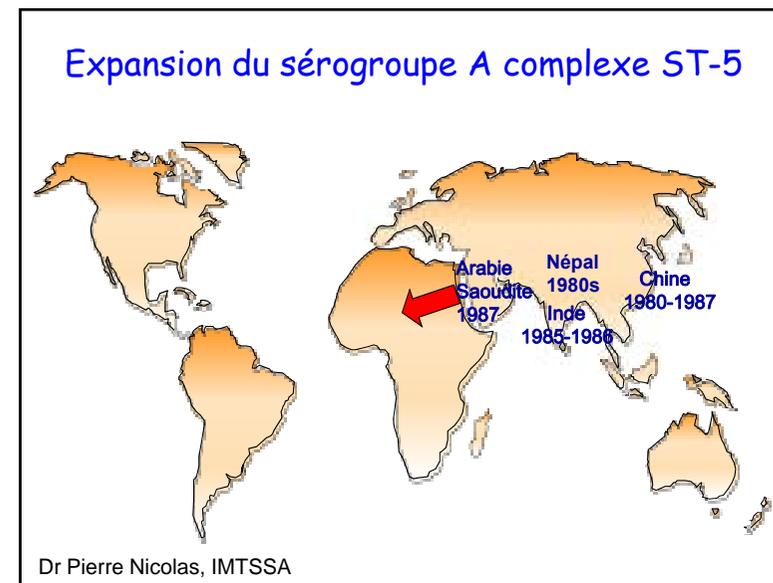
Réponse : A:4:P1.9, sous-groupe III, ST-5

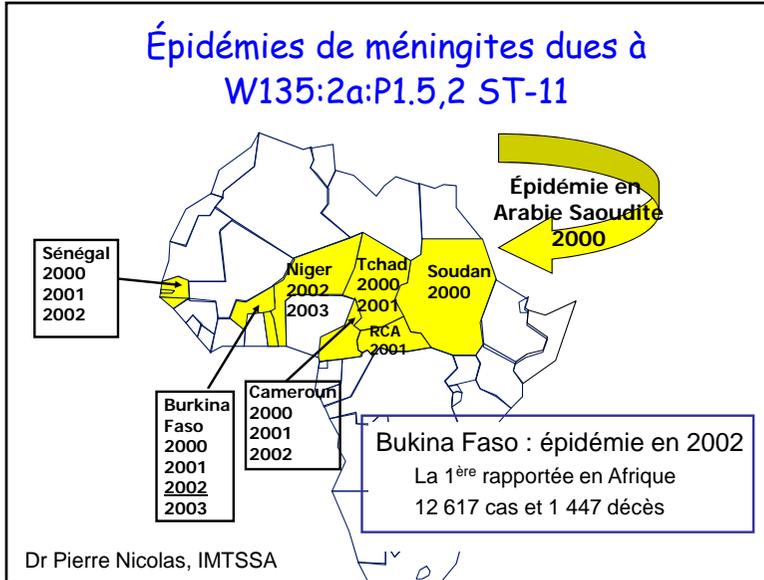
Mon phénotype

- Mon séro groupe est : **A**
- Mon type est : **4**
- Mon sous-type est : **P1.9**
- Mon électrophorétype appartient au : **sous-groupe III**

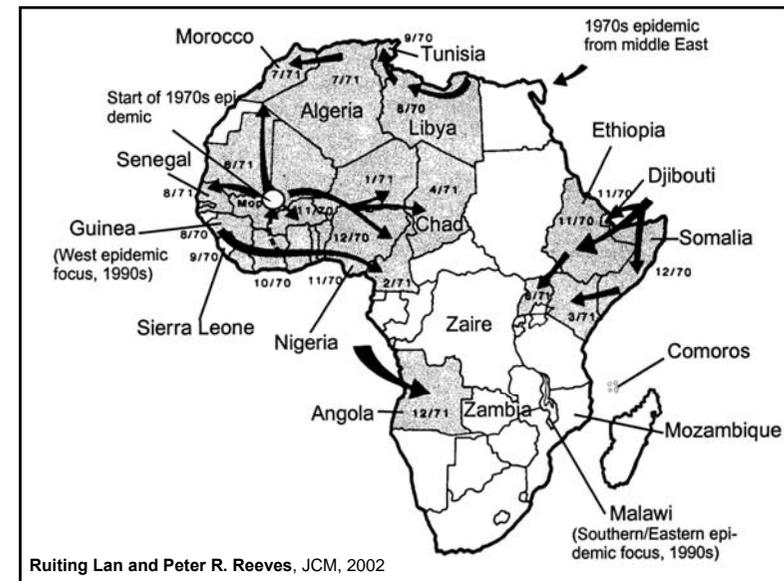
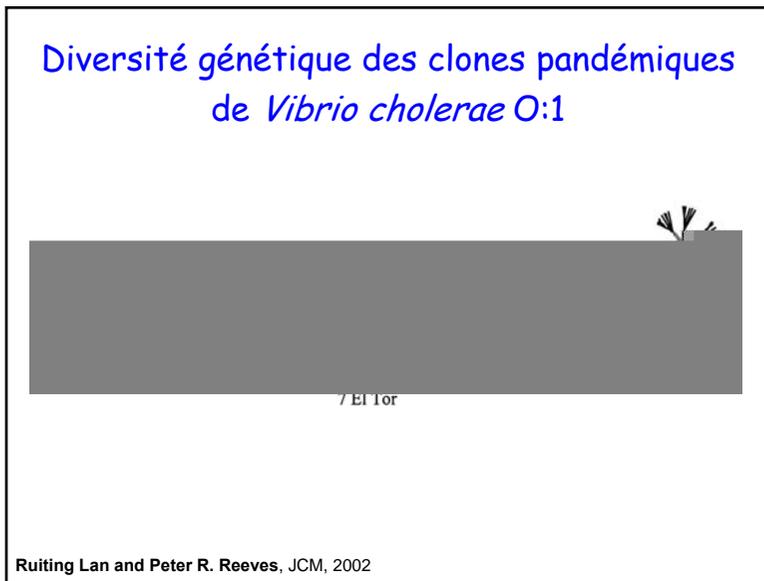
Mon génotype

- Mon profil MLST est : **ST-5**





- ### Épidémies de méningites dues à W135:2a:P1.5,2 ST-11
- ❖ Switch capsulaire ?
 - ❖ Pèlerinage → amplification ?
 - ❖ Pression vaccinale ?

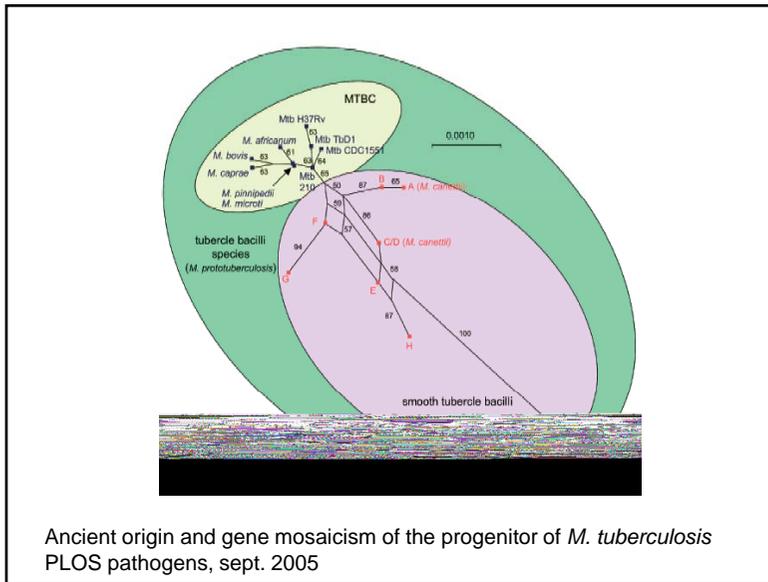
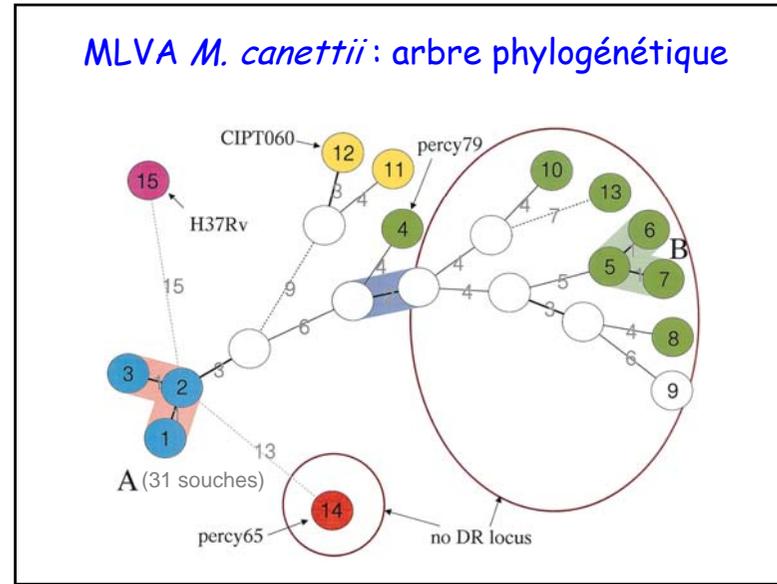


The screenshot shows the website for The European Working Group for Legionella Infections (EWGLI). The main heading is "The European Working Group for Legionella Infections". Below this, the section "Aims and Objectives" is displayed. The "Aims:" section includes three bullet points: "To reduce the incidence of travel associated legionnaires' disease", "To prevent further cases through enhancing the identification and control of known sources of legionella", and "To provide an early warning system to all collaborators and other public health officials". The "Objectives:" section includes two bullet points: "To enhance the capability within the EU to detect common source outbreaks early, enabling member states to implement timely preventive action" and "To inform all those that need to know about travel associated legionnaires'". A navigation menu on the left includes links for Home, EQA Schemes, EWGLINET, Data / Information, Collaborators, Site Updates, and Subscribe. At the bottom, there are links for Search and Contact Us.

The screenshot shows a document titled "Legionella pneumophila Sequence Based Typing". The text is partially obscured by a large grey redaction box. A small section of text is visible, stating: "Using the SBT protocol, the SBT database (version 3.0) allows assignment of the seven ordered alleles, *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, and *neuA* as described by Gaia *et al.* (2005) and Ratzow *et al.* (2005)".

M. tuberculosis: microépidémiologie

Identification de la chaîne de



Intérêt de l'étude de la diversité génétique des *Plasmodium*

Marqueurs de résistance + microsatellites

↓

- ❖ Cas de paludisme en France
 - Importation ou autochtone ? → contamination par les mêmes moustiques
- ❖ Paludisme chez des gendarmes au retour de Guyane :
 - Contamination au même endroit ?
- ❖ Paludisme au retour des Comores
 - Profils différents selon l'île ?

Diversité de *Plasmodium falciparum* avant et pendant une épidémie de paludisme à Djibouti

Année	Diversité*
1998 (pré-épidémie)	80 %
1999 (épidémie)	35 %
2002 (post-épidémie)	63 %

* Probabilité que deux génotypes choisis au hasard soient identiques

C. Rogier, *Emerging Infectious Diseases*, 2005

Diversité génétique et virulence

Diversité génétique des toxoplasmes

Table 2. - Summary of some biological and epidemiological characteristics of the main *Toxoplasma* genotypes

Type I

Rarely isolated (10% of strain collections in Europe and USA, mainly from human origin)
Highly virulent for mice: death of all mice inoculated with less than 10 tachyzoites



tachyzoite-bradyzoite and formation of cysts

Type III, recombinant genotypes and unusual genotypes with atypical alleles

Rare among *Toxoplasma* isolates originating from Europe and USA

More frequent among isolates originating from wild animals, from remote areas and from unusual human disease

Usually more virulent for mice than type II isolates

Souches virulentes

Darde ML, *Ann Ist Super Sanità* 2004

Cas de toxoplasmose sévère chez des adultes immunocompétents en Guyane

Identification d'un génotype atypique de *Toxoplasma*



Carne, *JCM* 2002

Leishmaniose cutanée en Guyane

Diagnostic moléculaire

*Leishmania
guyanensis*

*Leishmania
braziliensis*

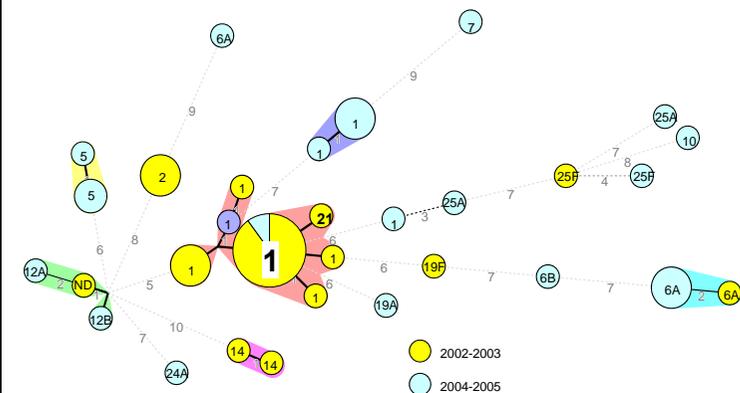
Autres applications

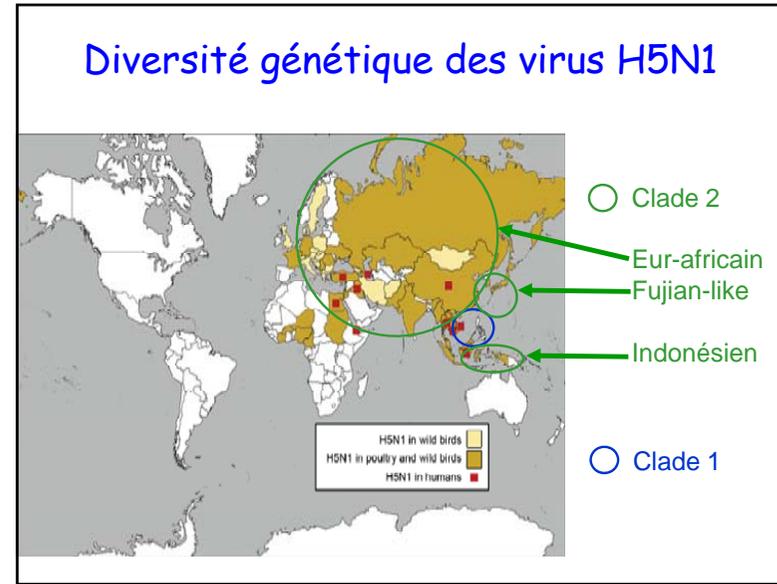
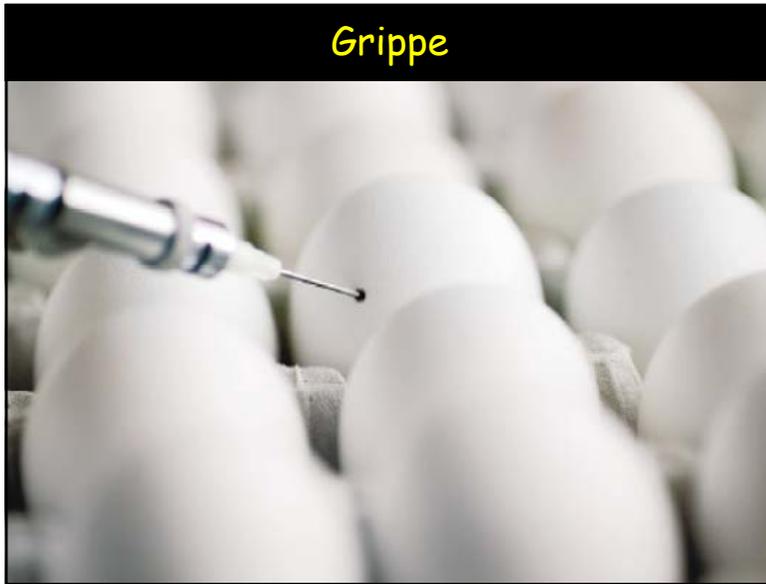
- ❖ Bioterrorisme
 - Ex. : charbon
- ❖ Importation de bactéries multirésistantes
 - Ex. : SARM
- ❖ Infection d'origine alimentaire :
identification de l'aliment source

Diversité génétique et efficacité vaccinale

- ❖ La souche vaccinale est-elle représentative de l'ensemble de la population ?
- ❖ Anticorps neutralisants produits contre l'antigène cible seront-ils efficaces contre tous les autres individus de la même espèce ?
- ❖ Connaître la diversité génétique avant et la surveiller après la mise en place du vaccin : Échappement ? Sélection d'un clone particulier ?

Évaluation pré vaccinale de la diversité génétique du pneumocoque au Burkina Faso





Variabilité de l'hémagglutinine des souches H5N1 aviaires détectées chez l'homme

Antigenic analyses of H5N1: Haemagglutination Inhibition Test

VIRUSES	ANTISERA					
	A/HK/156/97	A/HK/213/03	A/Vietnam/1194/04	A/Indonesia/5/05	Qu/Cirebon/BB Vet/05	Ty/Turkey/1/05
	sheep	goat	sheep	ferret	ferret	ferret
A/Hong Kong/156/97	640	80	40	<40	<40	20
A/Hong Kong/213/03	320	320	320	80	80	20
A/Vietnam/1194/04	160	80	320	<40	40	<5
A/Vietnam/1203/04	640	40	160	<40	<40	<5
A/Vietnam/3212/04	320	80	160	40	<40	NT
A/Vietnam/JP30262/04	160	40	320	40	40	NT
A/Indonesia/5/05	40	<40	40	320	320	5
A/Indonesia/6/05	40	<40	40	320	320	20
A/quail/Cirebon/BB Vet/05	40	NT	40	320	640	10
A/turkey/Turkey/1/05	80	<40	<40	80	80	320
A/Turkey/15/2006	40	NT	40	160	160	320
A/Turkey/1242/2006	80	80	160	160	80	320
A/Iraq/1/2006	160	160	320	320	80	320
A/Azerbaijan/115/2006	80	80	160	80	40	320
A/avian/Azerbaijan/3/2006	80	80	160	80	80	320
A/chicken/Egypt/2/2006	40	40	320	40	40	320
A/Egypt/902782/2006	80	80	160	80	80	320

Exemple : *Staphylococcus aureus*

- ❖ Unités en Afrique intertropicale et au retour :
 - infections à *S. aureus*
- ❖ Questions :
 - Souche particulière ?
 - Si oui, origine africaine ?
 - Facteurs de risque ?

Souche particulière ?

❖ OUI

❖ Même génotype MLVA* : **7-5-4-1-5-3-3-0-8-1-4-2-3-7**

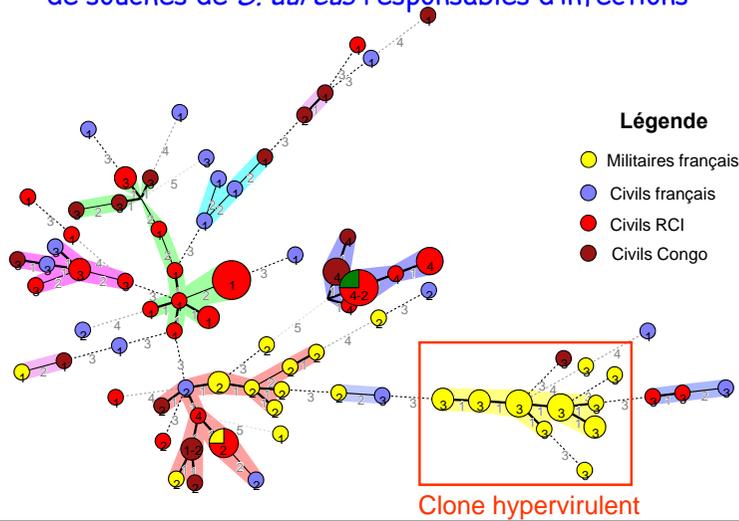
Doxycycline R et méticilline S

– Leucocidine de Panton-Valentine

Université Orsay Paris 11 – HIA R. Picqué

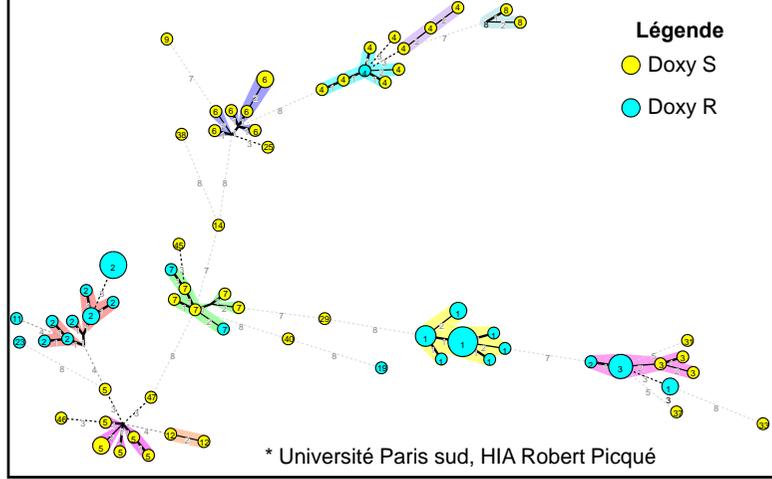
Origine africaine ?

Confrontation des diversités géographique et génotypique de souches de *S. aureus* responsables d'infections



Facteurs de risque ?

Diversité des souches de portage de *S. aureus* avant un départ en Côte d'Ivoire (MLVA*, n=89)



Diversité des souches de portage de *S. aureus* après un séjour de 4 mois en Côte d'Ivoire (n=110)

